

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6382

Die Rolle des Homöoboxgens *gooseoid* in der
mesodermalen Differenzierung von embryonalen
Stammzellen und der Teratokarzinomazelllinie P19
der Maus

Michael W. Schäffer

Institut für Toxikologie und Genetik

vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1999

Zusammenfassung

Das Homöoboxgen *gooseoid*, das zuerst in *Xenopus* identifiziert wurde, ist im Organisator bzw. seinem Äquivalent während der Gastrulation in Frosch, Hühnchen, Zebrafisch und Maus exprimiert. Um die Rolle von *gooseoid* in der frühen Mausentwicklung zu untersuchen, wurden embryonale Stammzellklone isoliert, die das Maushomolog stabil unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors überexprimierten.

Diese Klone zeigten bereits ohne weitere Induzierung von Differenzierungsvorgängen eine von Wildtyp-ES-Zellen unterschiedliche Morphologie, die von fibroblastenähnlichem, mesenchymalem Aussehen geprägt war.

gooseoid-ES-Zellklone exprimieren im Gegensatz zu den Wildtypzellen *Vimentin*, ein Markergen für mesenchymale Zelltypen. Dieses intermediäre Filamentprotein ist wie *gooseoid* in den ersten mesodermalen Zellen während der Embryonalentwicklung exprimiert. Die Analyse der *Vimentin*-Promotorsequenz zeigte, daß die Aktivierung der *Vimentin*-Expression direkt durch die Bindung von *Gooseoid* an spezielle, möglicherweise relevante Bindesequenzen erfolgen könnte.

Die *gooseoid*-ES-Klone exprimieren einige wichtige Markergene des Organisators, wie die neuronalen Induktoren *Chordin* und *Follistatin*, sowie Transkriptionsfaktoren, wie das Homöoboxgen *Otx2* und das "Forkhead"-Gen *HNF3 β* . Interessanterweise waren mRNA-Transkripte für das organisatorspezifische *lim-1* in den Proben der Klone nicht nachweisbar.

Ebenfalls negativ verlief der Nachweis des Markers für Primitivstreifenmesoderm, *Brachyury*. In Zusammenarbeit mit Diane Boucher (UCSF, USA) konnte mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR *gooseoid*-ES-Zellklone (Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors) untersucht werden, die unterschiedliche Expressionsniveaus von *gooseoid* besaßen. Nur in Klon g202, der das höchste Niveau an *gooseoid*-Transkripten aufwies, konnte keine *Brachyury*-mRNA nachgewiesen werden. Diese Experimente deuten auf eine inverse Korrelation von *gooseoid*- und *Brachyury*-Expression hin.

Die *Brachyury*-Repression erfolgt in *Xenopus* über zwei definierte Homöobox-Bindestellen, von denen nur eine auch im 650 bp-Promotor der Maus zu finden ist. Die gezielte Mutagenese dieser potentiellen Bindestelle führte jedoch nicht zu einem Verlust der Repression durch *gooseoid* in transienten Promotorreporter-Experimenten in P19 Zellen.

Die schrittweise Verkürzung um jeweils ca. 100 bp des *Brachyury*-Promotors führte zu einem interessanten "Promotorprofil". Der 535 bp-, sowie der 334 bp- Promotor konnten in seiner Aktivität durch *gooseoid* am stärksten reprimiert werden. Der 441 bp- Promotor konnte nicht durch *gooseoid* reprimiert werden.

Die homologen Bereiche enthalten potentielle Bindestellen für entwicklungsbiologisch relevante Transkriptionsfaktoren, die als Reaktionspartner für *gooseoid* denkbar wären.

The role of the homeobox gene *gooseoid* in mesodermal differentiation of embryonic stem cells and the teratocarcinoma cell line P19 of the mouse

Abstract

The homeobox gene *gooseoid*, originally identified in *Xenopus*, is expressed in the organizer or its equivalent during gastrulation in the frog, chick, zebrafish and mouse. To investigate the role of *gooseoid* in mouse development, embryonic stem cells were generated that stably overexpress the murine homologue of *gooseoid* under the control of the ubiquitin-promotor. These clones revealed a mesenchymal-like morphology distinct from wildtype ES-cells without any further differentiation steps. *Vimentin*, a marker gene for mesenchymal cells, is expressed in these cell clones. The morphological changes of these cells did not correlate with a reduction of the expression level of the cell adhesion molecule *E-Cadherin*.

The *gooseoid* ES-clones express important organizer-specific genes like the neural inducers chordin and follistatin, the homeobox gene *Otx2* and the forkhead gene *HNF3 β* . Surprisingly, *lim-1*-mRNA as well as the expression of gastrulation-associated gene *Brachyury* could not be detected in these cells.

In collaboration with Dr. Diane Boucher (UCSF, USA) embryonic stem cells were generated that stably overexpress the murine homologue of *gooseoid* under the control of the CMV-promotor. *Brachyury* expression in such clones displayed an inverse correlation with *gooseoid* transcript levels, suggesting that *gooseoid* was able to define discrete anterior mesendodermal cell fates.

Interestingly, repression of *Brachyury* is conserved between *Xenopus* and mouse despite the lack of conservation of the *Brachyury* promoter. Mutation of the sole canonical homeobox binding site in the mouse *Brachyury* promoter did not abolish this repression. In order to narrow down sequences that mediate repression by *gooseoid*, *Brachyury*-promotor mutants with different length were cloned. Two additional sequences were identified that were able to repress *Brachyury*, following transient co-transfection of a *gooseoid* effector plasmid in P19 cells. These sequences contain conserved elements between the mouse and frog *Brachyury* promoter, representing potential binding sites for two other transcription factors that are important regulators of early vertebrate development: *LEF-1* and *caudal*.

These observations suggest that *gooseoid* may play a role in specification of anterior mesendodermal fates.

Hinweis

Die vorliegende Arbeit wurde sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernimmt der Autor für die Richtigkeit von Angaben und Hinweisen sowie für eventuelle Druckfehler keine Haftung. Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Arbeit berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die folgenden Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Eine Reproduktion jedweder Art bedarf der ausdrücklichen Genehmigung der Autoren bzw. Verlage.

Abbildung 1A und 1B:

Kaufman TC, Seeger MA, Olsen G. (1990).

Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet* ; **27**, Seite 313.

Abbildung 1C:

Edward B. Lewis aus:

Gilbert, SF. (1994). *Developmental Biology*. 4th Edition, Seite 553, Abbildung 15.27. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. USA.

Abbildung 2:

Knippers, R. *Molekulare Genetik.*, 6. Auflage, Seite 352, Abbildung 12.24
© 1995, **Georg Thieme Verlag**, Stuttgart.

Abbildung 3:

Grafik von **Patricia J. Wynne** in:

"Homeobox genes and the vertebrate body plan", Seite 47.

© Juli 1990, Scientific American, New York, NY. USA.

Abbildung 4:

Linder Biologie, Abbildung. 406.1,

21. neu bearbeitete Auflage, © 1998 **Schroedel Verlag GmbH**, Hannover.

Abbildung 5:

Grafik von **Thomas Schäffer**, Höhr-Grenzhausen.

Abbildung 8:

Belo JA, Leyns L., Yamada G, De Robertis EM. (1998)

The prechordal midline of the chondrocranium is defective in Goosecoid-1 mouse mutants. *Mech Dev*, **72**, Seite 15, Abbildung 3A.

© 1998, **Elsevier Science**, Oxford, England.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Kapitel I Einleitung | 1 |
| | |
| 1. Was ist Entwicklungsbiologie? | 2 |
| 2. Homöoboxgene und Entwicklung | 3 |
| 3. Das Spemann'sche Organisatorphänomen | 8 |
| 4. Die frühe Embryonalentwicklung der Maus | 10 |
| 4.1 Vor der Implantation des Embryos..... | 10 |
| 4.2 Nach der Implantation des Embryos..... | 11 |
| 4.3 Die Gastrulation in der Maus..... | 11 |
| 5. Die Rolle Homöoboxgens <i>gooseoid</i> | 13 |
| 5.1 <i>gooseoid</i> -Expression in <i>Xenopus</i> | 14 |
| 5.2 <i>gooseoid</i> -Expression in der Maus..... | 14 |
| 5.3 Gezielte Mutagenese des <i>gooseoid</i> -Gens..... | 15 |
| 5.4 Ist <i>gooseoid</i> das Organisatorgen?..... | 16 |
| 6. Ein kurzer Schwanz, die Gastrulation und <i>Brachyury</i> | 17 |
| 7. Modellsystem zur <i>in vivo</i>- und <i>in vitro</i>-Untersuchung der frühen Embryonalentwicklung der Maus | |
| Embryonale Stammzellen und Teratokarzinomzelllinien | 19 |
| 7.1 Auf der Suche nach den Stammzellen: die Teratokarzinomzelllinien..... | 19 |
| 7.2 Embryonale Stammzellen..... | 19 |

| | Seite |
|---|-------|
| Kapitel II Fragestellung der Arbeit | 23 |
| Kapitel III Materialien und Methoden | 27 |
| Materialien | 28 |
| 1. Feinchemikalien | 28 |
| 2. Radiochemikalien | 29 |
| 3. Enzyme | 30 |
| 4. Oligonukleotide | 30 |
| 4.1 Oligonukleotid-Primer zur Klonierung von <i>gsc</i> -Fusions-Konstrukten..... | 30 |
| 4.2 Oligonukleotid-Primer für die Reverse Transkriptase-Polymerase- | |
| 4.3 Oligonukleotid-Primer für die PCR-Mutagenese von | 31 |
| Deletionsmutanten des <i>T</i> -Promotors der Maus..... | |
| 4.4 Oligonukleotid-Primer für die Punktmutation im <i>Brachyury</i> -Promotor..... | 32 |
| 4.5 Oligonukleotid-Primer für ein Minimal- <i>Brachyury</i> -Promotor Fragment..... | 33 |
| | 33 |
| 5. Bakterien und Zellen | 33 |
| 6. Plasmide | 34 |
| 7. Sonden für DNA- und RNA-Hybridisierungen | 34 |
| 7.1 <i>Brachyury</i> (<i>T</i> ; Maus)..... | 34 |
| 7.2 <i>gooseoid</i> (<i>gsc</i> ; Maus)..... | 34 |
| 7.3 <i>E-Cadherin</i> (Maus)..... | 34 |
| 7.4 <i>GAPDH</i> (Ratte)..... | 35 |
| 7.5 <i>lim-1</i> (Maus)..... | 35 |
| 7.6 <i>Vimentin</i> (Maus) | 35 |

| | Seite |
|--|-------|
| 8. Antikörper | 35 |
| 8.1 Primärantikörper..... | 35 |
| 8.2 Sekundärantikörper für <i>Western-Blot</i> -Analysen..... | 35 |
| 8.3 Sekundärantikörper für Immunohistochemie..... | 35 |
| 9. Wichtige Lösungen | 36 |
| 10. EDV-Sequenzanalysen | 37 |
| | |
| Methoden | 38 |
| | |
| 1. Allgemeine Arbeitsmethoden | 38 |
| 1.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration..... | 38 |
| 1.2 Extraktion von Nukleinsäuren..... | 38 |
| 1.3 Fällung von Nukleinsäuren..... | 38 |
| 1.4 Amplifikation von cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)..... | 39 |
| | |
| 2. Klonierungstechniken | 39 |
| 2.1 Fragmentierung von DNA durch Restriktionsendonukleasen..... | 39 |
| 2.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese..... | 40 |
| 2.2.1 Agarosegel..... | 40 |
| 2.2.2 Polyacrylamidgel..... | 40 |
| 2.2.3 Auftrennung der Reaktionsprodukte unter denaturierenden Bedingungen (Sequenzierung)..... | 40 |
| 2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 41 |
| 2.4 Ligation von DNA-Fragmenten..... | 41 |
| 2.5 TA-Klonierung®..... | 41 |
| 2.6 Radioaktive Markierung von DNA..... | 42 |
| 2.6.1 Herstellung von Hybridisierungsproben durch Einbau von [α - ³² P] dCTP..... | 42 |
| 2.6.2 Einbau von [α - ³² P] dCTP durch die Polymerasekettenreaktion..... | 42 |
| 2.7 Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien (nach Hanahan, 1983)..... | 42 |

| | Seite |
|---|-----------|
| 2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus rekombinanten Bakterien..... | 43 |
| 2.8.1 Identifizierung positiver Kolonien mittels PCR..... | 43 |
| 2.8.2 Präparation im kleinen Maßstab ("Minipräp")..... | 43 |
| 2.8.3 Präparation im großen Maßstab ("Maxipräp")..... | 44 |
| 2.9 Isolierung von polyadenylierter (Poly-A ⁺)-RNA aus Zellen..... | 45 |
| 2.10 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen (Chromczynski <i>et al.</i> , 1987)..... | 45 |
| 2.11 Sequenzierung doppelsträngiger DNA (Sanger <i>et al.</i> , 1977)..... | 46 |
| 2.12 Zyklische Sequenzierung mit ThermoSequenase™..... | 47 |
| 3. Zellkultur | 47 |
| 3.1 Kulturmedien..... | 47 |
| 3.2 Routinebehandlung von Zellen..... | 48 |
| 3.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen..... | 48 |
| 3.2.2 Trypsinbehandlung..... | 48 |
| 3.2.3 Herstellung von LIF-konditioniertem Medium..... | 49 |
| 3.3 Transfektionen..... | 49 |
| 3.3.1 Calcium-Phosphat-Methode..... | 49 |
| 3.3.2 SuperFect-Methode™..... | 50 |
| 3.3.3 Stabile Transfektionen (Elektroporation, Eul <i>et al.</i> , 1989)..... | 50 |
| 4. Analytische Methoden | 51 |
| 4.1 Bestimmung der Luziferase-Aktivität..... | 51 |
| 4.1.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten..... | 51 |
| 4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry <i>et al.</i> , 1951)..... | 51 |
| 4.1.3 Luziferase-Assay..... | 51 |
| 4.1.4 Statistische Auswertung der Luziferase-Versuche..... | 52 |
| 4.2 Analyse von RNA mittels reverser Transkription und anschließender PCR (<i>RT-PCR</i>)..... | 52 |
| 4.2.1 DNaseI-Verdau..... | 52 |
| 4.2.2 Synthese von cDNA mittels reverser Transkription..... | 52 |
| 4.2.3 Amplifikation der cDNA mit anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Quantifizierung..... | 53 |
| 4.3 Northern blotting und Hybridisierung..... | 53 |
| 4.3.1 Hybridisierung mit Denhardt's Lösung..... | 54 |
| 4.3.2 Hybridisierung mit QuickHyb™..... | 55 |
| 4.4 Southern Blotting..... | 56 |

| | Seite |
|---|--------|
| 4.4.1 Isolierung genomischer DNA aus Zellen..... | 55 |
| 4.4.2 Restriktionsverdau..... | 55 |
| 4.4.3 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese..... | 56 |
| 4.4.4 <i>Southern-Blot</i> und Hybridisierung..... | 56 |
| 4.5 Western Blotting..... | 57 |
| 4.5.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten - Präparation und Auftrennung von Proteinextraktem für den <i>Western-Blot</i> | 57 |
| 4.5.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS- Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE, Laemmli, 1970)..... | 57 |
| 4.5.3 Western-Blot und Protein-Detektion auf Membranen..... | 58 |
| 4.6 Immunhistochemie..... | 58 |
| 4.6.1 Vorbereitung der Zellen..... | 58 |
| 4.6.2 Antikörper-Reaktion..... | 59 |
| Kapitel IV Ergebnisse | 61 |
| 1. ES-Zellklone, die stabil <i>goosecoid</i> exprimieren, verändern ihre Morphologie | 62 |
| 1.1 Herstellung von ES- <i>gsc</i> Klonen..... | 62 |
| 1.2 Analyse von Massenkulturen..... | 66 |
| 2. <i>Vimentin</i> - ein Zielgen für <i>goosecoid</i>? | 70 |
| 2.1 Hinweise aus der <i>Vimentin</i> -Promotorsequenz..... | 70 |
| 2.2 Immunhistochemie der HM-1 Klone..... | 72 |
| 3. <i>goosecoid</i>-Fusionskonstrukte | 73 |
| 3.1 Klonierung..... | 73 |
| 3.1.1 N-terminale Fusion mit dem Grün-Fluorezierenden Protein (GFP)..... | 74 |
| 3.1.2 N-terminale Fusion mit Myc..... | 75 |
| 3.2 Überprüfung der Funktionalität der Fusionskonstrukte..... | 75 |
| 3.2.1 Überprüfung der korrekten Proteingröße durch Western Blot..... | 75 |
| 3.2.2 FACS Analyse von <i>gfgsc</i> | 77 |
| 3.2.3 Repressionsassay..... | 79 |
| 4. <i>In vitro</i>-Analyse der Klone | 81 |

| | Seite |
|--|-------|
| 5. Repression der <i>Brachyury</i>-Expression durch <i>gooseoid</i>..... | 84 |
| 5.1 Vergleich der Expressionsniveaus von <i>Brachyury</i> und <i>gooseoid</i> in ES-Zellklonen durch semiquantitative RT-PCR..... | 84 |
| 5.2 Analyse des <i>Brachyury</i> -Promotors der Maus..... | 86 |
| 5.2.1 Vergleich von <i>Brachyury</i> -Promotersequenzen von Maus und <i>Xenopus</i> | 86 |
| 5.2.2 <i>gooseoid</i> wirkt als Repressor auf <i>Brachyury</i> -Transkription in der Maus..... | 88 |
| 5.2.3 Analyse von Längenmutanten des <i>Brachyury</i> -Promotors | 89 |
| Kapitel V Diskussion | |
| | 93 |
| 1. ES-Zellklone, die stabil <i>gooseoid</i> exprimieren, verändern ihre Morphologie..... | 94 |
| 2. <i>Vimentin</i> - ein Zielgen für <i>gooseoid</i>?..... | 98 |
| 3. <i>gsc</i>-ES-Zellklone exprimieren anteriore, mesodermale Marker..... | 101 |
| 3.1 Expression von <i>HNF3β</i> | 101 |
| 3.2 Expression von <i>chordin</i> und <i>follistatin</i> | 102 |
| 3.3 Expression von <i>Otx2</i> | 103 |
| 3.4 Expression von <i>Brachyury</i> | 104 |
| 3.5 Zusammenfassung der Expressionsanalysen..... | 104 |
| 4. <i>Brachyury</i> und <i>gooseoid</i> - eine inverse Korrelation..... | 105 |
| 4.1 Repression von <i>Brachyury</i> durch <i>gooseoid</i> | 105 |
| 4.2 Analyse des <i>Brachyury</i> -Promotors..... | 106 |
| 5. Zusammenfassende Betrachtung..... | 110 |
| Kapitel VI Literaturverzeichnis..... | 113 |

| | Seite |
|---|-------|
| Kapitel VII Anhang | 133 |
| 1. Abkürzungsverzeichnis | 134 |
| 2. Buchstabencode der Aminosäuren | 137 |
| 3. Plasmidkarten | 138 |
| 3.1 Verwandte Plasmide..... | 138 |
| 3.1.1 pcUBI1.1+..... | 138 |
| 3.1.2 pT81luc..... | 139 |
| 3.2 Verwendete Expressionskonstrukte..... | 140 |
| 4. Wichtige DNA-Sequenzen | 140 |
| 4.1 DNA-Sequenz und Restriktionskarte des <i>hgfp_{gsc}</i> -Fusionskonstrukts..... | 140 |
| 4.2 Sequenz des <i>Brachyury</i> -Promotors der Maus..... | 144 |
| 4.3 Vimentin-Promotor der Maus..... | 145 |

Einleitung

I. Einleitung

1. Was ist Entwicklungsbiologie?

Seit vielen Jahrzehnten beschäftigen sich die Entwicklungsbiologen mit folgender Frage:

"Wie entsteht aus einer Einzelzelle ein komplexes, vielzelliges Lebewesen?"

Im Mittelpunkt steht also die Fragestellung, wie aus einer befruchteten, kugelsymmetrischen Eizelle innerhalb weniger Stunden bis Tage ein Embryo entsteht, der eine anterior-posteriore¹ Polarität (Kopf- und Schwanzende), Dorsal- und Ventralseite (Rücken und Bauch), sowie eine linke und eine rechte Körperseite aufweist.

Durch die rasante Entwicklung der Genetik und der Molekularbiologie in den letzten Jahrzehnten ist klar geworden, daß der Bauplan aller Lebewesen in den Genen festgelegt ist. Dadurch hat sich die ursprüngliche Fragestellung erweitert:

"Wie kann aus der linearen Information der DNA-Sequenz ein dreidimensionaler Organismus entstehen (eingebunden in die Zeit als vierte Dimension) ?"

Höhere Organismen besitzen zwanzig- bis hunderttausend Gene, deren Aktivität von hierarchisch untereinander verschalteten **Kontrollgenen** gesteuert und koordiniert werden muß. Durch geeignete Untersuchungsobjekte, wie Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), Taufliege (*Drosophila melanogaster*), Frosch (*Xenopus laevis*), Maus (*Mus musculus*), Huhn und Zebrafisch wird in vielen Forscherteams versucht, das Schaltschema dieser Kontrollgene zu entschlüsseln.

¹ anterior (lat.): vorderer; posterior (lat.): hinterer

Die genetische Information wird nicht nur innerhalb einer Zelle abgelesen; die Zellen tauschen auch Genprodukte und Informationen untereinander aus um einen Organismus aufzubauen. Die Entwicklungsbiologie umfaßt daher auch die zeitlich korrekte Abfolge von Zell-Zell-Inter-aktionen, Induktion und Inhibition, sowie Differenzierungen. Bei diesen Vorgängen binden verschiedenartige Proteine an spezifische Bindestellen und steuern so die Transkription anderer Gene. Aufgrund der Tatsache, daß diese sogenannten Transkriptionsfaktoren durch verschiedene Mechanismen an DNA binden, werden sie in unterschiedliche Gruppen unterteilt: z.B. den Zinkfingerproteine (z.B. Krox-20), den "Forkhead"-Proteinen (z.B. HNF3s), Leucin-Zipper Proteinen (z.B. AP-1), Helix-Loop-Helix Proteine (z.B. MyoD) und den Homöobox-Proteinen (z.B. HOX-Gene).

2. Homöoboxgene und Entwicklung

Mit Hilfe der modernen Genetik und der Molekularbiologie hatte man mittlerweile die Werkzeuge in der Hand, die Mechanismen von Entwicklungsvorgängen auf zellulärer Ebene zu entschlüsseln, d.h die **Regulatorgene** zu finden, die diese Prozesse steuern.

Es gibt bei dem Studienobjekt *Drosophila* eine Klasse der sog. **homöotischen Mutationen**. Diese befindenen sich vermutlich in wichtigen Genen, die genetischen Schaltern gleich, ganze Entwicklungsprogramme steuern. Man spricht daher auch von den "**Mastercontrolgenes**" der Entwicklung eines Organismus.

Die Analyse der zugrundeliegenden Entwicklungsprozesse wurde mit der Entdeckung dieser Mutanten eingeleitet. Bei homöotischen Mutationen ist die Segmentidentität verlorengegangen. Dies bedeutet, daß Mutationen in homöotischen Genen die teilweise oder komplette Umwandlung eines Körpersegmentes in ein anderes verursachen können. Zwei Beispiele für homöotische Mutationen aus der *Drosophila*-Genetik sollen dies verdeutlichen:

Walter Gehring entdeckte 1965 eine Mutante, die statt Antennen Beine an ihrem Kopf trug. Wie sich nachfolgend herausstellte, liegt das Gen dieser Mutante in einer Gruppe von Genen, die die Strukturen des erwachsenen Tieres am Kopf und den vorderen Thoraxsegmenten determinieren. Das betroffene Gen *Antennapedia* (*Antp*) gab dem sog. Antennapedia-Komplex seinen Namen (*Abbildung 1-1B*). Die zweite Gruppe von Genen, im sog. Bithorax-Komplex, steuert die Entwicklung der hinteren beiden Thorax- und der Abdomen-Segmente. Mutationen in einem Gen dieses Komplexes (*Ultrabithorax*, *Ubx*), wandeln die Identität des

Thoraxsegmentes in die des Flügel tragenden Segmentes um. Dies führt zu einer Fliege mit einem zusätzlichen Flügelpaar (Lewis, 1978) (*Abbildung 1-1C*).

Bei Wirbeltieren sind ebenfalls homöotische Transformationen zu finden. Sie äußern sich z.B. beim Menschen in der unterschiedlichen Anzahl an Rippenpaaren (11 bzw. 13) oder durch einen zusätzlichen Finger oder Zeh.

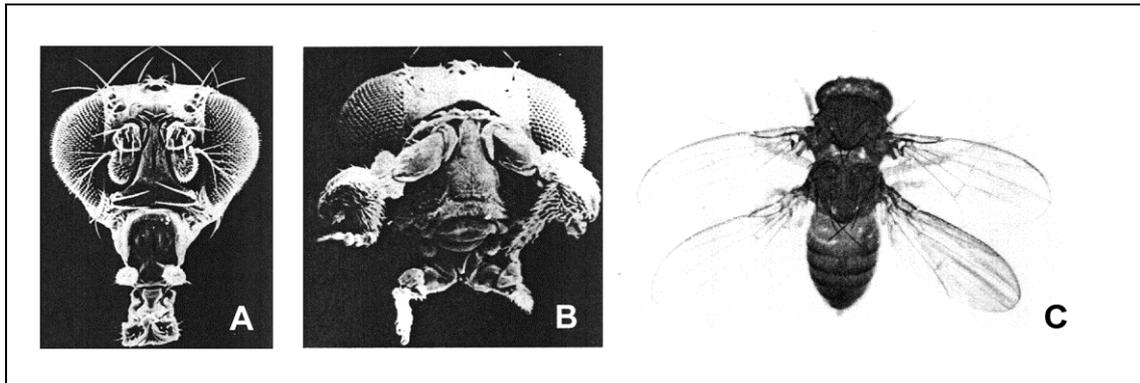


Abbildung 1-1: Beispiele für homöotische Mutationen bei Drosophila Melanogaster. A zeigt den Kopf einer Wildtyp-Fliege im Vergleich zur Antp-Mutante (B), (C) stellt die Ubx-Mutante dar.

Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Thomas C. Kaufman (A und B) und Edward B. Lewis (C).

Eddy DeRobertis klonierte 1984 das erste Wirbeltier-Homöoboxgen (HOXC6) (Carrasco *et al.*, 1984). Mittlerweile sind Homöoboxgene in allen Tierspezies, sowie in Hefe und Pflanzen charakterisiert worden. Es wird angenommen, daß mehrere hundert verschiedene dieser Homöoboxgene im Genom höherer Vertebraten (Wirbeltiere) vorkommen. Sie spielen häufig eine wichtige Rolle bei der Musterbildung, d.h. bei der Ausgestaltung der Identität der 'Segmente'. Die Segmentierung der Wirbeltiere ist z.B. in den Strukturen der Somiten² bereits während der frühen Embryonalentwicklung sichtbar.

Homöoboxgene sind aufgrund ihrer Bedeutung für die Entwicklung eines Lebewesens während der Evolution stark konserviert worden. Die entsprechenden kodierten Proteine unterscheiden sich drastisch in Größe und Aminosäuresequenz, aber sie haben einen gemeinsamen Abschnitt von 60 Aminosäuren, die sog. **Homöobox**, die für die Bindung an die

² Somiten: auch Ursegmente, Gliederung des embryonalen Mesoderms, die sich ab dem 9. Tag (Maus) bzw. 20. Tag der Embryonalentwicklung (Mensch) paarig um das Neuralrohr lagern (42-44 Paare). Sie differenzieren sich in Sklerotome (pluripotentes Bindegewebe, sog. Mesenchym; Weiterentwicklung zur Wirbelsäule), Dermatome (Anlagen von Leder- und Unterhaut) und Myotome (Anlagen der segmentalen Rumpfmuskulatur).

DNA verantwortlich ist (siehe *Abbildung 1-2*). In den 60 Aminosäuren der Homöoboxdomäne des homologen Gens von *Antp* beim Menschen liegt nur ein einziger Aminosäureaustausch gegenüber *Drosophila* vor, obwohl sich beide Spezies vor mehr als 50 Millionen Jahren getrennt entwickelten.

Homöoproteine sind als positiv oder negativ wirkende **Transkriptionsfaktoren** bekannt. Der große Unterschied außerhalb der DNA-Bindungsdomäne erklärt sich damit, daß jeder Faktor eine andere Aufgabe und genetische Funktion während der Entwicklung hat und mit wechselnden Proteinen in Kontakt treten können muß.

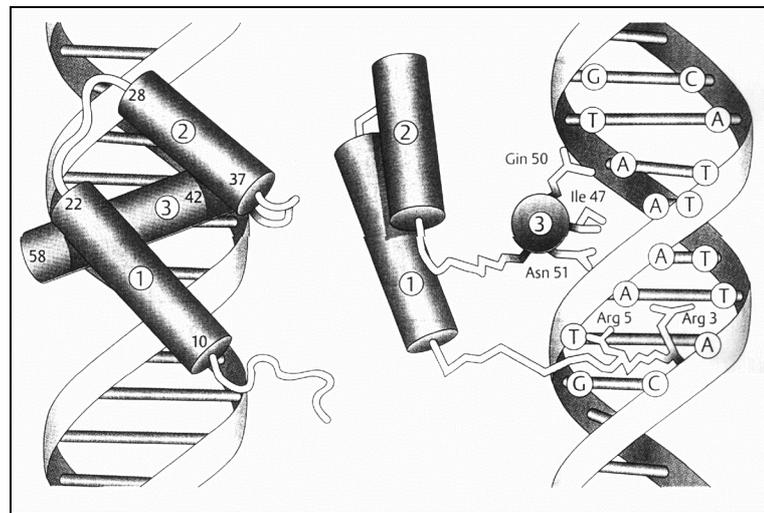


Abbildung 1-2: Die Homöobox an der DNA. Die dargestellte Homöobox stammt aus dem Produkt des Gens en (engrailed). Der linke Komplex enthält kleine Zahlen, die Beginn und Ende der α -Helices angeben. Rechts werden durch die Zahlen die Kontakte der einzelnen Aminosäuren mit der DNA angedeutet. Die α -Helices sind von 1-3 numeriert. Helix 3 ist die DNA-Erkennungshelix. Schema nach Knippers (1995) und Kissinger et al. (1990).

Mit freundlicher Genehmigung des G. Thieme Verlags, Stuttgart.

Strukturanalysen zeigten ein eindeutiges Muster des Homöobox-DNA-Komplexes, das auch als "Helix-turn-Helix"-Motiv bezeichnet wird. Die Homöobox besteht zumeist aus drei aufeinanderfolgenden Abschnitten, die eine α -helikale Sekundärstruktur einnehmen .

Helix 1 und Helix 2 liegen in antiparalleler Anordnung eng beieinander. Sie sind von Helix 3 durch eine Drehung (*turn*) der Polypeptidkette getrennt, so daß Helix 3 etwa im rechten Winkel zu Helix 1 und 2 zu liegen kommt. Im Inneren dieser kompakten Struktur liegen die hydrophoben Seitengruppen, die der Anordnung ihre Stabilität geben. Daher kann eine

isolierte Homöobox-Sequenz, losgelöst vom Rest des Proteins, die natürliche Faltung einnehmen und an DNA binden.

Die "Erkennungshelix" 3 legt sich in die große Rinne der DNA, und definierte Aminosäure-seitengruppen nehmen spezifische Kontakte mit bestimmten DNA-Basen und den Sauerstoffgruppen in den Phosphodiester-Bindungen auf. Zusätzliche spezifische Bindungen mit den DNA-Basen gehen von den Aminosäuren des "Arms" am aminoterminalen Ende der Homöobox aus (Knippers, 1995).

Für die Bindungsspezifität der Homöodomäne an die DNA ist insbesondere die Aminosäure in Position 50 entscheidend. Ein Lysin begünstigt die Bindung an die Sequenz GGATTA, während Glutamin in Position 50 die Sequenz C C/A ATTA bevorzugt (Affolter *et al.*, 1990). Für die Funktion einer Homöodomäne sind auch die flankierenden Sequenzen wichtig, da sie zu einem von der Konsensussequenz abweichenden Bindungsverhalten führen können (Simeone *et al.*, 1998).

Bei allen vielzelligen Tierstämmen (Metazoen) liegen die Homöoboxgene (bzw. Hox-Gene) im Genom in Gruppen ("Cluster" oder Komplex) zusammen. Die Anzahl der Cluster variiert, so besitzt der rote Mehlkäfer (*Tribolium castaneum*) einen, *Drosophila* zwei³ (Antp, und BX-C) und höhere Wirbeltiere vier solcher Cluster, die bei ihnen auf vier Chromosomen verteilt sind. Diese Hox-Komplexe sind im Lauf der Evolution wahrscheinlich aus Genomduplikationen hervorgegangen.

Mensch und Maus besitzen je 39 Gene in diesen vier Komplexen. Diese sind aufgrund von Sequenzhomologien in 13 homologe Gruppen eingeordnet. Die Hox-Komplexe sind durch die sog. **Kolinearität** charakterisiert. Hierunter fallen die räumliche und die zeitliche Kolinearität, sowie die kolineare Sensitivität gegen Retinsäure. Räumliche Kolinearität ist die Entsprechung der physikalischen Abfolge auf dem Chromosom mit der Expression entlang der antero-posterioren Körperachse. Unter zeitlicher Kolinearität versteht man die Tatsache, daß die Gene am Anfang des Komplexes zuerst exprimiert werden und die an seinem Ende zuletzt. Kolineare Sensitivität gegen Retinsäure bedeutet, daß die Gene am anterioren Ende des Komplexes früher und stärker durch Retinsäure aktiviert werden, als Gene am posterioren Ende (*Abbildung 1-3*).

Aufgrund dieser Kolinearität ist anzunehmen, daß die Hoxgene gleich einem kombinatorischen Code funktionieren, indem sie verschiedene regionale Identitäten durch ein Koordinatensystem axialer Signale ausbilden. Gemäß der Hox-Code-Hypothese ist die Identität eines Segments durch die Kombination der in ihr exprimierten Hoxgene definiert.

³ Die *Drosophila*-Cluster sitzen beide auf Chromosom 3, werden aber häufig getrennt betrachtet.

Manipuliert man experimentell den Hox-Code, d.h. die Expression der Hoxgene, führt dies zu homöotischen Transformationen.

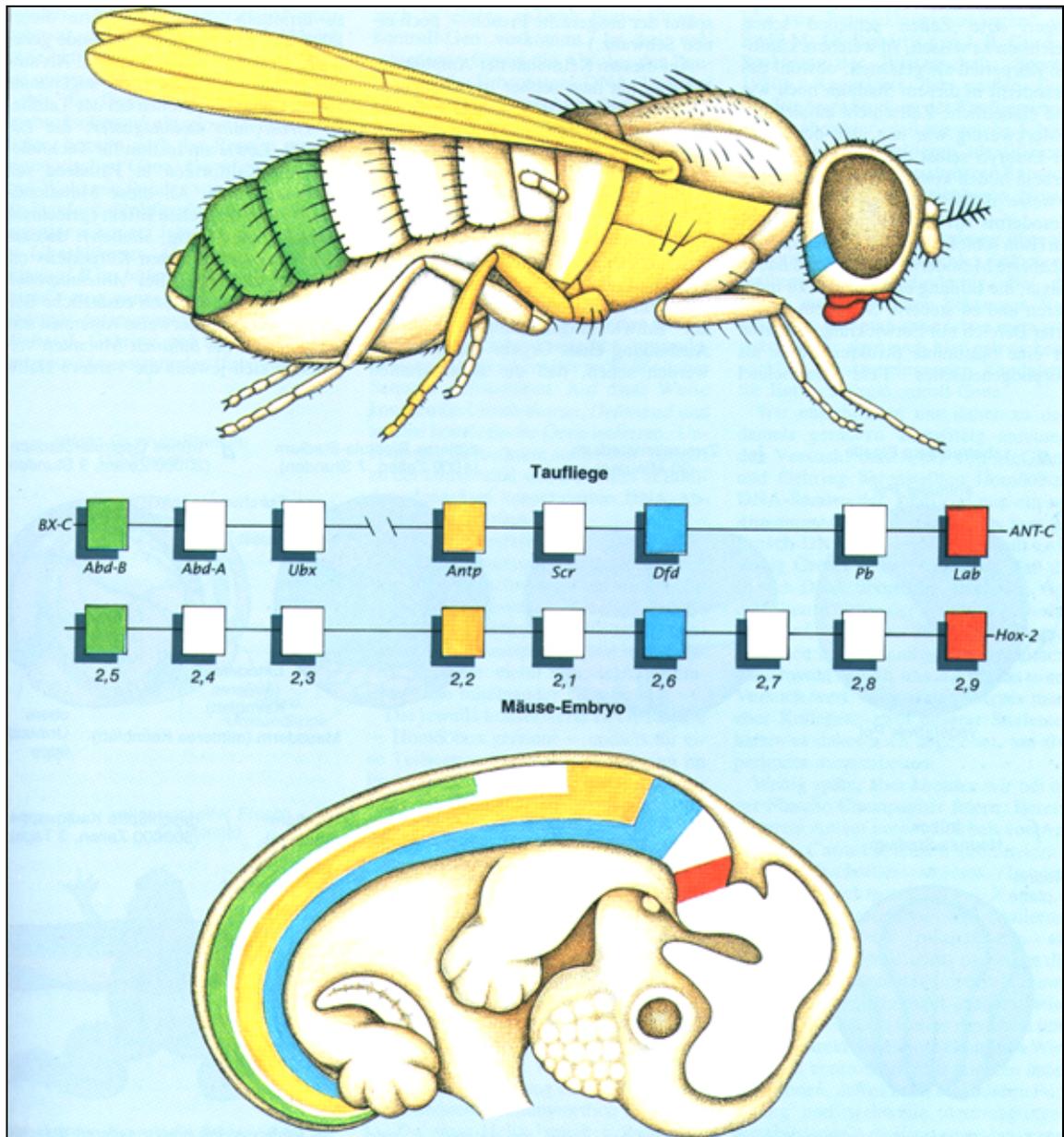


Abbildung 1-3: Evolutionäre Konservierung der Homöoboxgen-Organisations- und Transkriptionsmuster in Drosophila und Maus. Vergleich der Transkriptionsmuster der HOM-C Gene in Drosophila (10 Stunden alt) und der Hox-B Gene (Chromosom 11) in der Maus (E12). Die Darstellung enthält exemplarisch nur eines der vier HOX-Cluster der Maus, in veralteter Nomenklatur. Die Gene am 5'-Ende des Komplexes (rechts) werden posterior am

spätesten exprimiert. Sie können nur durch hohe Dosen all-trans-Retinsäure induziert werden.

Mit freundlicher Genehmigung von Patricia J. Wynne und Scientific American, USA.

3. Das Spemann'sche Organisatorphänomen

Nach der Befruchtung beginnen die meisten Wirbeltierembryonen mit einer Folge von Zellteilungen, in welcher die Zellen immer kleiner werden, während der Embryo selbst nicht wächst (Furchungsteilungen). Im Anschluß bildet sich ein Zellhaufen (Morula), später ein kugelförmiges Gebilde mit einem zentralen Hohlraum, die sog. Blastula. Die Achsenbildung startet während der Gastrulation. Während dieses dynamischen Entwicklungsstadiums findet eine grundlegende Umgestaltung des Embryos statt. Aus dem einschichtigen Keim entsteht ein mehrschichtiger Embryo. Einzelne Zellen oder ganze Zellverbände wandern an die Orte im Embryo, an denen später die entsprechenden Organe entstehen. Damit ist der Grundbauplan der Wirbeltierembryonen angelegt, und das für alle Vertebraten charakteristische phylogenetische Stadium erreicht. Karl Ernst von Baer beschrieb zuerst (1828) die auffälligen Ähnlichkeiten der frühen Embryogenese der einzelnen Wirbeltierklassen, deren Unterschiede sich erst später während der Organogenese offenbaren (Abbildung 1-4).

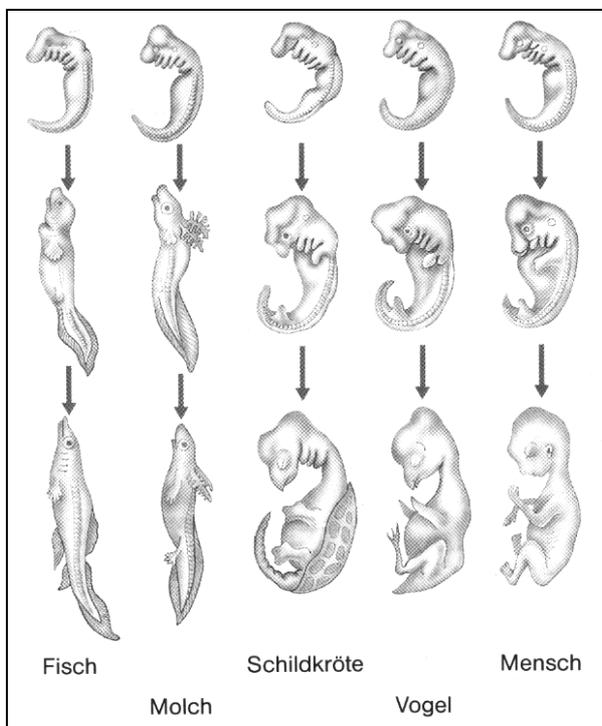


Abbildung 1-4:

Schema des Baer'schen Gesetzes. Frühe Embryonen (oben) verschiedener Wirbeltiere ähneln einander stark. Sie zeigen Merkmale wie Chorda, Neuralrohr, Schlundtaschen und Somiten, was für alle Wirbeltiere charakteristisch ist.

Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung (mitte, unten) geben sie sich als Vertreter ihrer jeweiligen Klasse, Ordnung, Familie und schließlich Spezies zu erkennen. aus: Linder Biologie, Abb. 406.1, 21. neu bearbeitete Auflage, © 1998 Schroedel Verlag GmbH, Hannover.

Das **Spemann'sche Organisatorphänomen** konnte erstmals im Jahre 1924 durch ein altes, einfaches Grundexperiment der Entwicklungsbiologie beobachtet werden:

Die **Gastrulation** (etwa: "die Entstehung des Magens") ist ein wichtiger Prozeß in der Embryogenese. Sie beginnt zu einem Zeitpunkt, an dem der Embryo die Blastula darstellt. Auf der dorsalen Seite beginnen ein paar Zellen in den Embryo hineinzuwandern, wodurch der Urmund, der "Organisator" der Achsenentwicklung, auf der dorsalen Seite des Embryos entsteht. Die Gastrulation endet mit der Anlage des Körperbauplans in seinen drei Keimblättern: Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Obwohl die Mechanismen der Gastrulation in den verschiedenen Klassen der Vertebraten sehr von einander abweichen, ist das Endresultat, **der festgelegte Körperbauplan**, in ihnen allen gleich.

Mit der Gastrulation wird auch die anterior-posteriore Körperachse festgelegt. Farbstoffmarkierungsexperimente von Walther Vogt (1929) zeigten, daß sich die obere (dorsale) Urmundlippe in embryonales Stützgewebe (Chorda dorsalis) entwickelt.

Die Experimente von Spemann und Mangold (1924) am Embryo des Teichmolches bestanden darin, die dorsale Urmundlippe auf die Ventralseite eines zweiten Embryos zu transplantieren. Das ventrale Gewebe, das während der normalen Entwicklung Blutzellen, Haut und Muskeln ausbildet, entwickelte nun, induziert durch das Transplantat, eine zweite Körperachse (*Abbildung 1-5*). Spemann entnahm die transplantierte Urmundlippe einem Albino-Molch, wodurch er Empfänger- und Spendergewebe unterscheiden konnte. Histologische Analysen ergaben, daß die verpflanzte Urmundlippe auch an ihrem neuen Ort in Chorda dorsalis (axiales⁴ Mesoderm) differenzierte, so daß eine herkunftsgemäße Entwicklung vorlag. Die zweite Körperachse enthielt außerdem ein vollständiges Neuralrohr und auf beiden Seiten Somiten (paraxiales⁵ Mesoderm).

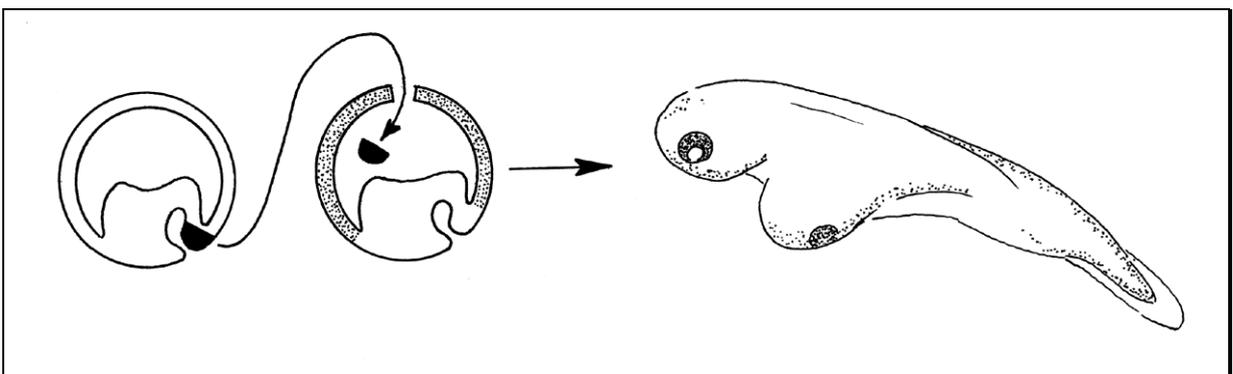


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung des Spemann'schen Organisator Phänomens.

⁴ axial (lat. axis Achse): in Richtung der Achse

⁵ paraxial: neben der Achse

Grafik: Thomas Schäffer.

Spemann benannte dieses Gewebe der Urmundlippe als **Organisator**, da es die Fähigkeit hat, nach seiner Transplantation das umliegende künftige Bauchgewebe in eine normale Dorsalachse zu transformieren.

Der Spemann'sche Organisator ist daher durch drei Eigenschaften charakterisiert:

- die herkunftsgemäße Entwicklung in Chorda dorsalis,
- die Ausbildung eines Neuralrohrs in der äußeren Zellschicht (Ektoderm) des Wirtsembryos (*neurale Induktion*),
- die Transformation der darunter liegenden Zellschicht von ventralen zu dorsalen Qualitäten (*Dorsalisierung des Mesoderms*).

Seit mehr als 70 Jahren beschäftigt der Spemann'sche Organisator nun schon die Wissenschaftler, da das Rätsel dieses Phänomens bis heute noch nicht bis in alle Einzelheiten aufgeklärt ist. In den vergangenen Jahren sind einige beteiligte Faktoren isoliert und charakterisiert worden. Interessanterweise sind viele dieser grundlegenden Mechanismen bei allen Wirbeltierklassen und Spezies ähnlich, gelegentlich sind auch gemeinsame Entwicklungsprinzipien zwischen Vertebraten und Invertebraten zu finden.

4. Die frühe Embryonalentwicklung der Maus

4.1 Vor der Implantation des Embryos

Nach der Befruchtung der Eizelle verschmelzen der weibliche und männliche Pronukleus, um das neue diploide Genom des entstehenden Embryos zu bilden. Während die ersten Zellteilungen stattfinden, wandert der Embryo im Ovidukt zum Uterus.

Bis zum frühen Achtzellstadium (Morula) sind die einzelnen Zellen (Blastomeren) des Mausembryos äquipotent, d.h. aus jeder Blastomere kann eine Maus entstehen. Zu diesem Zeitpunkt werden die Kontakte der Zellen zueinander enger. Diese sog. Kompaktierung ist das erste Differenzierungsereignis, bei dem die ersten zwei Gewebe entstehen: das außenliegende Trophektoderm und die 'Innere Zellmasse' (ICM)⁶. Das Trophektoderm ist extraembryonal und wichtig für die Implantation des Embryos und bildet den embryonalen Beitrag zur

⁶ engl.: inner cell mass (ICM)

Plazenta, trägt jedoch nicht zum eigentlichen Embryo bei. Der Embryo wächst weiter und bildet einen mit Flüssigkeit gefüllten Hohlraum, das Blastozoele. In diesem Stadium wird der Embryo als Blastozyste bezeichnet; er besteht zu diesem Zeitpunkt aus 58 Zellen (Drews, 1993).

Aus der ICM entwickelt sich der eigentliche Embryo. Diese Zellen sind totipotent, d.h. aus ihnen kann sich ein kompletter Organismus ausbilden, jedoch kein Trophektoderm mehr (im Gegensatz zu den Blastomeren) (Gilbert, 1995).

Der frühe Mausembryo ist bis zu diesem Zeitpunkt von einer Membran, der sog. Zona Pellucida umgeben. Sie schützt den Embryo vor einer verfrühten Anheftung an die Eileiterwände. Am fünften Tag der Embryonalentwicklung (E5) schlüpft die Blastozyste aus der Zona und kann implantieren. Zur Steuerung der Implantation findet ein komplexer embryo-maternaler Dialog statt, der auf dem Zusammenspiel von Hormonen (z.B. Choriogonadotropin, Östrogene), Proteinen (Leukemia Inhibitory Factor LIF, Collagen, Laminin, Fibronectin, Plasminogen-aktivator) und Enzymen (Proteasen, z.B. Collagenasen) basiert. Die Trophektoblastzellen stellen in diesem hochinvasiven Prozeß die vollständige Verbindung zur maternalen Plazenta her. Der Embryo wird nun von der Mutter ernährt.

4.2 Nach der Implantation des Embryos

Der zweite Differenzierungsvorgang in der Säugetierembryogenese ist charakterisiert durch das Auftreten einer epithelialen Zellschicht, dem *Primitivendoderm (Hypoblasten)*. Die verbleibenden Zellen sind zunächst unpolarisiert und organisieren sich allmählich in einer anderen Zellschicht, dem *Primitivektoderm (Epiblasten oder embryonales Ektoderm)*. An der apikalen Seite⁷ verbinden Zell-Zell-Haftproteine, die sog. Desmosomen, die sich polarisierenden primitivektodermalen Zellen miteinander. Die basale⁸ Zelloberfläche dieser Zellen ist an einer dünnen Basallamina angeheftet, die sich zwischen Endoderm und Ektoderm befindet. In diesem Zustand ist der Mausembryo zum Zeitpunkt E6,4 bevor die Gastrulation und somit die Entstehung des dritten Keimblattes, dem *Mesoderm*, beginnt.

4.3 Die Gastrulation in der Maus

An der Grenze zwischen extraembryonalem und embryonalem Gewebe lösen sich Zellen aus dem Primitivektoderm und wandern vereinzelt in den Raum zwischen Endoderm und

⁷ von lat. Apex, die Spitze; den Scheitel, die Spitze betreffend

⁸ an der Basis, Grundfläche liegend

Ektoderm. Sie verlieren ihre epitheliale Eigenschaft, d.h. die Polarität, und nehmen eine neue Identität als mesodermale Zellen an. Ihre Zell-Zell-Spezifität wandelt sich zu einer Zell-Substrat-Affinität um, und die mesodermalen Zellen breiten sich auf den Substraten der Basallamina (Gelatine, Kollagen, Laminin, Fibronectin und Vitronectin) aus, bis sie schließlich den gesamten Eizylinder umschließen. Die auswandernden Zellen besiedeln zuerst den Primitiv-streifen. Der Primitivstreifen hat zunächst keine genau definierte Struktur. Er wird im Laufe der Gastrulation durch mesodermale Zellen, die die Basallamina aufbrechen und zwischen Epiblast und Endoderm einwandern, definiert. Im späten Gastrulationsstadium ist der Primitivstreifen auf halber Höhe ca. 35 µm dick, was einem Durchmesser von vier bis fünf Zellen entspricht (Lawson, 1992). Das anteriore Ende des Primitivstreifens ist als der sog. Knoten definiert, der durch seine Eigenschaften und durch die Expression diverser Markergene das Mausäquivalent zum Spemann'schen Organisator in Amphibien wie Molch und Frosch darstellt. *Abbildung 1-6* stellt den Gastrulationsvorgang in der Maus schematisch dar.

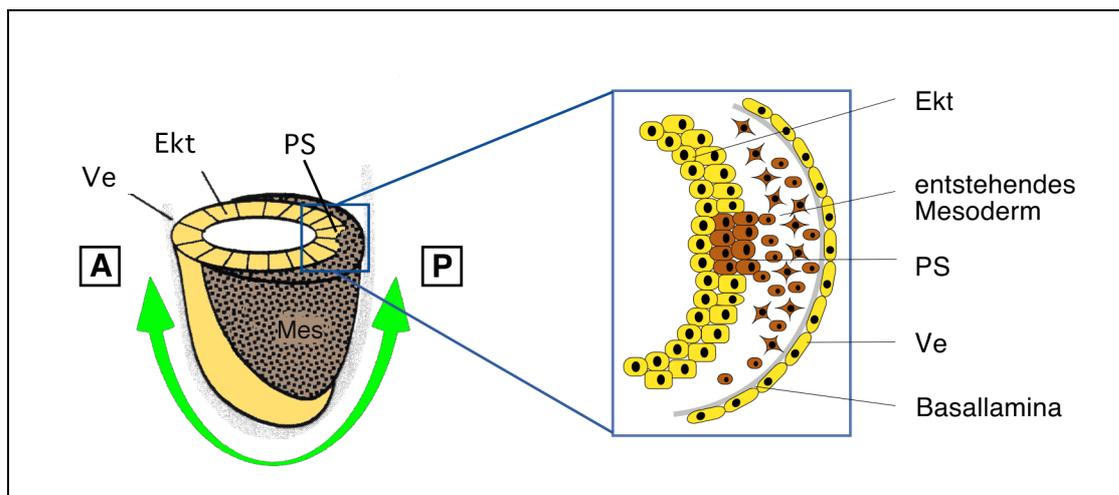


Abbildung 1-6: Schematischer Querschnitt durch einen gastrulierenden Mausembryo (E6,5). Die grünen Pfeile zeigen die anterior-posteriore Achse. Die äußere Zellschicht des primitiven (viszeralen) Endoderms (Ve) stellt eine transiente Struktur dar, die während der Gastrulation von den Zellen des definitiven Endoderms ersetzt wird.

Abkürzungen: PS: Primitivstreifen; Mes: Mesoderm (braune Zellen); Ekt: embryonales Ektoderm (gelbe Zellen); A: anterior; P: posterior.

Das Nervensystem der Wirbeltiere entsteht am Ende der Gastrulation, indem das dorsale Ektoderm von epidermalem zu neuralem Gewebe induziert wird. Dieses neugebildete Neuroektoderm formt die Neuralplatte, die sich an ihrem Rand entlang, der dorsalen Mittellinie, zu zwei Neuralfalten aufwirft. Das Neuralrohr wird gebildet, indem sich die Neuralfalten auf-einander zubewegen und vom anterioren zum posterioren Ende hin schließen.

5. Die Rolle des Homöoboxgens *gooseoid*

Nach und nach werden die molekularen Grundlagen des Spemann'schen Organisatorphänomens aufgeklärt. Blumberg *et al.* (1991) isolierten das erste Gen, das eine wichtige Rolle im Spemann'schen Organisator spielt. Das Homöoboxgen *gooseoid* kodiert für einen nukleären Transkriptionsfaktor. *gooseoid* wurde aus einer cDNA-Bibliothek der Urmundlippe von *Xenopus*-Gastrulae isoliert. Seine Homöobox enthält Sequenzhomologien zu den *Drosophila*-Genen *gooseberry* und *bicoid* und wurde daher *gooseoid* getauft.

Homologe Gene wurden aus Maus, Hühnchen, Zebrafisch und Mensch kloniert. Die genomische Organisation des *gooseoid*-Gens ist dabei stets gleich: es besteht aus drei Exons und zwei Introns, mit konservierten Übergängen zwischen Exons und Introns. Die Aminosäuresequenz der Homöodomäne ist in den meisten Wirbeltieren zu 100% konserviert (Abbildung 1-7).

| | | | | | | |
|---------|------------|---------------------------|------------|-------------|--------------|-----|
| MENSCH | MPASMFSIDN | ILAARPRCKD | SVLPVr.tAa | APVVFPaLHGD | SLYGgA...SS | 48 |
| MAUS | MPASMFSIDN | ILAARPRCKD | aVLPVapsAa | APVVFPaLHGD | SLYGAgGgTSS | 52 |
| XENOPUS | MPsgMFSIDN | ILAARPRCKD | SVL...LPqn | gPVVFssL.GE | SLYtGpa.... | 45 |
| HUHN | MPASMFSIDN | ILAARPRCKD | SVL...LPps | APVVFPsLHGD | SLYGAA....S | 46 |
| MENSCH | DYGaFYpRPV | AP.gAGLPAA | VtGSRLGYNN | YFYGQLHVQAA | PVGPACCGAVP | 99 |
| MAUS | DYGaFYpRPV | APGgAGLPAA | VgsSRLGYNs | YFYGQLHVQAA | PVGPACCGAVP | 104 |
| XENOPUS | DYsGLYnRaV | Aptst..lqg | VNGSRLGYNN | YFYGQLHVQ.t | hLGPsCCGtVq | 92 |
| HUHN | DYGaFYsRaV | APGsA.LPAv | gr.SRLGYNN | YFYGQLHVats | PVGPpsCCGAVP | 95 |
| MENSCH | PLGAQQCSCV | Ptp ¹ GYEGpG | SVLVSPVPHQ | MLPYMNVGTLs | RTELQLLNQLH | 151 |
| MAUS | PLGAQQCSCV | Ptp ¹ GYEGpG | SVLVSPVPHQ | MLPYMNVGTLs | RTELQLLNQLH | 156 |
| XENOPUS | aLGtQQCSCV | Ppat ¹ aYDGAG | SVLmpPVPHQ | MMPYMNVGTLs | RTELQLLNQLH | 144 |
| HUHN | PLGAQQCSCV | Ppa ¹ .lGYEGAG | SVLmSPVPHQ | MLPYMNVGTLs | RTELQLLNQLH | 146 |
| MENSCH | CRRKRRHRTI | FTDEQLEALE | NLFQETKYPD | VGTRQLARKV | HLREEKVEVWF | 203 |
| MAUS | CRRKRRHRTI | FTDEQLEALE | NLFQETKYPD | VGTRQLARKV | HLREEKVEVWF | 208 |
| XENOPUS | CRRKRRHRTI | FTDEQLEALE | NLFQETKYPD | VGTRQLARKV | HLREEKVEVWF | 196 |
| HUHN | CRRKRRHRTI | FTDEQLEALE | NLFQETKYPD | VGTRQLARKV | HLREEKVEVWF | 198 |
| MENSCH | KNRRAKWRRQ | KRSSSEESSEN | AeKWNKtSSs | KASPEKREEEG | KSDLDSDS | 252 |
| MAUS | KNRRAKWRRQ | KRSSSEESSEN | AeKWNKtSS. | KASPEKREEEG | KSDLDSDS | 256 |
| XENOPUS | KNRRAKWRRQ | KRSSSEESSEN | pQKWNKsS.. | KnSaEKaDEEv | KSDLDSDS | 243 |
| HUHN | KNRRAKWRRQ | KRSSSEESSEN | AQKWNKaS.. | KtSPEKRqEDG | KSDLDSDS | 245 |

Abbildung 1-7: Das *goosecoid*-Gen. Vergleich der Aminosäuresequenzen von vier Vertebraten *goosecoid*-Genen. Konservierte Aminosäuren sind mit Großbuchstaben dargestellt, abweichende Aminosäuren mit Kleinbuchstaben. Die Positionen der konservierten Exon-Intron Grenzen von Mensch-, Maus- und *Xenopus*-Genen sind durch gestrichelte Linien kenntlich gemacht. Die Homöobox ist grau unterlegt und die konservierte Aminosäure Lysin (K) an Position 50 der Homöobox ist durch einen Punkt (•) markiert. Alle vier Sequenzen weisen einen hohen Grad an Konservierung auf, der in 23 aminoterminalen Aminosäuren, der Homöobox und 41 Aminosäuren N-terminal und 15 Aminosäuren C-terminal der Homöobox zu finden ist. Die Sequenzen wurden aus der EMBL-Genbank entnommen: Mensch (A54677) Maus (M85271), *Xenopus* (M63872) und Huhn (X70471).

5.1 *goosecoid*-Expression in *Xenopus*

In *Xenopus*-Embryonen ist die *goosecoid*-Expression bereits vor dem Start der Gastrulation nachweisbar. Die Expression dieses Homöoboxgens ist zum Zeitpunkt der Gastrulation am stärksten in einem 60° Bogen über der dorsalen Urmundlippe. Dieser Bereich entspricht dem Spemann'schen Organisator (De Robertis *et al.*, 1992). Die *goosecoid*-mRNA Konzentration sinkt, einem Gradienten gleich, von dorsal nach ventral (Niehrs *et al.*, 1994).

Die Injektion von *goosecoid*-mRNA in die ventrale, der dorsalen Urmundlippe genau entgegengesetzten Seite des Froschembryos, führt zur Ausbildung einer zweiten Körperachse, inklusive Notochord⁹. Dieser Effekt ist *goosecoid*-spezifisch, da die Injektion von *goosecoid*-mRNA ohne Homöobox, sowie die Injektion von *XIHbox 6*-mRNA, einem nicht verwandten Homöoboxgen, keinen Effekt zeigt. (Cho *et al.*, 1991)

Experimente von Niehrs *et al.* (1994) zeigten, daß ektopische¹⁰ *goosecoid*-Expression eine dosisabhängige Induktion von dorsalem Gewebe bewirkt. Nach Injektion von *goosecoid*-mRNA, deren Mengen schrittweise gesteigert wurde, änderte sich das Zellschicksal bei bestimmten Schwellenwerten. Dies führte (mit zunehmender Dosis) zur Bildung von: α -Globin (Blut entsprechend), Pronephros (Vornieren) und Herzmuskelgewebe. Die höchste Dosis an injizierter *goosecoid*-mRNA rief die Ausbildung von Notochord und neuralem Gewebe hervor.

Diese Experimente demonstrierten, daß *goosecoid* die Eigenschaften des Spemann'schen Organisators nachahmen kann, und seine räumliche Expression ein geeigneter Marker für dieses Gewebe darstellt.

⁹ Notochord: transiente anterior-posteriore Struktur, die der Embryo zur neuralen Induktion benötigt.

¹⁰ ektopisch (gr. ekto-, topos) : an falscher bzw. anderer Stelle liegend

5.2 *goosecoid*-Expression in der Maus

Am Tag E6,4 beginnt die *goosecoid*-Expression an der Seite des Eizylinders in den Zellen des Epiblasten, die einen epithelial-mesenchymalen Übergang durchlaufen und so den Startpunkt der Primitivstreifenbildung markieren. Im Laufe der Gastrulation, während der Primitivstreifen-ausbildung, ist die *goosecoid*-Expression in den anteriorsten Zellen des vordringenden Mesoderms lokalisiert. Nach der Ausbildung des Primitivstreifens ist *goosecoid* an seinem anterioren Ende, im sog. Knoten, und im anterioren visceralen Endoderm exprimiert (Blum *et al.*, 1992; Belo *et al.*, 1998); siehe *Abbildung 1-8*. Die Transplantation dieses Bereiches in eine *Xenopus* Gastrula im sog. "Einsteck-Assay" führt ebenfalls zur Ausbildung einer zweiten Körperachse. Diese Tatsache belegt deutlich das universelle Prinzip dieser grundlegenden, artenumfassenden Entwicklungsvorgänge.

Die *goosecoid*-Expression besteht auch während des Neurulations-Stadiums fort, sie kann in der anterioren Mittellinie, dem axialen Mesoderm und Neuroektoderm, sowie der Prächordalplatte nachgewiesen werden (Belo *et al.*, 1998).

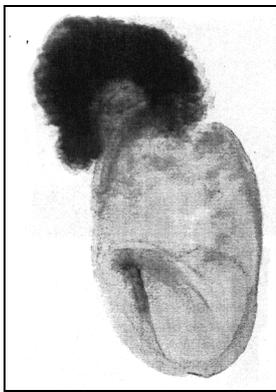


Abbildung 1-8:

Lokalisation der goosecoid-Expression während der frühen Embryonalentwicklung (E7,5) der Maus durch In-situ-Hybridisierung.

Nachdruck aus: Mech Dev, 72. Belo JA, Leyns L., Yamada G, De Robertis EM. "The prechordal midline of the chondrocranium is defective in Goosecoid-1 mouse mutants." Seite 15, © (1998), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier Science, Oxford, UK.

Eine zweite Phase der *goosecoid*-Expression ist während der Organogenese ab E 10,5 (Gaunt *et al.*, 1993) im Kopfmesenchym (Branchialbögen 1 und 2) und in den Extremitätenknospen lokalisiert.

5.3 Gezielte Mutagenese des *goosecoid*-Gens

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Experimenten, die das Potential des Goosecoid-Proteins in Zellwanderungs- und Zelldifferenzierungsvorgängen demonstrieren, werden Mäuse, die homozygot ein Null-Allel für *goosecoid* tragen, überraschenderweise lebend geboren. Sie sterben jedoch im Verlauf eines Tages nach der Geburt. Diese mutanten Mäuse zeigen Defekte im Kopfbereich (Zunge, Ohr, Nase; Yamada *et al.*, 1994). Eine detaillierte Betrachtung (Belo *et al.*, 1998) zeigte, daß einige *goosecoid*^{-/-} Mausembryonen eine posteriore, homöotische Transformation des Halswirbelknochens C7 in den Brustwirbelknochen Th1 aufweisen. Eine weitere homöotische Transformation zeigt sich in der von sieben auf sechs reduzierten Anzahl der Rippenpaare, die mit dem Sternum verbunden sind (Rivera-Pérez *et al.*, 1995; Belo *et al.*, 1998).

Neuere Ergebnisse lassen vermuten, daß das Fehlen eines Gastrulationsphänotyps in diesen Mäusen auf eine funktionelle Komplementation durch ein oder mehrere *goosecoid*-verwandte Gene zurückzuführen ist.

Tatsächlich sind kürzlich zwei weitere zu *goosecoid* homologe Gene kloniert worden: *Gsx*¹¹ im Hühnchen (Lemaire *et al.*, 1997) und *Gsc-like (Gsc)*¹² in der Maus (Galili *et al.*, 1997). Sequenzvergleiche von Belo *et al.* (1998) legen nahe, daß *Gsx* einem in der Maus noch nicht gefundenen *goosecoid-2* Gen entspricht und *Gsc* wegen seiner bestimmten Unterschiede zu *goosecoid-1* und *-2* ein drittes Homolog, *goosecoid-3*, darstellt. Während der Gastrulation und der Entwicklung des ventralen Diencephalons¹³ im Hühnchen überlappen die Expressionsdomänen von *goosecoid-1* und *-2*. Dies deutet auf eine vorliegende funktionelle Redundanz in der Embryogenese der *goosecoid*^{-/-} Mausembryonen hin.

5.4 Ist *goosecoid* das Organisatorgen?¹⁴

Die molekularbiologische Aufklärung des Spemann'schen Organisatorphänomens zeigte, daß nicht nur *goosecoid* sondern auch viele andere Gene zu diesem Effekt beitragen. Homöoboxgene wie *Xlim-1*, *Xotx2*, *Xnot* und Gene mit einem *forkhead* DNA-Bindemotiv wie *HNF3β* können ähnlich wie *goosecoid* eine zweite Körperachse induzieren. Die Expression dieser Organisator-spezifischen Transkriptionsfaktoren kann durch Wachstumsfaktoren wie Vg1, Aktivin und Wnt¹⁵ aktiviert werden. Auch diese Signalmoleküle vermögen die Bildung von dorsalem Mesoderm zu induzieren.

¹¹ Genbank Accession Number: Y09850

¹² Genbank Accession Number: U70231

¹³ Diencephalon: lat. Zwischenhirn

¹⁴ Vergl. auch De Robertis (1995)

¹⁵ benannt nach seinem Drosophilahomolog *wingless*

Der Effekt auf die Nachbarzellen wird wahrscheinlich durch das Anschalten von organisator-spezifischen Signalproteinen wie Chordin, Noggin und Follistatin vermittelt.

Gemäß vieler Studien scheinen die biochemischen Reaktionswege, die zur Bildung des Organisators führen, aus folgenden Schritten zu bestehen: der Expression von organisator-spezifischen Homöoboxgenen, der Transkription von Zielgenen, die für die Signalmoleküle kodieren und der Induktion von Nachbarzellen zu axialem Mesoderm und neuralem Gewebe.

Ein zentrales Problem des Organisatorphänomens ist die Frage, wie die transplantierte Urmundlippe das umliegende ventrale Gewebe auf 'dorsal' umprogrammiert.

Das erste Signalmolekül, das in diesem Prozeß identifiziert wurde, war das Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4). Es gehört zur Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren β (TGF β)¹⁶. Untersuchungen in *Xenopus* wiesen *BMP-4* als Gegenspieler des Organisators aus, der anti-neural wirkt und zur Ausbildung von ventralem Mesoderm führt (Sasai *et al.*, 1995). Dieser Faktor wird im Frosch Gastrulaembryo in vielen Bereichen exprimiert, z.T. auch an dem Ort, an dem der Organisator wirkt. Um Nervensystem und dorsales Mesoderm zu bilden, muß der Organisator BMP-4 im Embryo lokal neutralisieren können. BMP-4 bindet an seinem Rezeptor an der Zelloberfläche und vermittelt sein Signal über Zwischenschritte an den Zellkern. Dies führt zum Start des ventral-spezifischen Programms, ausgelöst durch BMP-4. Chordin, Noggin und Follistatin sind die Gegenspieler. Sie können an das BMP-4 Protein binden und dadurch den Kontakt zum BMP Rezeptor verhindern (Piccolo *et al.*, 1996; Iemura *et al.*, 1998; Zimmerman *et al.*, 1996). Auf diese Weise sind die BMP-4 Zielgene ausgeschaltet, wodurch die Zellen das dorsal-mesodermale bzw. neurale Programm starten können.

6. Ein kurzer Schwanz, die Gastrulation und *Brachyury*

Eine Maus mit einem vererbbaaren Merkmal -ein kurzer Schwanz- ebnete nach mehr als 60 Jahren Forschung den Weg für die Entdeckung einer neuen Genfamilie von DNA-Bindeproteinen. Diese *Brachyury*- (eigentlich "kurzer Schwanz")¹⁷ Maus entstammte aus Experimenten französischer Forscher¹⁸, die 1927 Mausstämmen auf vererbbaare Merkmale untersuchten, indem sie durch Gammastrahlen Mutagenese auslösten. Die klassische

¹⁶ Abk. aus dem engl.: TGF β für Transforming Growth Factor β

¹⁷ Die Bezeichnungen *Brachyury* und *T* (von engl. Tail, Schwanz) sind beide für das gleiche Gen gebräuchlich. *Brachy*- Wortteil mit der Bedeutung kurz, klein

¹⁸ Dobrovolskaia-Zavdkaia, 1927

Brachyury-Mutation manifestiert sich in heterozygoten Tieren mit einem kurzen oder einem abgeknickten Schwanz. Homozygote Mäuse für *T* sterben am 10. Tag der Embryonalentwicklung und weisen bestimmte Verstümmelungen an der Körperachse auf. Diese *T/T*-Embryonen haben kaum oder gar kein ausgebildetes Notochord und weisen Somiten nur bis zur Höhe der vorderen Extremitäten auf. Die embryonale Letalität beruht jedoch nicht auf der verkürzten Körperachse, sondern vielmehr auf einer defekten Allantois¹⁹, die keine Verbindung zur Plazenta aufbauen kann. Diese Embryonen bekommen daher keine Nährstoffe und sterben schließlich am zehnten Tag. (Glücksohn-Schönheimer, 1944).

Mehr als 60 Jahre später wurde das Gen, das für die *Brachyury*-Mutation verantwortlich ist, kloniert (Röhme *et al.*, 1984 ; Herrmann *et al.*, 1990). *Brachyury* kodiert für ein neues, aus 436 Aminosäuren bestehendes Polypeptid. Dieses bindet an eine spezifische DNA-Sequenz und wirkt als transkriptioneller Aktivator (Kispert *et al.*, 1995). Der Genlocus auf Chromosom 17, auch *t*-Komplex genannt, umspannt 15 cM²⁰ und enthält neben dem H2-Komplex²¹ auch *Brachyury*, *small t (t)* und *Brachyury the second (T2)* (Rennebeck *et al.*, 1995). Zwischen ihnen und *Brachyury* bestehen wahrscheinlich Wechselwirkungen, da Mutationen in ihrem Gen zu einem ähnlichen Phänotyp wie die *Brachyury*-Mutation führen. Mittlerweile sind homologe *Brachyury*-Gene in einer Vielzahl von Spezies wie *Drosophila*, *C. elegans*, Zebrafisch, Frosch, Hühnchen, Maus und Menschen kloniert worden. Diese Homologe, wie auch andere verwandte Gene innerhalb einer Spezies, weisen in der DNA-Bindedomäne große Ähnlichkeiten untereinander auf. Deshalb gruppierte man diese Gene unter dem Namen "T-Box-Genfamilie". (Papaioannou und Silver 1998)

Die *Brachyury*-Expression in der Maus ist von E6,5 - E7 im Mesoderm und in den Zellen des primitiven Endoderms, im Primitivstreifen und im entstehenden Notochord nachweisbar. Die Expression besteht im und um den Primitivstreifen während der Gastrulation fort. Die Zellen, die vom Primitivstreifen weg wandern, differenzieren in paraxiales Mesoderm und verlieren die *Brachyury*-Expression. Die Notochordzellen (axiales Mesoderm) exprimieren bis zum Ende der Gastrulation *Brachyury*. Die *Brachyury*-Mutation betrifft daher insbesondere die Zellen des posterioren axialen Mesoderms, die *Brachyury* während der Gastrulation exprimieren (Kispert und Herrmann, 1994).

Das Expressionsmuster von *Brachyury* ist unter den Vertebraten bemerkenswert gut konserviert. Die Expression beginnt im frühen Mesoderm und ist zum axialen Mesoderm und dem posterioren, weniger differenzierten Mesoderm begrenzt (Kavka und Green, 1997).

¹⁹ Allantois: eine im Lauf der Embryogenese entstehende Ausstülpung des Dottersacks, die der Embryo als Kloake verwendet.

²⁰ cM: centi-Morgan, Die Einheit einer Genkarte ist die Rekombinationsfrequenz, angegeben in Prozent und oft als cM bezeichnet; nach T. H. Morgan, 1910.

²¹ H2 - DNA kommt im Zellkern als Komplex mit basischen Proteinen, den Histonen, vor. H2 ist eine von fünf Histonarten.

7. Modellsystem zur *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchung der frühen Embryonalentwicklung der Maus

Embryonale Stammzellen und Teratokarzinomazelllinien

7.1 Auf der Suche nach den Stammzellen: die Teratokarzinomazelllinien

Die Maus ist ein weiterer wichtiger Modellorganismus um entwicklungsbiologische Prozesse zu untersuchen, nicht zuletzt auch aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades zum Menschen. Im Gegensatz zu anderen entwicklungsbiologisch relevanten Organismen wie *Drosophila* und *Xenopus*, sind insbesondere die frühen Entwicklungsstadien der Maus schwer zugänglich.

Schon vor 25 Jahren kannte man diverse Differenzierungssysteme, wie z.B. Myoblasten (Königsberg und Buckley, 1974), Neuroblasten (Prasad, 1975) und hämatopoetische Zellen (Metcalf und Moore, 1973). Das Ausgangsmaterial bildeten jedoch in allen Fällen bereits determinierte Zellen, die letztendlich terminal differenzieren, d.h. ihre bestimmte Funktion als spezialisierte Zellart einnehmen (z.B. Muskelzelle, Neuronen und Granulozyten). Im Hinblick auf ihr Differenzierungspotential sind die Zellen des frühen Embryos am wenigsten beschränkt. Ihre Fähigkeit, in alle möglichen Zelltypen zu differenzieren, nennt man totipotent. Die ersten klonalen Zelllinien, die diesen Eigenschaften sehr nahe kamen, waren die embryonalen Karzinomazellen (engl.: embryonal carcinoma; EC). Sie leiten sich von Teratokarzinomen ab, die spontan oder induziert in ausgewachsenen Wirtsmäusen auftreten (Damjanov und Solter, 1974; Martin 1975). Durch Transplantation eines frühen Mausembryos (E1-7,5) in Empfänger-gewebe, wie Testis oder Nieren, kann solch ein Teratom bzw. Teratokarzinom²² induziert werden. Martin und Evans gelang 1975 die Etablierung und Charakterisierung einer ersten EC-Zelllinie aus einem Teratokarzinom. Diese EC-Zellen sind pluripotent²³, d.h sie können in eine Vielzahl von Geweben differenziert werden.

²² Teratokarzinom: gr. teras, teratos. Ungeheuer; Synonym für carcinoma embryonale

²³ pluri-: Wortteil mit der Bedeutung mehr, viele; von lat. plus, pluris

7.2 Embryonale Stammzellen

1981 gelang zwei Forschergruppen (Evans und Kaufman; Martin) die Isolierung der ICM aus einer 3,5 Tage alten Blastozyste. Die Kultivierung in einer Petrischale resultierte in einer Vielzahl unterschiedlich differenzierter Zellen und Strukturen. Als die Zellen auf einer Schicht embryonaler Fibroblasten (auch "Feeder"-Zellen) kultiviert wurden, differenzierten die Zellen nicht mehr, sondern proliferierten unverändert weiter. Dies ermöglichte schließlich die Etablierung einer totipotenten, embryonalen Stammzelllinie (ES).

Bei der Kultivierung von ES-Zellen ist es wichtig, daß die Zellen in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden. Die Feederzellen geben an das Medium essentielle Faktoren ab, die die Differenzierungsvorgänge blockieren. Dies sind in erster Linie der *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), Oncostatin M und der ciliäre neurotrophische Faktor (CNTF), die alle an den gleichen Rezeptor binden können (Ip *et al.*, 1991). Gibt man dem Kulturmedium genügend rekombinantes LIF-Protein bei und kultiviert die ES-Zellen auf Gelatine-beschichteten Gewebekulturschalen, kann auf die Feeder-Zellen verzichtet werden. Dies ist jedoch auch von der ES-Zelllinie abhängig (Maggin *et al.* 1992). ES-Zellen können durch Injektion in eine Empfängerblastozyste bzw. durch Kokultur mit Morulae und anschließendem Transfer in den Uterus scheinsschwangerer Ammenmäuse wieder zur Bildung einer Maus beitragen. Die dabei entstehende Maus ist chimär²⁴, d.h. sowohl der Empfängerembryo als auch die ES-Zellen haben zur Bildung der einzelnen Organe beigetragen. Anhand des Fells kann der Grad der Durchmischung des Empfängerembryos (schwarzes Fell) mit den ES-Zellen (hellbeige Farbe) abgeschätzt werden (Chimärismus).

ES- und EC-Zellen haben viele gemeinsame Charakteristika: sie sind häufig morphologisch nicht unterscheidbar, haben die gleichen Kultivierungserfordernisse und ihre Differenzierung *in vitro* resultiert in der Bildung gleicher Zelltypen und der Differenzierung in Abkömmlinge aller drei Keimblätter (Evans und Kaufmann, 1981; Martin, 1981). Während ES-Zellen in der Abwesenheit von LIF spontan differenzieren, benötigen EC-Zellen chemische Induktoren zur Differenzierung. Bei beiden Zelltypen führt die Inkubation von z.B all-trans Retinsäure zur terminalen Differenzierung in Neuronen (Robertson, 1982) und von Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Ausbildung von schlagenden Herzmuskeln (Maltsev *et al.*, 1993). Durch die Anwendung eines "Cocktails" diverser Interleukine (Keller und Wiles, 1993) konnten ES-

²⁴ Chimäre, gr. Chimaira, nach der gr. Mythologie ein dreiköpfiges Ungeheuer

Zellen spezifisch in Makrophagen und andere hämatopoetischen Zellen differenziert werden. Werden ES-/EC-Zellen in Petrischalen mit besonders glatter Oberfläche kultiviert, können sich die Zellen nicht mehr an der Schale anheften. Sie formen embryoähnliche dreidimensionale Gebilde, die sog. embryoiden Körperchen (engl.: 'embryoid bodies'; EB) (Martin 1975 und 1981). Nach ihrer Bildung in Suspension können sie wieder an normale Gewebekulturschalen anheften. Sie differenzieren weiter unter Ausbildung unterschiedlichster Strukturen und Zelltypen wie Skelett- und schlagende Herzmuskeln, Nervenzellen und Melanozyten. Längere Suspensions-kultivierung der EBs führt zur Ausbildung eines visceralen²⁵ Dottersacks und Blutbildungs-inseln (Doetschman *et al.*, 1985).

Abbildung 1-9 zeigt einen schematischen Überblick über das *in vivo*-/*in vitro*- Untersuchungssystem der Maus.

²⁵ Viscera (lat.): Eingeweide

(McBurney, 1982 & 1983) sind pluripotente und immortalisierte Teratokarzinomzellen, welche eine Quelle für unbegrenztes Material für Experimente darstellen. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen (ES) behalten sie bei normalem Wachstum ihren undifferenzierten Zustand bei. Durch Zugabe von chemischen Induktoren können P19 Zellen in unterschiedliche Gewebe differenziert werden. Sie verwenden dabei die gleichen Mechanismen wie normale embryonale Zellen.

Über viele Jahre hinweg konnten Gene und deren Funktionen nur durch die Analyse spontaner Mutationen erforscht werden (als Beispiel siehe diese Kapitel, Abschnitt 6.). Die Anwendung der gezielten Genmutagenese hat zum Ziel, spezifisch Gene zu zerstören. Ein DNA-Konstrukt enthält ein Teil des Gens, wobei ein essentieller Teil durch ein Markergen ersetzt wird. Dieses sog. 'targeting construct' wird durch Transfektionstechniken wie Elektroporation in die Zelle eingebracht. Nach Selektion mit dem Antibiotikum Neomycin werden mit molekularen Methoden Zellklone isoliert, die das endogene Genstück durch homologe Rekombination gegen das Konstrukt ausgetauscht haben. Unterwirft man ES-Zellen dieser Prozedur, so können die erhaltenen Klone, wie oben beschrieben, zur Entwicklung eines chimären Tieres beitragen. Haben die mutierten ES-Zellen an der Bildung der Keimzellen teilgenommen, können die Tiere die Mutation an ihre Nachkommen weiterreichen. Die Kreuzung dieser heterozygoten Nachkommen führt schließlich auch zu Mäusen, die beide Allele des gewünschten Gens mutiert haben. Die Analyse dieser sog. "Knock-out" Mäuse liefert häufig wichtige Informationen über Funktion und Expression des betroffenen Gens. Seit dem ersten Gen-K.O. sind mittlerweile mehr als 300 Gene auf diese Weise getestet worden.

Fragestellung

II. Fragestellung der Arbeit

Ein Gen, das wie *gooseoid* nach Fehlexpression massive Entwicklungsstörungen zeigt, wie die Ausbildung einer zweiten Körperachse, muß während der normalen Embryonalentwicklung in seinem räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster präzise kontrolliert werden. Danilov *et al.* (1998) konnten zeigen, daß das Gooseoid-Protein an spezifische Sequenzen seines eigenen Promotors binden kann und so seine Transkription wieder herunterreguliert.

Die vielfältigen Daten, die aus Experimenten mit unterschiedlichen Organismen gewonnen wurden, bestätigen die wichtige Rolle von *gooseoid* bei dem Organisatorphänomen. Über die Effekte und Wechselwirkungen von *gooseoid* mit anderen Genen bei der mesodermalen Differenzierung in der Maus ist jedoch nicht viel bekannt. In welchem Maße ähnliche molekulare Mechanismen bei stark homologen Genen zwischen den verschiedenen Spezies zugrunde gelegt werden können, ist noch nicht abschließend erforscht.

In dieser Arbeit soll die Rolle von *gooseoid* bei der mesodermalen Differenzierung während der Gastrulation untersucht werden. Dazu werden in einem *in vitro* Ansatz die embryonalen Stamm- und Teratokarzinomzellen der Maus verwendet, da Mausembryonen während der frühen Embryonalentwicklung relativ klein und schwer zugänglich sind. *gooseoid* ist jedoch in diesen Zellen nur innerhalb eines kurzen Zeitraums während der Differenzierung durch DMSO exprimiert (Pruitt, 1994). In dieser Arbeit sollen daher ES-Zellklone isoliert werden, die eine ektopische Überexpression von *gooseoid* aufweisen. Mit Hilfe dieses speziellen Modell-systems soll durch Expressionsanalysen und Differenzierungsexperimente gezeigt werden, ob und auf welche Art die *gooseoid*-Expression das Differenzierungsverhalten der Zellen *in vitro* beeinflusst und ob *gooseoid*-exprimierende Stammzellen sogar den Zellen des Spemann'schen Organisators entsprechen.

Dabei wurden starke Promotoren wie der CMV- (Promotor des Cytomegalovirus) und Ubiquitin- (Ubi-) Promotor verwendet. Der Ubi-Promotor erlaubt die Expression auf hohem Niveau von Genen in fast allen Geweben in Mausembryonen (Schorpp *et al.*, 1996).

Zur einfachen und direkten Detektion des Goosecoid-Proteins sollen Fusionskonstrukte zwischen dem grün-fluoreszierenden Protein (*Green Fluorescent Protein; GFP*; Ward, 1979) bzw. einem Myc-Epitop und Goosecoid konstruiert und auf ihre Funktionalität hin getestet werden.

Nach Anregung mit kurzwelligem Licht kann GFP durch Emission von grünem Licht nachgewiesen werden. Dies ist in fixierten wie in lebenden Organismen möglich (Prasher *et al.*, 1992).

Ein ähnliches Fusionsprotein zwischen GFP und *Exuperantia*, einem Entwicklungsprotein aus *Drosophila*, ist funktionell aktiv, und kann in transgenen Fliegen den *exuperantia* Phänotyp komplementieren (Wang und Hazelrigg, 1994).

Das GFP- und das Myc-Protein können durch käuflich erhältliche Antikörper detektiert werden. Durch N-terminale Fusion dieser "Tags" mit Goosecoid, müßten daher die Fusionsproteine in Westernblot- bzw. Immunfluoreszenzanalysen nachweisbar sein.

Das Genprodukt von *Brachyury (T)* spielt, wie Goosecoid, bei der Gastrulation der Vertebraten eine wichtige Rolle. Injektionen von *goosecoid*-mRNA in ventrale *Xenopus*-Blastomeren führen zur Aktivierung von *T* in Zellen der ventralen Randzone. Da in der Maus sowohl *Brachyury* als auch *goosecoid* in den ersten mesodermalen Zellen exprimiert sind, lag zunächst die Vermutung nahe, daß *goosecoid* *Brachyury* anschalten könnte.

Kürzlich belegten jedoch zwei Studien, daß *goosecoid* als ein Repressor der *Brachyury*-Transkription in *Xenopus* fungiert (Artinger *et al.*, 1997; Latinkic *et al.*, 1997).

Ein Vergleich der Promotorregion des *Brachyury* Gens in Frosch und Maus soll klären, ob eine hohe Sequenzhomologie, wie bei den kodierenden Sequenzen beider Gene, vorliegt. Die Analyse des Maus-*Brachyury*-Promotors und seine transkriptionelle Antwort auf *goosecoid* soll zeigen, ob ein ähnlicher Mechanismus auch in der Maus existiert.

Potentielle Homöobox-Bindestellen sollen durch zielgerichtete Mutagenese deletiert werden, um die Bereiche zu finden, die für die Repression der *Brachyury*-Expression essentiell sein könnten. Durch die Verwendung von schrittweise (jeweils ca. 100 bp) verkürzten *Brachyury*-Promotor-Reporterkonstrukten soll experimentell ermittelt werden, ob andere Sequenzbereiche synergistisch bzw. antagonistisch zur Repression durch *goosecoid* beitragen können.

Zur Durchführung dieser Experimente wird die embryonale Teratokarzinomzelllinie P19 in transienten Transfektionen verwendet. Ihre Charakteristika machen sie zu einem geeigneten *in*

in vitro Modell um frühe Entwicklungsprozesse zu studieren. Desweiteren ist ihre Kultivierung nicht so aufwendig, wie die der ES-Zellen.

Bisher ist *gooseoid* nur als transkriptioneller Repressor charakterisiert worden. Sein Auftreten zum Startpunkt der Gastrulation geht einher mit der Bildung der ersten mesodermalen Zellen, die durch Delaminierung aus der epithelialen Zellschicht des frühen Mausembryos auswandern.

Die Zellen verlieren ihre Polarität, d.h. sowohl ihre apikale als auch ihre basale Seite ist nicht mehr sichtbar.

Bei diesem morphologischen Übergang wird die Zelle in ihrem Äußeren und in ihrer Struktur grundlegend umgestaltet. *gooseoid* könnte daher für die direkte oder indirekte Aktivierung wichtiger struktureller Proteine, wie z.B. den intermediären Filamenten, verantwortlich sein.

Materialien & Methoden

III. Materialien und Methoden

1. Feinchemikalien

Bezugsquellen

| | |
|--|--|
| Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30/0,8) | Roth (Karlsruhe) |
| Agarose (SeaKem LE) | Biozym (Hessisch Oldendorf) |
| Alpha-Medium (synthetisches Kulturmedium) | Gibco Life Technologies (Eggenstein) |
| Ammoniumperoxodisulfat | BioRad (München) |
| Ampicillin | Boehringer (Mannheim) |
| Bakterien-Petrischalen (9 cm) | Greiner Labortechnik (Nürtingen) |
| Bacto Agar | Difco (Detroit, MI, USA) |
| Bacto Hefeextrakt | Difco (Detroit, MI, USA) |
| Bacto Trypton | Difco (Detroit, MI, USA) |
| 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat | Roth (Karlsruhe) |
| Bromphenolblau | Serva (Heidelberg) |
| 2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphate | Boehringer (Mannheim) |
| N,N'-Dimethylformamid | Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen) |
| Dithiothreitol | Boehringer (Mannheim) |
| DMEM (synthetisches Kulturmedium) | Gibco Life Tech. (Eggenstein) |
| dNTP-Mix, ultrapure | Pharmacia (Freiburg) |
| Ethidiumbromid | Sigma (Deisenhofen) |
| Ficoll Typ 400 | Pharmacia (Freiburg) |
| Folin-Ciocalteus Phenolreagenz | Merck (Darmstadt) |
| Fötale Kälberserum (FCS) | Bio Whittaker (Verviers, Belgien) |
| Geneticin-Sulfat (G418) | Gibco Life Tech. (Eggenstein) |
| Glutamax I (L-Alanyl-Glutamin) 100 x | Gibco Life Tech. (Eggenstein) |
| Glycylglycin | Sigma (Deisenhofen) |
| Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid | Roth (Karlsruhe) |
| D-Luciferin | Sigma (Deisenhofen) |
| Lumineszens Detektionsfilm (Hyperfilm™-ECL) | Amersham-Buchler & Co KG (Braunschweig) |
| MEM non-essential Amino Acids 100 x | Gibco Life Tech. (Eggenstein) |

| | |
|---|---|
| 2-Mercaptoethanol (50 mM, für die Zellkultur) | Gibco Life Tech. (Eggenstein) |
| 3MM Whatman Papier | Whatman (Maidstone, UK) |
| 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS) | Roth (Karlsruhe) |
| N-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure (HEPES) | Roth (Karlsruhe) |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | BioRad (München) |
| Natriumpyruvat (100mM) | Gibco Life Tech. (Eggenstein) |
| Nonidet P40 | Boehringer (Mannheim) |
| Nukleosid-5'-Triphosphate | Boehringer (Mannheim) |
| Oligonukleotide | Birsner & Grob (Denzlingen) und MWG Biotech GmbH (Ebersberg) |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco Life Tech. (Eggenstein) |
| Ribonuklease A | Sigma (Deisenhofen) |
| Röntgenfilme (<i>HyperfilmTMMP</i>) | Amersham-Buchler & Co KG (Braunschweig) |
| Trypsin | Difco (Detroit, MI, USA) |
| tRNA (aus Hefe) | Sigma (Deisenhofen) |
| Tween 20 | Serva (Heidelberg) |
| Xylencyanol FF | Serva (Heidelberg) |
| Zellkulturartikel | Greiner (Nürtingen) |

Alle übrigen in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in analytischem Reinheitsgrad von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2. Radiochemikalien

$\alpha^{35}\text{S}$ -dATP (8 μCi , 660 Ci/mmol; >5000 Ci/mmol)

$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 mCi/ml; 3000 Ci/mmol)

$\alpha^{33}\text{P}$ -ddNTPs je 3 μM (450 $\mu\text{Ci/ml}$; 1500 Ci/mmol)

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham-Buchler (Braunschweig) bezogen.

3. Enzyme

| | |
|--|---|
| <u>Restriktionsendonukleasen:</u> | Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim) New England Biolabs GmbH (Schwalbach/Ts). Promega (Madison, WI, USA) United States Biochemicals (Cleveland, Ohio, USA) |
| <u>modifizierende Enzyme:</u> | |
| <i>Superscript II</i> RNase H ⁻ Reverse Transkriptase | Gibco Life Tech. (Eggenstein) |
| DNA-Polymerase I (<i>Klenow-Fragment</i>) | Promega (Madison, WI, USA) |
| <i>Pfu</i> -DNA Polymerase | Stratagene Europe (Amsterdam, NL) |
| Proteinase K | Merck (Darmstadt) |
| RNase A | Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen) |
| <i>Sequenase</i> (modifizierte Form) | United States Biochemicals (Cleveland, Ohio, USA) |
| ThermoCycling Sequenase | Amersham-Buchler, (Braunschweig) |
| T7-DNA-Polymerase | Promega (Madison, WI, USA) |
| T4 DNA Ligase | Promega (Madison, WI, USA) Boehringer (Mannheim) |
| T3 RNA Polymerase | Promega (Madison, WI, USA) |
| T7 RNA Polymerase | Promega (Madison, WI, USA) |
| <i>Taq</i> DNA Polymerase | Promega (Madison, WI, USA) Boehringer (Mannheim) |
| Trypsin | Gibco Life Tech. (Eggenstein) |

4. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg), oder Birsner & Grob-Biotech GmbH (Denzlingen) bezogen.

4.1 Oligonukleotid-Primer zur Klonierung von *gsc*-Fusions-Konstrukten:

hgfp_{gsc}

MS - 7 (5'-GGGGTGACCGCCACCATGGTGAGC-3'); 5'-Primer zur Modifizierung

des "humanized GFP"²⁶ zur Einführung einer *BstE* II (G'GTGACC)-Schnittstelle und einer Kozak²⁷-Consensus-Sequenz (G)CCGCCACCATGG; zusammen mit Primer MS-8 entstand ein 740 bp cDNA-Fragment.

MS- 8 (5'-GGGCATGCCCTTGTACAGCTCGTC-3'); 3'-Primer zur Modifizierung des "humanized GFP" zur Einführung einer *Sph* I (GCATG'C)-Schnittstelle als Fusionstelle mit *gsc* und Eliminierung des STOP-Codons.

MS- 9 (5'-GGGAATTCGGTGACCGCATGCCCGCCAGCATGTTTCAGC-3'); 5'-*gsc* Primer zur Einführung von Restriktionsschnittstellen *EcoR* I (G'AATTC), *BstE* II (G'GTGACC) und *Sph* I (GCATG'C) in die *gooseoid* -cDNA²⁸.

MS- 10 (5'-GGGAATTCTCAGCTGTCCGAGTCCAA-3'); 3'-*gsc* Primer zur Einführung einer *EcoR* I- (G'AATTC) Restriktionsschnittstelle.

Zur Synthese der *gsc*-cDNA unter der Verwendung der Primer MS-9, und -10 wurde dem PCR-Reaktionsansatz 10% DMSO hinzugefügt.

4.2 Oligonukleotid-Primer für die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR):

Den Sequenzen des Oligonukleotidpaars folgt die Größe des PCR-Produkts in Basenpaaren (bp) und die Annealingtemperatur in °C (t_a).

Brachyury

5'-T(MW)²⁹ (5'-TGCTGCCTGTGAGTCATAAC-3'),
3'-T(MS) (5'-CGCACATGGAGGAAAGTTCA-3') 343 bp; ($t_a = 55^\circ\text{C}$)

*chordin*³⁰

5'-chd (5'-GGGAGAAGGAGTGGTGCTGAGGAC-3'),
3'-chd (5'-CTCAGGGGTAGCAGGAATGGTGTG-3') 300 bp; ($t_a = 58^\circ\text{C}$)

gooseoid:

5'-*gsc*(MW) (5'-GTTCTGTACTGGTGTCTCCG-3'),
3'-*gsc*(MS) (5'-TCAGCTGTCCGAGTCCAAAT-3') 280 bp; ($t_a = 55^\circ\text{C}$)

²⁶ Genbank Accession-Number: U43284

²⁷ Kozak, M; 1987

²⁸ Genbank Accession-Number: M85271

²⁹ Sequenzen für die Oligonukleotide 5'-T(MW) und 5'-*gsc*(MW) wurden aus der Veröffentlichung von Johansson

et al. (1995) entnommen; die entsprechenden Antisense-Oligonukleotide wurden selbst entworfen.

³⁰ Sequenzen nach Daniel Bachiller, UCLA, USA; persönliche Mitteilung

Follistatin

5'-Follistatin (5'-ATAAGACAGAACTGAGCAAGGAAG-3'),
 3'-Follistatin (5'-GTCACACAGTAGGCATTATTGG-3') 359 bp; ($t_a = 56^\circ\text{C}$).

*GAPDH*³¹

5'-GAPDH (5'-TGTTCCAGTATGATTCTACCC-3'),
 3'-GAPDH (5'-CCATCCAC-AGTCTTCTGAG-3') 440 bp; ($t_a = 55^\circ\text{C}$)

HNF3 β ³²

5'-HNF3 β (5'-GCCTGAGCCGCGCTCGGGAC-3'),
 3'-HNF3 β (5'-GGTGCAGGGTCCAGAAGGAG-3') 260 bp; ($t_a = 65^\circ\text{C}$)

Otx2

5'-Otx2 (5'-GGAAACAGCGAAGGGAGAGG-3'),
 3'-Otx2 (5'-TGCTGCTGTTGGCGGCACTTAGC-3') 186 bp; ($t_a = 63^\circ\text{C}$).

Vimentin

5'-vim (5'-AAGAGATGGCTCGTCACCTTCG-3'),
 3'-vim (5'-CTGTCCATCTCTGGTCTCAACC-3') 279 bp; ($t_a = 59^\circ\text{C}$).

Dieses Fragment wurde, wie unter Methoden (2.5) beschrieben, kloniert zur Verwendung als cDNA-Sonde für Northern-Blot-Hybridisierungen.

4.3 Oligonukleotid-Primer für die PCR-Mutagenese von Deletionsmutanten des *T*-Promotors der Maus:

Folgende Oligonukleotide wurden mit dem 3'-Primer 3'-T-Pro: 5'-GAGAAAGCTTCCAGGA GTCTTGA CTCC -3' kombiniert: (Die Länge (in Basenpaaren, bp) und die Annealingtemperatur (t_a) der entsprechenden PCR-Reaktion sind nach der Sequenz angegeben.)

T Δ -499: 5'- GAGAGGATCCGCGGGGCAAAGT -3', 636 bp, ($t_a = 62^\circ\text{C}$);
 T Δ -403: 5'- GAGAGGATCCAGCCCCGGCTTCTCG -3', 535 bp, ($t_a = 63^\circ\text{C}$);
 T Δ -306: 5'- GAGAGGATCCGACGCTTTTCCTTACAGG -3', 441 bp, ($t_a = 63^\circ\text{C}$);

³¹ Aus der Sequenz für Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase mRNA der Ratte;
 Genbank Accession-Number: M17701

³² Nach Ang und Rossant (1994)

TΔ-199: 5'-GAGAGGATCCTCGGTACTTCAAAGGGT-3', 334 bp, ($t_a = 63^\circ\text{C}$);
 TΔ-103: 5'-GAGAGGATCCAGAGACTTACTCTTGTGC-3', 238 bp, ($t_a = 63^\circ\text{C}$);
 TΔ-11: 5'-GAGAGGATCCCGATCTCGGTGCTCCTT-3', 144 bp, ($t_a = 63^\circ\text{C}$).

4.4 Oligonukleotid-Primer für die Punktmutation im *Brachyury*-Promotor

Das betreffende TAAT-Element im Promotor wird gegen A C T G ausgetauscht.

5'-T-mutagen: 5'-TGTGCAGGGACCCAGGTGACTGCTTT-3'

3'-T-mutagen: 5'-AAAGCAGTCACCTGGGTCCCTGCACA-3'

4.5 Oligonukleotid-Primer für ein Minimal-*Brachyury*-Promotor Fragment

Die Oligonukleotide umfassen das TAAT-Element aus dem *Brachyury*-Promotor (Position +26 bis +49) der Maus an dem *gooseoid* binden soll, sowie dessen Mutante TGTT. Die Oligonukleotide wurden so entworfen, daß nach dem Annealing von Strang- und Gegenstrang Überhänge entstehen, die mit *Bam*H I- und *Hin*D III -Schnittstellen kompatibel sind. Die dadurch entstandenen doppelsträngigen DNA-Fragmente konnten somit direkt in den Vektor pT81luc kloniert werden.

5'-T-Pro TAAT 5'-GATCCGACCCAGGTGTAATCTTTGGGCTCA-3'

3'-T-Pro ATTA 5'-AGCTTGAGCCCAAAGATTACACCTGGGTCG-3'

5'-T-Pro_{mut} 5'-GATCCGACCCAGGTGTGTTCTTTGGGCTCA-3'

3'-T-Pro_{mut} 5'-AGCTTGAGCCCAAAGAACACACCTGGGTCG-3'

5. Bakterien und Zellen

E. Coli INFαF' *endA1*, *recA1*, *hsdR17*(r^{-k}, m^{+k}), *supE44*, λ⁻, *thi-1*
gyrA, *relA1*, φ80, *lacZαΔM15Δ(lacZYA-argF)*,
deoR+, F'.

E. coli XL1blue F⁻, L⁻, *recA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁻), *supE44*, *thi-1*,
gyrA96, *relA1*.

293 humane embryonale Nierenzelllinie

COS-7 Affennierenzellen, Fibroblasten

HeLa humane epitheloide Zervixkarzinomzelllinie

HM-1 embryonale Stammzelllinie der Maus (Magin *et al.*, 1992)

P19 murine Teratokarzinomzelllinie (McBurney, 1993)³³

6. Plasmide

| | |
|--------------------|---|
| pBlueskript II KS- | prokaryontischer Kloniervektor; Stratagene (Amsterdam, NL) |
| pcDNA3.1.+ | eukaryontischer Klonierungs- und Expressionsvektor; Invitrogen (Groningen, NL). |
| pGL2-UbiC | eukaryontischer Expressionsvektor, das Luziferase-Gen ist unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors exprimiert. ³⁴ |
| phGFP-S65T | eukaryontischer Expressionsvektor; der eine veränderte Form des <i>Aequorea victoria</i> grün fluoreszierenden Proteins (green fluorescent protein; GFP) enthält. Die Sequenz ist hinsichtlich der humanen Codon Verwendung und stärkerer Fluoreszenz optimiert. Die S65T Mutation führt zu einem "rotverschobenen Peak" bei 490 nm; Clontech (Heidelberg). ³⁵ |
| pRc/CMV | eukaryontischer Klonierungs- und Expressionsvektor; Invitrogen (Groningen, NL). |
| pT81luc | eukaryontischer Klonierungs- und Expressionsvektor zur Verwendung als Luziferase-Reporter. (Nordeen, 1988) |

7. Sonden für DNA- und RNA-Hybridisierungen

7.1 *Brachyury* (*T*; Maus)

1,2 kb *EcoR* I- Fragment aus dem Plasmid pmT (Herrmann *et al.*, 1990).

7.2 *gooseoid* (*gsc*; Maus)

Wegen des hohen GC-Gehalts der *gsc*-cDNA wurde eine 400 bp Sonde aus Exon 2 und 3 wie unter Kapitel 3, Abschnitt 2.6.2 (Methoden) beschrieben, hergestellt.

³³ Die P19-Zelllinie wurde von Dr. Hans Schöler (EMBL), Heidelberg zur Verfügung gestellt.

³⁴ pGL2-UbiC wurde freundlicherweise von Ute Herzer zur Verfügung gestellt. Er leitet sich vom pGL2-Vektor (Promega, Heidelberg) und enthält den Ubiquitin-Promotor als *Bgl* II/ *Hin*D III-Fragment.

³⁵ Genbank Accession Nr.: U 43284

7.3 E-Cadherin (Maus)

pKS-UM enthält die E-Cadherin cDNA der Maus im pBlueskript II KS-Vektor als 1,7 kb *EcoR* I-Fragment. Erhalten von Dr. Andreas Hecht, MPI Freiburg.

7.4 GAPDH (Ratte)

1,3 kb *Pst* I- Fragment aus dem Plasmid pGAPDH-13 (Fort *et al.*, 1985).

7.5 Lim-1 (Maus)

2,4 kb *EcoR* I-Fragment aus dem Plasmid pLME, erhalten von Dr. William Shawlot, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas USA.

7.6 Vimentin (Maus)

PCR-kloniertes 279 bps *EcoR* I-Fragment aus Plasmid pCRII™ (Invitrogen, Groningen NL).

8. Antikörper**8.1 Primärantikörper**

- Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen GFP; Clontech (Heidelberg).
- Monoklonaler Antikörper gegen das c-myc-Epitop (Klon 9E10); Erhalten von Dr. Herbert Steinbeisser, MPI Tübingen.
- Monoklonaler Antikörper gegen Vimentin (Klon VIM-13.2). Erworben bei Sigma (Deisenhofen).

8.2 Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen

- Polyklonales IgG aus der Ziege, gerichtet gegen Kaninchen-Immunglobuline, Meerrettichperoxidase-konjugiert (Dako, Glostrup, Dänemark).
- Polyklonales IgG aus der Ziege, gerichtet gegen Maus-Immunglobuline, Meerrettichperoxidase-konjugiert (Dako, Glostrup, Dänemark).

8.3 Sekundärantikörper für Immunohistochemie

- Biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark).

9. Wichtige Lösungen

Alle hier aufgeführten Lösungen sind im weiteren Text *kursiv* markiert.

- **Denhardt's Lösung (50x)** 1% (w/v) BSA; 1% (w/v) Ficoll™,
1% (w/v) Polyvinylpyrolidon
- **DNA-Probenpuffer (10x)** 100 mM EDTA, pH 8,0; 10% Glycerin;
1% SDS; 0,1% Bromphenolblau,
0,1% Xylencyanol
- **Laemmli-Puffer (2x)** 0,16 M Tris pH 6,8; 4% (w/v) SDS;
20% Glycerin; 4% β-Mercaptoethanol;
0,02% (w/v) Bromphenolblau
- **LB-Medium (Selektionsmedium)**
LB-Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt,
1% (w/v) NaCl
Selektionsmedium: LB + 100 µg/ml Ampicillin
- **MOPS-Puffer (1x)**
Laufpuffer für RNA-Gele 20 mM MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfon-
säure); 2,5 mM Natriumacetat; 0,5 mM EDTA;
pH 7
- **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)**
PBS: 137 mM NaCl; 6,5 mM Na₂HPO₄;
1,5 mM KH₂PO₄; 0,7 mM CaCl₂; 3 mM KCl;
0,6 mM MgCl₂
PBS (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei): 137 mM NaCl; 6,5 mM Na₂HPO₄;
1,5 mM KH₂PO₄; 3 mM KCl

- SOB und SOC-Medium

SOB: 2% Bacto-Trypton; 0,5% Bacto-Hefe Extrakt;
10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂;
10 mM MgSO₄

SOC: SOB + 20 mM Glucose

- SSC (10x) 1,5 M NaCl; 0,15 M Na-Citrat; pH 6,7

- Stopplösung (Probenpuffer für Sequenzierung)

98% deionisiertes Formamid; 20 mM EDTA;
0,03% Xylencyanol; 0,03% Bromphenolblau

- TBE (1x)

Laufpuffer für DNA-Gele 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA;
pH 8,3

- TE-Puffer 50 mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH 8,0

10. EDV-Sequenzanalysen

Die computergestützten Sequenzanalysen wurden auf einer DEC AlphaServer 800-Workstation mit dem Wisconsin Package (Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc, USA) durchgeführt.

Vergleiche zwischen zwei Sequenzen wurden mit den Subprogrammen GAP und BESTFIT (Needleman und Wunsch 1970; Smith und Waterman, 1981) durchgeführt.

Eine Sequenz wurde mit einer Gruppe von Sequenzen (z.B. der EMBL-Genbank) auf Homologien hin mit dem Subprogramm FASTA (Pearson und Lipman, 1988; Pearson, 1990) verglichen.

Restriktionsverdau von DNA-Sequenzen wurden entweder mit dem Subprogramm MAP oder mit der Software "GeneJockey" (BIOSOFT, Cambridge, UK) simuliert.

Die homologen Bereiche zwischen dem *Xenopus*- und dem Maus-*Brachyury*-Promotor (siehe *Abbildung 4-14*) wurden mit dem Subprogramm SIMILARITY der HUSAR-Datenbank (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de:8080/>) identifiziert. Die Charakterisierung dieser Bereiche als potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren erfolgte z.T. mit der TRANSFAC Database (Heinemeyer *et al.*, 1999; <http://transfac.gbf.de/>).

Methoden

Falls nicht anders vermerkt wurden die Arbeitsprotokolle der Methodensammlung von Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1991) entnommen.

1. Allgemeine Arbeitsmethoden

1.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messen ihrer Extinktion (E) bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Eine E_{260} von 1 entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA oder 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotide. Der Wert für die E bei 280 nm ist ein Maß für die Verunreinigung der Nukleinsäurelösung mit Proteinen, da die aromatischen Aminosäuren in diesem Wellenlängenbereich die Strahlung absorbieren. Das Verhältnis E_{260}/E_{280} sollte bei doppelsträngiger DNA 1,8 und bei RNA 2 betragen.

1.2 Extraktion von Nukleinsäuren

Zur Trennung der Nukleinsäuren von Proteinen wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt, kräftig gemischt und abzentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) extrahiert.

1.3 Fällung von Nukleinsäuren

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol versetzt. Das Präzipitat wurde nach 30 minütiger Inkubation bei -20°C für 20 min bei 10000 x g zentrifugiert, mit 80% Ethanol gewaschen und anschließend für 10 min luftgetrocknet.

Bei der Präparation großer Mengen Plasmid-DNA wurde die Ethanolfällung durch eine Isopropanolfällung ersetzt. Zur wäßrigen DNA-haltigen Lösung wurden bei Raumtemperatur 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben, gemischt und der Niederschlag sofort abzentrifugiert.

1.4 Amplifikation von cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Mit Hilfe von geeigneten Oligonukleotid-Primern wurde mittels PCR aus einem cDNA-Syntheseansatz eines Plasmids oder genomischer DNA ein bestimmtes cDNA Fragment amplifiziert. Hierzu wurden 1-4 µl DNA Template (ca. 1-100 ng) zusammen mit 10 µl 10 x *Taq*-Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0 bei Raumtemperatur), je 10 pmol der beiden Oligonukleotid-Primer, 0,2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und 5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Pharmacia, Freiburg) in einem Gesamtvolumen von 25 µl in einen Thermocycler (*MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler*, Watertown, Mass., U.S.A.) gegeben.

Die PCR erfolgte in 30 Zyklen mit folgenden Reaktionsbedingungen: 30 s, 94°C (Denaturierung); 1 min, 55°C (Primerannealing); 1 min, 72°C (Synthese).

Die Variationen dieses Protokolls werden an entsprechender Stelle genannt. Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und das cDNA-Fragment isoliert.

Zur Klonierung von Fusionskonstrukten wurden Oligonukleotid-Primer entworfen, die geeignete Restriktionsschnittstellen 5'- und 3' der Zielsequenz hinzufügten. Durch die Verwendung von *Pfu*-Polymerase (Stratagene) konnten bei PCR-Reaktionen die typischen Lese- und Synthesefehler der *Taq*-DNA-Polymerase vermieden werden (10 x *Pfu*-Puffer; Zusammen-setzung: 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100, 1mg/ml BSA, 200 mM Tris-HCl, pH 8,75). Die optimale Arbeitstemperatur der *Pfu*-Polymerase bei der Synthese betrug 75°C.

2. Klonierungstechniken

2.1 Fragmentierung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Eine Einheit (U) einer Restriktionsendonuklease ist definiert als diejenige Menge an Enzym, die 1 µg DNA des Phagen Lambda in einer Stunde bei der jeweiligen optimalen Reaktionstemperatur verdauen kann. In der Regel wurde ein 2-3 facher Überschuß an Enzymeinheiten verwendet, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das zehnfache des Volumens der Enzym-Stocklösung. Die Inkubationstemperatur war abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym; die Inkubationszeit betrug zwei bis vier Stunden bis über Nacht.

Nach der Zugabe von 10 x Ladepuffer wurden die Fragmente analytisch oder zur Reinigung in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

2.2.1 Agarosegel

Agarose ist ein langkettiges Polysaccharid mit repetitiven Untereinheiten aus 1, 3-verknüpfter β-D-Galactopyranose und 1, 4-verknüpfter 3,6-Anhydro-α-L-Galactopyranose. Jede Agarosekette besteht aus rund 400 dieser Untereinheiten und hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 120 kD. Das Rohmaterial für Agarose wird aus Meeresalgen gewonnen und enthält zunächst eine Vielzahl anderer Polysaccharide, Sulfate und Proteine, deren erfolgreiche Entfernung entscheidend für die Qualität der Agarose ist.

0,8-1,5% Agarose Typ II wurde in 50 ml 1 x TBE durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst und nach Zugabe von 0,3 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) in eine horizontale Elektrophoresekammer (7,5 x 13,5 cm) gegossen. Mit Hilfe eines Kammes wurden Taschen zum Auftragen der Proben ausgespart. Nach dem Gelieren der Agarose, dem Entfernen des Kammes und dem Auffüllen der Kammer mit Laufpuffer (1 x TBE) wurden die DNA-Proben nach Zugabe von 10 x DNA-Probenpuffer in die Taschen des Gels gegeben. Die Auftrennung erfolgte bei 50-150 V. Die Fragmente wurden bei UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.2 Polyacrylamidgel

6-10%-ige Polyacrylamidgele wurden aus einer Stammlösung mit 30 Gewichtsprozent Acrylamid und 0,8 Gewichtsprozent N,N'-Methylenbisacrylamid in 1 x TBE hergestellt. Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 1% Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 0,1% N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) zwischen zwei durch 2 mm breite Abstandhalter getrennten Glasplatten (14 x 15 cm). Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 10 x Probenpuffer aufgenommen. Die Auftrennung erfolgte für ca. 1,5 h bei 150 V. Nach der Auftrennung der Proben wurden die Gele für 10 min in einer wäßrigen

EtBr-Lösung (1 µg/ml) gefärbt, die DNA-Fragmente auf einem UV-Lichtkasten sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.3 Auftrennung der Reaktionsprodukte unter denaturierenden Bedingungen (Sequenzierung)

Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 3 µl *Stopplösung* gelöst, 5 min bei 85°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und sofort auf ein Gel aufgetragen. Das Gel bestand aus 6% Acrylamid-Bisacrylamid (30:0,8) und 8 M Harnstoff in 90 mM Tris-HCl, pH 8,3; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA. 30 ml dieser Lösung wurden mit 0,1% TEMED und 0,1% APS zwischen zwei Glasplatten (20 x 40 cm) mit 0,15 mm dicken Abstandhaltern polymerisiert. Der Vorlauf des Gels erfolgte für 30 min bei 1800 V. Anschließend wurden die Proben aufgetragen und zwischen 1,5 und 4 h bei 2000 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde *1 x TBE* verwendet. Nach dem Lauf wurde eine Glasplatte abgehoben und das Gel auf ein Whatman Filterpapier aufgezogen. Das Gel wurde auf dem Filter mit einem Vakuumtrockner bei 80°C für zwei Stunden getrocknet und schließlich auf einem Amersham Hyperfilm MP über Nacht (ÜN) exponiert.

2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Diese Methode erlaubt die Isolierung einer DNA-Bande direkt aus einem Agarosegel. Die ausgeschnittene Bande wird durch die Zugabe einer chaotropischen Salzlösung in Lösung gebracht. Die enthaltene DNA kann an zugegebene Milchglasbeads adsorbiert werden. Durch nachfolgende Waschschritte und Elution kann die DNA aufgereinigt in einem kleinen Volumen erhalten werden.

Die jeweils gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten, mit dem viereinhalbfachen Volumen SALT-Puffer und dem halben Volumen MELT-Puffer (EASYPURE DNA Purification Kit, Biozym) versetzt und gemäß den Herstellerangaben weiter aufbereitet.

Die Lösung des gereinigten DNA-Fragments wurde bei -20°C gelagert.

2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von Fragment zu Vektor gleich 3:1 zusammengegeben und mit 2 U T4 DNA-Ligase in 30 µl 50 mM Tris-HCl,

pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 0,1 mg/ml BSA und 1 mM ATP für mindestens 12 h bei 15°C inkubiert.

2.5 TA-Klonierung®

Die Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte unter Verwendung des TA-Cloning® Kits (Invitrogen, Groningen, NL). Dabei wurde die Tatsache genutzt, daß die *Taq*-Polymerase während der Extensionszeit (bei 72°C) der PCR-Reaktion zusätzlich ein Nukleotid A an das Reaktionsprodukt anfügt. Das Fragment kann in einen Vektor (pCR™2.1 oder pCRII™) kloniert werden, der an seinem 5'- und 3'-Ende einzelne T-Überhänge besitzt.

Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Zur Transformation wurde der Bakterienstamm *E. Coli* INFαF' verwendet.

2.6 Radioaktive Markierung von DNA

2.6.1 Herstellung von Hybridisierungsproben durch Einbau von [α-³²P] dCTP

Zur Herstellung von Hybridisierungsproben wurde das käuflich erworbene System der Firma Amersham (ReadiPrime™ Kit) verwendet. Zur denaturierten, einzelsträngigen DNA wird unter Verwendung von dem *Klenow*-Fragment der DNA-Polymerase der Gegenstrang synthetisiert. Enthält der Nukleotid-Mix ein radioaktiv markiertes Nukleotid (z.B. [α-³²P] dCTP), so wird es von dem Enzym in die DNA eingebaut.

Die Reaktionen wurden gemäß der Herstellerangaben unter Verwendung von 20 bis 100 ng DNA und 5 µl [α-³²P] dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol) durchgeführt. Die Reaktionsdauer betrug dabei zwischen 30 und 60 min. Der Reaktionsansatz wurde direkt vor der Hybridisierung für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Die denaturierte DNA konnte dann zur Hybridisierung verwendet werden.

2.6.2 Einbau von [α-³²P] dCTP durch die Polymerasekettenreaktion

Zur Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden wurde zu einem Standard PCR-Ansatz (siehe 1.4) 2 µCi ³²P-dCTP gegeben.

2.7 Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien (nach Hanahan, 1983)

100 ml *SOB-Medium* wurden mit 1 ml einer ÜN-Kultur *E. coli* Bakterien (*E. coli* XL 1blue) inokuliert und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 inkubiert. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 4°C mit 2000 x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde vorsichtig in 20 ml Standardtransformationspuffer (STB: 100 mM KCl; 45 mM MnCl₂; 10 mM CaCl₂; 3 mM CoCl₃; 0,5 M K-MES, pH 6,3; 15% Glycerol) resuspendiert und 15-20 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut 10 min bei 4°C mit 2000 x g zentrifugiert und auf Eis vorsichtig in 4 ml STB resuspendiert. Die nun kompetenten Bakterien wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren oder sofort zur Transformation verwendet.

Zu 100 µl kompetenter Bakterien wurden 2 ng Plasmid-DNA bzw. 5 µl Ligationsansatz gegeben, vorsichtig gemischt und 30-60 min in Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 90 s ein Hitzeschock bei 42°C. Nach Zugabe von 3 ml *SOC-Medium* wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert und anschließend in verschiedenen Verdünnungen auf ampicillinhaltige Agarplatten (100 µg/ml) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37°C im Brutschrank.

2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus rekombinanten Bakterien

2.8.1 Identifizierung positiver Kolonien mittels PCR

Unter der Voraussetzung, daß für den Nachweis der klonierten cDNA-Fragmente geeignete Oligonukleotide vorhanden sind, konnten schnell positive Bakterienkolonien identifiziert werden.

Dazu wurden Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in eine 96well-Mikrotiterplatte überführt, in der jeweils 100 µl *Selektionsmedium* mit 100 µg/ml Ampicillin vorgelegt war. Die Platte wurde bei 37°C für 2-3 Stunden geschüttelt. 4 µl jeder Kultur wurden entnommen und in einem Thermocycler 5 min bei 100°C aufgeknackt. Zu jedem Gefäß wurde bereits angesetzter PCR-Mix mit den entsprechenden Oligonukleotiden hinzugegeben. Die PCR-Reaktionen liefen den Eigenschaften der Primer entsprechend, wie unter Abschnitt 1.4 beschrieben, ab. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Reaktionsprodukte mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt, das zu klonierende cDNA-Produkt enthaltende Kolonien identifiziert und anschließend als 250 ml-Übernacht-Kultur angesetzt um direkt eine Plasmidpräparation im großen Maßstab (2.8.3) durchzuführen.

2.8.2 Präparation im kleinen Maßstab ("Minipräp")

Bakterien werden durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die enthaltene Plasmid-DNA durch Extraktion mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Gemisch extrahiert. Bakterienklone von Selektiv-Agarplatten wurden in 3 ml *Selektionsmedium* mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml dieser Kultur wurden 10 min bei 5000 x g zentrifugiert, das Pellet in 100 µl Lösung A (50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 2,5 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lösung B (0,2 M NaOH; 1% SDS) zugegeben. Durch mehrmaliges Kippen wurden die Proben gemischt und anschließend 150 µl Lösung C (3 M Kaliumacetat, pH 5) zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach erneuter Inkubation für 15 min auf Eis wurden die Zelltrümmer und die chromosomale DNA 10 min bei 4°C mit 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die enthaltene Plasmid-DNA, wie unter Abschnitt 1.2 beschrieben, extrahiert. Die wäßrige Phase wurde sorgfältig abgenommen (ca. 400 µl) und mit 1 ml Ethanol für 5 min bei -20°C gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 10000 x g wurde das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 50 µl *TE-Puffer* resuspendiert und jeweils 4 µl für einen analytischen Restriktionsverdau verwendet.

2.8.3 Präparation im großen Maßstab ("Maxipräp")

Die Plasmidpräparation erfolgte durch Säulenreinigung mit Qiagen-tips 500 (Qiagen, Hilden) oder mit Nukleobond AX-500 (Macherey & Nagel, Düren). Zunächst werden die Bakterien durch Zentrifugation in ihrem Volumen eingeeengt und in isotonischem Puffer resuspendiert. Anschließend werden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Dieser Schritt muß vorsichtig und darf nicht länger als fünf Minuten durchgeführt werden, da sonst die chromosomale Bakterien-DNA ebenfalls isoliert wird. Durch Zugabe von Kaliumacetat-Lösung werden Zelltrümmer zusammen mit der chromosomalen DNA ausgefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt. Die DNA-Aufreinigung aus dieser Lösung erfolgt durch Adsorption an das Säulenmaterial, einem Waschschrift und der abschließenden Elution der DNA durch Erhöhung von pH-Wert und Salzgehalt der Lösungen.

250 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in *Selektionsmedium* wurden 15 min bei 5000 x g zentrifugiert, das Bakterien-Pellet wurde in 10 ml Puffer 1 (100 µg/ml RNase A; 50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH; 1% SDS) zugegeben und nach vorsichtigem Mischen max. 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Puffer 3 (2,55 M KAc, pH 4,8) wurde die Suspension kurz gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und bei 16000 x g zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde die Säule mit 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 0,15% Ethanol; 0,15% Triton X-100) äquilibriert. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde zum Durchtropfen auf die Säule geladen, dabei bindet die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial. Anschließend wurde die

Säule mit 30 ml Puffer QC (1,0 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Ethanol) gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 8,2; 15% Ethanol) von der Säule eluiert, mit 12 ml 2-Propanol gefällt und sofort für 30 min bei 4°C und 16000 x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und an der Luft für max. 10 min getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 300 µl *TE-Puffer* resuspendiert und die Konzentration, wie im Abschnitt 1.1 (Materialien) beschrieben, bestimmt.

Erfahrungsgemäß ergaben 300 ml ÜNK ca. 800 µg reines Plasmid. Durch Auffangen der Waschlösung und einem anschließendem Auftragen auf die Säule (nach vorheriger Regeneration) konnte bei sog. "high-copy" -Plasmiden die Ausbeute verdoppelt werden.

2.9 Isolierung von polyadenylierter (Poly-A⁺)-RNA aus Zellen

Die Isolierung von Poly-A⁺-RNA beruht auf Bindung an dT-Oligomeren, die an Zellulose-Beads gebunden sind. Nach mehreren Waschschritten und abschließender Elution kann die mRNA nach Zugabe von LiCl und Ethanol gefällt werden.

Die Zellen wurden mit eiskaltem *PBS* zweimal gewaschen und in 10 ml STE (100 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM EDTA; 0,5% SDS; 300 µg/ml Proteinase K) durch Abschaben geerntet. Die genomische DNA der Zellen wurde 30 s mit einem Ultra Turrax™ geschert. Anschließend wurde die Suspension 30 min bei 37°C inkubiert, mit 5 M NaCl-Lösung eine Endkonzentration von 0,5 M NaCl in der Suspension eingestellt, 100 mg Oligo-dT-Zellulose in HSB (300 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA; 0,1% SDS) zugegeben und ÜN unter ständigem Schütteln bei RT inkubiert. Dann wurde die Oligo-dT-Zellulose durch Zentrifugation (1000 x g, 20°C, 2 min) pelletiert, der Überstand abgenommen und die Oligo-dT-Zellulose fünfmal mit HSB gewaschen. Nach dem letzten Waschschriff wurde die Elution, der an die Oligo-dT-Zellulose gebundenen RNAs durchgeführt. Dazu wurde die pelletierte Oligo-dT-Zellulose viermal in je 1 ml H₂O eluiert, erneut pelletiert und anschließend jeweils 950 µl des Überstandes abgenommen und gesammelt. Um eventuell in dem Eluat noch vorhandene Oligo-dT-Zellulose zu entfernen, wurde das Eluat mit 2000 x g, bei 4°C, 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Von dem Überstand wurden 300 µl zur spektralphoto-metrischen Bestimmung der RNA-Konzentration entnommen. Der verbleibende Überstand wurde mit 4 M LiCl-Lösung und mit dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol versetzt. Die Fällung der RNA erfolgte bei -20°C für mindestens 30 min. Anschließend wurde die RNA bei 10000 x g und 4°C für 45 min zentrifugiert, das Pellet im Vakuum getrocknet und in H₂O resuspendiert.

2.10 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen (Chromczynski *et al.*, 1987)

Die Isolierung von Gesamt-RNA beruht auf dem schnellen Aufschluß von Zellen durch Guanidinthiocyanat und der Extraktion durch Phenol/Chloroform. Dabei wurde das peqGOLD TriPure™-Reagenz (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet.

Die Zellen einer 15 cm Gewebekulturschale wurden nach Absaugen des Kulturmediums mit 3 ml peqGOLD TriPure™-Reagenz aufgeschlossen. Das entstehende zähflüssige Zelllysate wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten, wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl Chloroform wurden die Proben 15 s kräftig geschüttelt und anschließend 5 min bei RT stehen gelassen. Die Zentrifugation für 5 min bei 12 000 x g führte zur Trennung der Probe in zwei Phasen. Die RNA war in der oberen, wäßrigen Phase angereichert. Nach der Überführung dieser Phase in ein frisches Röhrchen erfolgte die Präzipitation der RNA durch Zugabe von 3 ml Isopropanol für 60 min bei -20°C. Anschließend wurde die RNA 15 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Präzipitat mit Ethanol (80%) gewaschen und 15 min an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das Präzipitat in 100 µl Wasser (DEPC) gelöst und photometrisch (bei 260 nm) die Konzentration der RNA-Lösung bestimmt.

2.11 Sequenzierung doppelsträngiger DNA (Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierungsreaktion wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode mit dem *Sequenase-Kit* (United Biochemical Cooperation; USB) durchgeführt. 3 µg DNA wurden bei RT für 5 min in 20 µl 0,2 M NaOH; 0,2 mM EDTA denaturiert, anschließend mit 2 µl 2 M NH₄-Acetat, pH 4,6 neutralisiert und bei -80°C mit Ethanol gefällt. Nach 5 min wurde die DNA für 10 min bei 7000 x g zentrifugiert, mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 7 µl H₂O resuspendiert. Zur Hybridisierung des Primers wurden 7 µl DNA-Lösung mit 2 µl 5 x Sequenase-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 250 mM NaCl) und 1 µl Primer (1 pmol/µl) gemischt und für 3 min auf 65°C erhitzt. Das Abkühlen erfolgte langsam bei RT für ca. 30 min. Währenddessen wurden vier Eppendorf-Reaktionsgefäße mit jeweils 2,5 µl der entsprechenden Terminationsmischungen (didesoxy-(dd)GTP; ddATP; ddTTP; ddCTP)* vorbereitet und auf 37°C vorgewärmt. Für die Markierungsreaktion wurden zu den 10 µl Hybridisierungslösung 1 µl 0,1 M DTT; 2 µl 1:5 verdünnte Markierungsmischung (Endkonzentration: 1,5 µM dGTP; 1,5 µM dCTP; 1,5 µM dTTP); 1 µl ³⁵S-dATP (Amersham, 8 µCi, 660 Ci/mmol) und 2 µl 1:8 mit *TE-Puffer* verdünnte Sequenase gegeben.

Nach 5 min bei 37°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von jeweils 4 µl einer *Stoplösung* abgebrochen. Diese *Stoplösung* diente gleichzeitig als Gelladepuffer für die Auftrennung der Reaktionsprodukte. Die Proben wurden für 3 min bei 90°C denaturiert und nach Abschrecken

auf Eis auf einem denaturierenden 6% Polyacrylamidgel bei 1500 V in $1 \times TBE$ aufgetrennt (siehe 2.2.3). Die Autoradiographie erfolgte mit einem Amersham Hyperfilm MP.

*Die Terminations-Mischungen enthalten:

ddGTP-Mix: 80 μM dGTP; 80 μM dATP; 80 μM dCTP; 80 μM dTTP; 8 μM ddGTP;
50 mM NaCl

ddATP-Mix: 80 μM dGTP; 80 μM dATP; 80 μM dCTP; 80 μM dTTP; 8 μM ddATP;
50 mM NaCl

ddCTP-Mix: 80 μM dGTP; 80 μM dATP; 80 μM dCTP; 80 μM dTTP; 8 μM ddCTP;
50 mM NaCl

ddTTP-Mix: 80 μM dGTP; 80 μM dATP; 80 μM dCTP; 80 μM dTTP; 8 μM ddTTP;
50 mM NaCl

2.12 Zyklische Sequenzierung mit ThermoSequenase™

Die Methode der zyklischen Sequenzierung, die ebenfalls auf der Kettenabbruchmethode beruht, macht Gebrauch von sich wiederholenden Zyklen der Hitzedenaturierung, Primerannealing und Polymerisierung um größere Mengen an DNA-Sequenzierungsprodukten zu bekommen. Im Gegensatz zur PCR verwendet dieser Reaktionsansatz nur einen Primer, so daß die Menge an Produkt linear und nicht exponentiell zunimmt. In dem ThermoSequenase Cycle Sequencing Kit™ (Amersham) sind die radioaktiv markierten ($\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ -) Didesoxynukleotide optimal auf die hitzestabile DNA-Polymerase abgestimmt. Für die Reaktion in einem Volumen von 20 μl werden 2 μg Plasmid mit 2 μl 10 x Reaktionspuffer (260 mM Tris-HCl, pH 9,5; 65 mM MgCl_2), 2 pmol Sequenzierprimer und 8 U ThermoSequenase-Polymerase zusammenpipettiert. Anschließend wurden 4 PCR-Reaktionsgefäße mit jeweils 2 μl Nukleotidmastermix (7,5 μM dATP, dGTP, dCTP und dTTP) vorgelegt. Jedes der Tubes bekam 0,5 μl eines anderen radioaktiv markierten ($\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ -) Didesoxynukleotids ($\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ -ddATP, $\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ -ddGTP, $\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ -ddCTP oder $\alpha\text{-}^{33}\text{P}$ -ddTTP). Zu diesen vier verschiedenen Terminierungsgemischen wurden je 4,5 μl des Reaktionsansatzes gegeben. Die Proben wurden in einen Thermocycler (*MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler*, Watertown, Mass., USA) gestellt und die Reaktion lief unter folgendem Programm: Ein erster Denaturierungsschritt erfolgte bei 95°C, gefolgt von 95°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 60 s für 50 Zyklen. Danach wurde die Reaktion mit Zugabe von je 4 μl *Stoplösung* beendet. Um sicherzustellen, daß ausschließlich einzelsträngige DNA auf dem Sequenziergel (Abschnitt 2.2.3) aufgetrennt wurde, mußten die Proben bei 80°C für 10 min erhitzt werden.

3. Zellkultur

Alle eukaryontischen Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Heraeus, Stuttgart) in befeuchteter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in Zellkulturschalen (PS) oder -flaschen kultiviert. Sämtliche Arbeitsschritte mit Zelllinien erfolgten an einer Sterilbank (Glatt AG). Medien, Puffer und Glaswaren für die Zellkultur wurden vor Gebrauch sterilisiert (120°C, 1,4 bar, 20 min).

3.1 Kulturmedien

Die COS 7-, Hela- und 293-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) bei 37°C und 6% CO₂ kultiviert.

Die embryonale Stammzelllinie HM-1 wurde in DMEM (4500 mg/l Glukose) mit 15% FCS, 0,075% Natriumbicarbonat, 1 mM Natriumpyruvat, Glutamax I 100 x (5 ml auf 500 ml Kulturmedium), MEM non-essential Aminoacids 100 x (5 ml auf 500 ml Kulturmedium), 0,1 mM 2-Mercaptoethanol und LIF³⁶-konditioniertem Medium (2 ml/500ml DMEM) kultiviert.

Die Teratokarzinomzelllinie P19 wurde in MEMalpha Medium, 10% FCS, 1% Glutamax I, 1% MEM non-essential Aminoacids und mit 1% Antibiotika (Penicilin/Streptomycin) kultiviert.

Stabil transfizierte Zellen (siehe 3.3.2) wurden in ihrem entsprechenden Medium + 0,3 mg/ml G418 kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt, und die Zellen wurden bei Erreichen von 80% Konfluenz trypsiniert (siehe 3.2) und zur weiteren Kultivierung 1:5 (1:12 bei P19) verdünnt.

HM-1- und P19-Zellen, sowie deren Klone wurden auf Schalen kultiviert, die mindestens 20 min mit einer 0,2% Gelatine-Lösung in *PBS* beschichtet wurden. Kurz vor Gebrauch der Schalen wurde die Gelatine-Lösung abgesaugt und verworfen.

3.2 Routinebehandlung von Zellen

3.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden trypsiniert, bei 500 x g zentrifugiert und in FCS und 10% DMSO aufgenommen (5 x 10⁶ Zellen/ml). Die Zellsuspension wurde 30 min in Eis inkubiert, dann in einem Styroporbehälter 12-14 h bei -80°C langsam eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

³⁶ LIF: *Leukemia Inhibitory Factor*, siehe auch 3.2.3

Im Wasserbad, das eine Temperatur von 37°C hatte, wurden die Zellen rasch aufgetaut und in vorgewärmtes Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bei 500 x g pelletiert, der Überstand verworfen, in Kulturmedium resuspendiert und ausplattiert.

3.2.2 Trypsinbehandlung

Das Kulturmedium wurde abgenommen, die Zellen einmal mit 10 ml *PBS* gewaschen und mit 1 ml 0,25% Trypsin pro 10 cm-PS inkubiert, bis die Zellen deutlich ihre Anheftung verloren. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen, gezählt und in gewünschter Dichte ausgesät. HM-1 Zellen wurden mit ATV-TVP-Trypsin³⁷ behandelt. P19 Zellen wurden am Vortag vor transienten Transfektionen (siehe auch 3.3.1 und 3.3.2) mit 0,25% Trypsin 10 min bei 37°C inkubiert, um eine komplette Abtrennung und Vereinzelung der Zellen von der Gelatinematrix am Schalenboden zu erreichen.

3.2.3 Herstellung von LIF-konditioniertem Medium

Der *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) ist ein Protein, das die mesodermale Differenzierung von ES-Zellen unterbinden kann. Um spontane Differenzierungen von ES-Zellkulturen zu vermeiden ist es unerlässlich, dem Medium LIF zuzugeben. Dies kann in Form von rekombinantem Protein oder konditioniertem Medium geschehen. Der COS-7 Klon LIF α -5 produziert LIF und gibt dieses an das Medium ab. Die Zellen werden in alpha-MEM Medium (ohne dNTPs) mit 10% FCS und 1 mM Glutamin kultiviert und einmal pro Woche 1:20 gesplittet.

Zum Ernten des Überstandes wurden konfluente Zellen trypsinisiert und im frischen Medium mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml ausgesät. Der Überstand wurde nach 48 Stunden abgenommen und filtriert (0,2 μ m; Schleicher & Schuell). Das LIF-konditionierte Medium wurde in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt.

3.3 Transfektionen

3.3.1 Calcium-Phosphat-Methode

³⁷ hauseigene Rezeptur, nach H. Schorle

Zur Transfektion wurde eine modifizierte Form der Calciumphosphat-Copräzipitationsmethode (Graham und van der Eb, 1973) angewendet.

Die Calcium-Phosphat-Methode beruht auf der Aufnahme eines Präzipitats aus DNA und Calciumphosphat durch die Zellen.

Am Vortag wurden 8×10^5 Zellen pro 10 cm-PS ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

Das Präzipitat, das für eine Schale von Zellen je einem Transfektionsansatz benötigt wurde, wurde wie folgt angesetzt: die DNA wurde in insgesamt 250 μl H_2O gegeben, dann wurden 250 μl 2 x HBS (50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 1,6 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.05) untergemischt und schließlich tropfenweise 25 μl 2,5 M CaCl_2 -Lösung zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend 4-6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und schließlich frisches Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden nach 40-48 Stunden geerntet, um den Luziferase-Aktivitätstest (4.1) durchzuführen.

3.3.2 SuperFect-Methode™

Das SuperFect™-Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden) ist ein spezifisch gestaltetes Dendrimer. An seinen Enden befinden sich geladene Aminogruppen. Mit DNA bildet das SuperFect™-Reagenz eine kompakte Struktur, die die Aufnahme in Zellen begünstigt. Die positive Ladung des SuperFect™-DNA-Komplexes erlaubt die Bindung an negativ geladene Rezeptoren (z.B. sialylierte Glykoproteine) an der Oberfläche eukaryotischer Zellen.

Am Vortag der Transfektion wurden 2×10^5 Zellen pro Schale einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden 4 μg DNA-Mix mit serum- und antibiotikafreiem-Medium auf ein Gesamtvolumen von 100 μl aufgefüllt. Nach Zugabe von 20 μl SuperFect™-Reagenz entstand der SuperFect™-DNA-Komplex innerhalb von 10 min. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, der Komplex mit 600 μl Medium gemischt und auf die Zellen verteilt.

Nach einer zweistündigen Inkubation im Brutschrank wurde der Komplex entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und schließlich frisches Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden nach 40-48 Stunden geerntet, um den Luziferase-Aktivitätstest durchzuführen.

3.3.3 Stabile Transfektionen (Elektroporation, Eul *et al.*, 1989)

Durch diese Transfektionsmethode kann Plasmid-DNA effizient in Zellen eingebracht werden; durch kurzes Anlegen einer Spannung an eine mit Zellsuspension gefüllte Elektrodenküvette werden kurzfristig die Oberflächenladungen der Zellen umgekehrt, was zu einem Aufreißen

der Zellporen führt. Dabei strömt neben der DNA auch Puffer in die Zellen. Durch den nachfolgenden Kälteschock ziehen sich die Öffnungen wieder zusammen.

Alle Lösungen für die Elektroporation wurden auf 37°C vorgewärmt. Für die Elektroporation wurden die Zellen trypsiniert, in normalen Medium aufgenommen, bei 400 x g zentrifugiert und in Medium (ohne Antibiotika) aufgenommen und gezählt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in berechnetem Volumen (200 µl/Ansatz) und bestimmter Anzahl (2 x 10⁷ Zellen/ Ansatz) wieder aufgenommen, in je 200 µl Zellsuspension in 0,2 cm Elektroporationsküvetten verteilt, den Ansätzen wurde je 20 µg des entsprechenden Expressionsplasmid zugegeben, und die Küvetten auf Eis gestellt. Nach etwa 5 min wurde mit dem *Bio-Rad Genepulser*-Apparat (Bio-Rad, München) bei 240 Volt und 500 µF elektroporiert. Die Küvetten wurden danach sofort kurz geschüttelt um den auftretenden pH-Gradienten zu vermeiden. Die Zellen blieben noch 5 min auf Eis und wurden dann im entsprechenden Kulturmedium auf je 6 Petrischalen verteilt. Nach 24 h wurde den Zellen frisches Medium gegeben. Weitere 24 Stunden später wurde zu Selektionsmedium gewechselt; Kulturmedium dem zusätzlich das Antibiotikum G418 in einer Konzentration von 300 µg/ml zugesetzt worden war.

Nach 10 Tagen wurden die Zellkulturschalen auf das Vorhandensein von Kolonien überprüft.

4. Analytische Methoden

4.1 Bestimmung der Luziferase-Aktivität

4.1.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden transfizierte Zellen geerntet. Dazu wurde das Medium von den Gewebekulturschalen abgenommen und die Zellen zweimal mit eiskaltem *PBS* (*Ca²⁺- und Mg²⁺-frei*) gewaschen. Die Zellen wurden in Lysis-Puffer (0,1 M Tris Acetat, pH 7,5; 2 mM EDTA, 1% Triton X100) für 20 min auf Eis aufgeschlossen, die Zellfragmente 10 min bei 5000 x g pelletiert und der proteinhaltige Überstand wurde weiter verwendet.

4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry *et al.*, 1951)

10 µl Gesamtzellextrakt wurden mit 490 µl Lowry-Lösung I (2% Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH) gemischt und anschließend 1 ml Lösung IV (frisch gemischt aus: 500 µl 2% NaK-Tartrat (Lösung II); 50 µl Lösung I; 50 µl CuSO₄ (Lösung III)) zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurden 100 µl frisch angesetzte 50% Folin-Lösung zugegeben, gut

gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 600 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichkurve mit verschiedenen BSA-Konzentrationen bestimmt.

4.1.3 Luziferase-Assay

Die Klonierung des *Luziferase*-Gens aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* (de Wet *et al.*, 1987) ermöglichte die Etablierung eines empfindlichen, nicht radioaktiven genetischen Reporter-systems für Säugerzellen.

Die Biolumineszenzreaktion wird durch das Enzym Luziferase katalysiert, das dazu D-Luciferin als Substrat, ATP, Mg²⁺ und O₂ benötigt. Werden diese Reagenzien mit Zelllysat, das Luziferase enthält, gemischt, so entsteht ein Lichtblitz, der in einem Luminometer (Luminomat 9600, Fa. Berthold, Bad Wildbad) detektiert werden kann.

Pro Ansatz wurden durch die Injektionseinrichtung des Luminometers 100 µl Zelllysat, 350 µl Assay-Puffer (25 mM Glygly, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM ATP) und 100 µl Luciferin-Lösung (40 µM D-Luciferin im Assay-Puffer ohne DTT und ATP) miteinander vermischt. Nach einer Reaktionszeit von 15 s konnte das Ergebnis abgelesen werden.

4.1.4 Statistische Auswertung der Luziferase-Versuche

Jeder Ansatz wurde mit Duplikaten durchgeführt, in je drei voneinander unabhängigen Experimenten. Aus den erhaltenen Daten wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung mit Hilfe einer institutseigenen Kopie von Microsoft Excel berechnet.

4.2 Analyse von RNA mittels reverser Transkription und anschließender PCR (RT-PCR)

4.2.1 DNaseI-Verdau

Vor der Durchführung semiquantitativer RT-PCR wurde die eingesetzte RNA mit DNaseI (Boehringer Mannheim) verdaut, um eine Kontamination durch genomische DNA zu vermeiden.

10 µg RNA wurde mit H₂O (DEPC) auf ein Volumen von 43 µl eingestellt. Der Reaktionsansatz enthielt neben dem Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM

MgCl₂), 40 U RNasin (Promega, Madison, USA), 10 U RNasefreie DNaseI (Boehringer Mannheim) und 10 µg Hefe-tRNA. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 37°C wurde dem Reaktionsansatz 325 µl H₂O (DEPC) und 40 µl 4 M LiCl-Lösung zugeführt. Mit 400 µl Phenol/Chloroform (1:1, v/v) wurden Proteine und andere Zellbestandteile extrahiert um die enthaltene RNA (analog 1.4) zu reinigen. Die RNA wurde mit 1 ml Ethanol (99%) bei -20°C gefällt, für 15 min bei 4°C und 10 000 x g gefällt, anschließend mit 80% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das erhaltene RNA-Pellet wurde in einem geringen Volumen H₂O (DEPC) aufgenommen. Nicht sofort verwandte RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

4.2.2 Synthese von cDNA mittels reverser Transkription

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA wurde die enthaltene mRNA in cDNA (complementary DNA) transkribiert. Für die Erststrangsynthese der DNA wurde bei dieser Technik ein Primer verwendet, der aus 20 Desoxythymidinen (dT₂₀) besteht. Da mRNA ein polyA-Ende enthält, bindet hier der dT₂₀-Primer bevorzugt.

800 ng DNaseI-behandelte Gesamt-RNA wurden in einem Reaktionsansatz mit 5 x Reaktionspuffer (Gibco, Eggenstein) sowie 13 µM Erststrangprimer, 400 µM dNTPs, 10 U RNasin, 10 µM DTT und 60 U Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco, Eggenstein) in einem Endvolumen von 20 µl gemischt und für 45 min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde die Temperatur anschließend für fünf Minuten auf 95°C erhöht. Zur Kontrolle wurde jede Reaktion auch ohne Reverse Transkriptase und ohne RNA durchgeführt.

4.2.3 Amplifikation der cDNA mit anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Quantifizierung

Ein Reaktionsansatz bestand aus 2 µl je einer RT-Reaktion, 10 x *Taq*-Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0 bei Raumtemperatur) 0,2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und 2 µCi ³²P-dCTP, sowie 5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Pharmacia, Freiburg) in einem Gesamtvolumen von 20 µl in einem Thermocycler (*MJ Research PTC-225* Peltier Thermal Cycler, Watertown, Mass., USA). Oligonukleotide für *GAPDH* und *Brachyury* wurden dem Reaktionsansatz in einer Konzentration von je 10 µM hinzugegeben. Die PCR-Reaktion lief mit folgenden Parametern: 94°C (10 s), 55°C (10 s), 72°C (10 s) für 27 Zyklen. Die PCR für *GAPDH* zusammen mit *gsc* benötigte einen Vorlauf von 8 Zyklen. Anschließend gab man frischen PCR-Mix mit *gsc*-Oligonukleotiden hinzu und ließ die Reaktion für weitere 22 Zyklen laufen; jeder Schritt dauert hier jedoch nur 30 s.

Nach der PCR-Amplifikation wurden aus jedem Reaktionsansatz 2 µl entnommen, mit je 1 µl DNA-Probenpuffer gemischt und auf ein 6%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 100 V für ca. 2 Stunden. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel auf Whatman-Papier eine Stunde bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Um die *GAPDH*-Banden entsprechend ihrer Intensität quantifizieren zu können, wurde das Gel für 1-2 Stunden auf Fuji Imaging Platten (Type BAS-III; Fuji Photo Film Europa GmbH, Düsseldorf) aufgelegt, anschließend im Analysengerät Fujix BAS 1000 gescannt und mit entsprechender Software (MacBAS, V1.0; Fuji) ausgewertet. Setzt man die erhaltenen Werte für *GAPDH* einander gleich, so konnten die Intensitäten der anderen Banden (*gsc* oder *Brachyury*) in Relation zueinander verglichen werden.

4.3 Northern blotting und Hybridisierung

20 µg Gesamt-RNA bzw. 5 µg Poly-A⁺-RNA wurden in 30 µl Denaturierungspuffer (50% rekristallisiertes Formamid; 1 x *MOPS-Puffer*; 1% EtBr; 17,5% Formaldehyd in bidestilliertem Wasser) gelöst, 10 min bei 65°C inkubiert und auf Eis gekühlt. Dann wurden 4 µl 10 x Ladepuffer (50% Glycerin; 1 mM EDTA; 0,4% Xylene Cyanol FF; 0,4% Bromphenolblau) zugegeben und die Proben auf ein 1%-iges horizontales Agarosegel (18 cm x 16 cm x 1 cm) aufgetragen. Für ein 300 ml Gel wurden 3 g Agarose eingewogen und nach Zugabe von 237 ml bidestilliertem Wasser und 15 ml 20 x *MOPS-Puffer* gekocht bis die Agarose gelöst war. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurden 48 ml Formaldehyd (37%, p.a.) hinzugegeben, gemischt und das Gel sofort gegossen. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 x *MOPS* verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte durch das Anlegen von 120 V Spannung an das Gel. Der Gellauf wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblaubande zwei Drittel des Gels durchwandert hatte. Nach erfolgter Auftrennung wurden die RNA-Banden mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht. Das Gel wurde zur Dokumentation photographiert und die Stellen des Gels, an denen sich 28S und 18S ribosomale RNA, bzw. der RNA-Längenmarker (Gibco Life Tech., Eggenstein) befanden, markiert. Um das Formaldehyd auszuwaschen, wurde das Gel in 10 x *SSC* für 30 min unter Schütteln äquilibriert. Der Transfer der RNA von dem Gel auf ein gleichgroßes Stück Hybond N⁺-Membran (Amersham, Braunschweig) wurde durch Kapillarkräfte $\bar{U}N$ durchgeführt. Dabei wurde durch Kapillarkräfte 10 x *SSC* zuerst durch das Gel und dann durch die Membran gesaugt. Eine Box KIMWIPES[®] Lite 200 Papiertücher (Kimberly-Clark, Koblenz) auf dem Transfer-Aufbau verstärkte diesen Effekt. Am darauffolgenden Tag wurde der Blot abgebaut, die Membran kurz in bidestilliertem Wasser getaucht und die RNA auf dieser durch UV-Strahlung (312 nm) in einem Stratalinker (Stratagene, Amsterdam, NL) fixiert.

4.3.1 Hybridisierung mit Denhardt's Lösung

Die Hybridisierung des Filters erfolgte bei 65°C. Zunächst wurde der Filter für 2 Stunden in Vorhybridisierungslösung (5 x SSC; 0,5% SDS; 5 x Denhardt's Lösung; 100 µg/ml zerkleinerte denaturierte Lachssperma-DNA) inkubiert, dann wurde die Vorhybridisierungslösung gegen frische, vorgewärmte Lösung mit 100 µg/ml zerkleinerter denaturierter Lachssperma-DNA und radioaktiv (entsprechend 1-3 x 10⁶ cpm) markierter DNA-Sonde (siehe Abschnitt 2.6.) ÜN inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Filter 30 min in Waschlösung A (2 x SSC; 3,3% Phosphatpuffer; 0,1% SDS); zweimal 30 min in Waschlösung B (1 x SSC; 3,3% Phosphatpuffer; 0,1% SDS) und 30 min in Waschlösung C (0,5 x SSC; 3,3% Phosphatpuffer; 0,1% SDS) bei 65°C gewaschen. Der Filter wurde danach in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt.

Bevor der Filter für weitere Hybridisierungsproben verwendet werden konnte, mußte die gebundene radioaktive Hybridisierungsprobe durch 15 minütiges Kochen in 0,1 x SSC/0,1% SDS entfernt werden. Anschließend wurde der Filter für 2 Stunden vorhybridisiert.

4.3.2 Hybridisierung mit QuickHyb™

Die QuickHyb™-Hybridisierungslösung (Stratagene, Amsterdam, NL) wurde auf 68°C vorgewärmt und vor Gebrauch gut geschüttelt. Zur (Vor-) Hybridisierung wurde mindestens eine Menge von 33 µl Lösung pro cm² Membran eingesetzt. Die Vorhybridisierung dauerte 20 min bei 68°C, danach erfolgte die Zugabe denaturierter, radioaktiv markierter DNA-Sonde zusammen mit 100 µl von 10 mg/ml gescherter denaturierter Lachssperma-DNA. Nach einstündiger Hybridisierung bei 68°C wurde die Membran zweimal für 15 min bei Raumtemperatur in Waschlösung I (2 x SSC; 0,1% (w/v) SDS) geschüttelt und für 30 min bei 60°C in Wasch-lösung II (0,1 x SSC; 0,1% (w/v) SDS) gewaschen. Danach wurde der Filter sofort in Folie eingeschweißt und abschließend ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt.

4.4 Southern Blotting

4.4.1 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Zu einer 10 cm Petrischale konfluenten Zellen (z.B. von stabil transfizierten Klonen) wurden 1 ml Lysis-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM NaCl, 100 µg ProteinaseK/ml) gegeben. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber in ein Eppendorff-

Gefäß überführt und ÜN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zu dem Lysat wurde das gleiche Volumen an Isopropanol gegeben und gemischt. Nach kompletter Präzipitation konnte die weiße, fadenförmige genomische DNA mit einer Pipettenspitze aus der Lösung gefischt und durch Eintauchen in eiskalten 80% Ethanol gewaschen werden. Je nach Größe des Präzipitats wurde die DNA in 20-500 µl *TE-Puffer* unter Schütteln bei 37°C resuspendiert. Abschließend wurde die DNA-Konzentration (siehe Abschnitt 1.1) bestimmt.

4.4.2 Restriktionsverdau

Zum Verdau genomischer DNA wurden geeignete Enzyme ("genome qualified", GQ) wie z.B. *EcoR I* verwendet. Laut Herstellerangaben (Amersham, Braunschweig) beträgt die kleinste detektierbare Menge DNA auf einer Nylon-Membran ca. 2,5 pg. Das bedeutet, daß bei einem 1 kb großem Fragment mindestens 10 µg genomischer DNA verdaut werden müssen, um einzelne Kopien im Genom detektieren zu können.

Ein Restriktionsansatz von 10 µg DNA wurde ÜN mit 20 U Enzym bei der entsprechenden Reaktionstemperatur inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurden nochmals 10 U Enzym hinzugegeben und die Probe ca. vier Stunden inkubiert. Parallel dazu wurde ein Plasmid des interessierenden Transgens analog verdaut.

4.4.3 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Das 0,8% Agarosegel wurde, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, angefertigt. Die Proben wurden mit *10 x DNA-Probenpuffer* versetzt und in die Aussparungen aufgetragen. Das verdaute Plasmid wurde entsprechend verdünnt und als Eichkurve gemäß 1, 5, 10, 50 und 100 genomische Kopien dem Gel hinzugefügt. Die Auftrennung erfolgte bei 25 V ÜN.

Der Verdau war komplett, wenn die Banden über die gesamte Laufstrecke einen einheitlichen Schmier zeigten. Das Gel wurde unter UV-Licht mit einem transparenten Lineal photographiert.

4.4.4 Southern-Blot und Hybridisierung

Der Transfer von (genomischer) DNA funktioniert prinzipiell ähnlich wie der Transfer von RNA auf eine Trägermembran (4.3). Beim Southern Blot (Southern *et al.*, 1975) mußte das Gel jedoch vorher behandelt werden: In saurer Lösung wurde die DNA zunächst stellenweise depuriniert und durch anschließende Inkubation in Lauge denaturiert, so daß die DNA als Einzelstrang vorlag.

Nach einem 15 min Schüttelbad in 0,25 N HCl bei RT wurde die Lösung abgesaugt und durch 400 ml 1 N NaOH ersetzt. Nach 30 min Schütteln bei RT wurde die gleiche Menge BLOT-NEUTRAL (1M Trisbase, 1,5 N HCl) hinzugegeben, der pH-Wert gemessen (pH: 8- 8,5) und nochmals für 30 min unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Lösung abgesaugt und das Gel für 20 min bei RT äquilibriert. Der Blotaufbau erfolgte wie unter 4.3, und die Hybridisierung mit *Denhardt's Lösung* wie unter 4.3.1 beschrieben.

Der Filter wurde zunächst kurz in 5 x SSC geschwenkt, dann 2 x für 30 min bei 62°C in 2 x SSC gewaschen. Nachfolgend wurde der Filter je 30 min in 1 x SSC/1% SDS und 0,5 x SSC/0,1% SDS bei 62°C geschüttelt. Danach wurde der Filter sofort in Folie eingeschweißt und abschließend ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt. Um die Banden entsprechend ihrer Intensität quantifizieren zu können, wurden die Filter auch für 1-2 Stunden auf Fuji Imaging Platten aufgelegt, anschließend im Analysengerät Fujix BAS 1000 gescannt und mit entsprechender Software (MacBAS, V1.0; Fuji) ausgewertet.

4.5 Western Blotting

4.5.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Präparation und Auftrennung von Proteinextrakten für den *Western-Blot*

Für *Western-Blot*-Analysen wurde je Ansatz eine 10 cm Kulturschale mit konfluent gewachsenen Zellen verwendet. Zum Ernten wurden die Zellen einmal mit eiskaltem *PBS* gewaschen und in 500 µl RIPA-Probenpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 1mM EDTA; 1% Triton X-100; 1% Natriumdesoxycholat; 0,1% SDS) mit einem Zellschaber gesammelt und in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden mit Ultraschall geschert (*Branson Sonifier*, G. Heinemann) und die Zelltrümmer 5 min bei 10.000 x g abzentrifugiert. Um jeweils die gleiche Proteinmenge auf ein Gel aufzutragen, wurde vorher die Konzentration nach *Lowry* bestimmt (Abschnitt 4.1.2). Zur Analyse dieser Proteinextrakte wurden ca. 25 µl jeder Probe zusammen mit 25 µl 2 x *Laemmli-Probenpuffer* in einem 7-10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (SDS-PAGE).

4.5.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE, Laemmli, 1970)

Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen bestanden aus einem 7-10% Trenngel und einem 5% Sammelgel und wurden zwischen zwei durch Kunststoff-Abstandshalter

voneinander getrennte Glasplatten vertikal gegossen. Die Glasplatten wurden vor dem Gießen rundherum mit Agarose abgedichtet. Für eine 10% Trenngel-Lösung wurden 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS und 10% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) durch Zugabe von 0,1% (w/v) APS und 0,05% TEMED polymerisiert. Das Gel wurde bis zu einer Höhe von ca. 3 cm unterhalb des oberen Randes gegossen. Bis zum Auspolymerisieren des Trenngels wurde es mit Isopropanol überschichtet. Für die 5% Sammelgel-Lösung wurden 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS und 5% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) mit 0,1% (w/v) APS und 0,1% TEMED versetzt. Das Sammelgel wurde (nach Entfernen des Isopropanols) auf das Trenngel gegossen und ein geeigneter Kamm zum Aussparen der Probenaschen eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel in eine vertikale Laufapparatur eingespannt. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden in 2 x *Laemmli-Probenpuffer* aufgenommen, für 10 min bei 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und in die vom Kamm ausgesparten Taschen pipettiert. Um das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können, wurde gleichzeitig ein geeigneter Molekulargewichts-Standard (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in *Laemmli-Laufpuffer* (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) bei 20 mA bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, und dann bei 30 mA bis die Bromphenolblau-Banden den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel auf eine PVDF-Membran (*ImmobilonTM-P*, Millipore) übertragen.

4.5.3 Western-Blot und Protein-Detektion auf Membranen

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch Elektrotransfer mit Hilfe einer Naßtransfer-Kammer (*Trans-Blot*, BioRad) auf eine PVDF-Membran übertragen. Zuvor wurde die Membran ca. 1 min in Methanol aktiviert und anschließend 10 min gewässert. Mit Hilfe eines Trägers wurde die Membran dann direkt zusammen mit dem Gel luftblasenfrei zwischen je drei Lagen *Whatman 3MM*-Papier in Transferpuffer (48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 20% Methanol) zusammengebaut. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C und 300 mA.

Nach beendetem Transfer wurde die Membran (mit den gebundenen Proteinen) kurz in *PBS* gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in *PBS* mit 10% (w/v) Magermilchpulver, 0,15% Tween 20[©] geschwenkt. Anschließend wurde die Membran kurz in *PBS*/0,15% Tween 20 gewaschen, mit dem jeweiligen Primärantikörper (ca. 1:100 - 1:1000 verdünnt in *PBS* mit 10% (w/v) Magermilchpulver, 0,15% Tween 20) luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und 1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Rotieren inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 10 min in *PBS* mit 0,3% Tween 20 gewaschen und mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten

Sekundärantikörpern (ca. 1:2000 verdünnt in *PBS* mit 10% (w/v) Magermilchpulver, 0,15% Tween 20) analog zur ersten Hybridisierung für 1 Stunde inkubiert.

Nach fünfmaligem Waschen für jeweils 5 min in *PBS* mit 0,3% Tween 20 wurden die spezifisch erkannten Proteinbanden mit Hilfe des an den Primärantikörper gebundenen Sekundär-antikörpers durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Diese Detektion basiert auf der Oxidation eines Substrates, bei der Licht freigesetzt wird und die in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid von Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird. Hierzu wurde die Membran mit 3 ml einer frisch bereiteten 1:1-Mischung der ECL *Western-Blot* Nachweisreagenzien (Amersham, Braunschweig) überschichtet und in Folie eingeschlagen. Die Exposition eines Röntgenfilms erfolgte in der Dunkelkammer so lange, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

4.6 Immunhistochemie

4.6.1 Vorbereitung der Zellen

Die Beschichtung von Lab-Tek® Chamber Slides™ (Nunc, Wiesbaden) erfolgte ÜN mit 0,2% Gelatine-Lösung. Die Zellen (P19, Hela) wuchsen bis zur gewünschten Dichte bzw. Kolonienbildung und wurden nach zweimaligem Waschen mit *PBS* für 5 min und mit 4% Paraformaldehyd/*PBS* (Ca^{2+} - und Mg^{2+} -frei) bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit *PBS* (Ca^{2+} - und Mg^{2+} -frei) gewaschen. Die Lagerung erfolgte in *PBS* bei +4°C.

4.6.2 Antikörper-Reaktion

Die Antikörperdetektion beruht auf der starken Affinität des Biotins (D-*cis*-Hexahydro-2-oxothieno[3,4-*d*]imidazol-4-valeriansäure) zu Streptavidin (Protein mit MG 60 000 aus *Strepto-myces avidinii* ($K_d = 10^{-15}$ M)). Der Biotin-gekoppelte Zweitantikörper bindet an einen Streptavidin-Biotin-Komplex, der mit Meerrettichperoxidase (Horseradishperoxidase, HRP) oder Alkaliner Phosphatase (AP) konjugiert ist. Die Detektion dieses Komplexes erfolgt durch Reaktion der konjugierten Enzyme mit einem chromogenen Substrat.

Die fixierten Zellen permeabilisierten für 5 min in PBSgly-NP (*PBS* + 10 mM Glycin und 1% Nonidet NP-40). Die Blockierung fand anschließend in *PBS*/10% FCS für 30 min statt. Dann wurde das Serum entfernt und der Erstantikörper (anti-Vimentin) in einer Verdünnung von 1:200 in *PBS*/3% BSA für 90 min inkubiert. Es folgten drei Waschschritte für je 2 min in *PBS*,

danach wurden die Präparate für 15 min in 0,3% H₂O₂/Methanol-Lösung geblockt (zur Hemmung endogener Peroxidasen) und erneut dreimal für 2 min in *PBS* gewaschen.

Die Inkubation des Zweitantikörpers (anti-Maus, Biotin-gekoppelt; DAKO, Glostrup) in einer Verdünnung von 1:400 (in *PBS*/3% BSA) dauerte 30 min. Danach wurden die Zellen dreimal 2 min in *PBS* gewaschen und anschließend der Streptavidin-Biotin-HRP-Komplex (DAKO, Glostrup) für 30 min Dauer aufgetragen. (Zusammensetzung des Komplexes: 10 µl Lösung A mit 1 ml *PBS* gemischt, danach 10 µl Lösung B zugeben. Mischung ca. 30 min bei RT inkubieren, schließlich 1 ml *PBS* und 20 µl FCS hinzufügen). Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal für 2 min gewaschen.

Es schloß sich die Färbereaktion mit AEC für 10 min an. [AEC-Lösung: 10 mg AEC (3,3-Amino-9-ethyl carbazol (Sigma, Deisenhofen) in 1 ml N,N-Dimethylformamid lösen, 20 ml Natriumacetatlösung (50 mM, pH 4,9) hinzufügen und im Dunkeln bei RT filtrieren. Kurz vor Gebrauch 6,5 µl H₂O₂ (30%) zusetzen.]

Die Zellen wurden im Anschluß erneut dreimal für 2 min gewaschen.

Zur Färbung der Zellkerne mit Hoechst dye (1:1000; Hoechst, Frankfurt/M.) schloß sich eine Inkubation für 5 min an. Nach zweimaligem Waschen mit *PBS* und H₂O (bidest.) trockneten die Zellen an der Luft. Die Umrandungen der Objektträger wurden entfernt und die Zellen auf den Objektträgern mit Glycergel (DAKO, Glostrup) versiegelt.

Ergebnisse

IV. Ergebnisse

1. ES-Zellklone, die stabil *gooseoid* exprimieren, verändern ihre Morphologie

Die HM-1 Zellen leiten sich von der E14-ES-Zelllinie ab, die aus Blastozysten des 129 Sv-Mausstammes isoliert wurden (Magin *et al.* 1992). Sie werden auf gelatinebeschichteten Schalen mit dem *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) kultiviert. LIF hemmt die mesodermale Differenzierung, so daß die Zellen ihre totipotenten Eigenschaften behalten; ohne LIF differenzieren die Stammzellen spontan. Genetisch veränderte ES-Zellen können zur Herstellung transgener Mäuse verwendet werden und bieten die Möglichkeit frühe Differenzierungsvorgänge *in vitro* in ES-Zellen zu untersuchen.

Eine Differenzierung der ES-Zellen in alle Zelltypen kann durch jeweilige Veränderungen in den Kulturbedingungen, nämlich durch Wegnahme von LIF, Zugabe chemischer Reagenzien (z.B. all-trans-Retinsäure, DMSO) oder durch die Bildung von Zellaggregaten erreicht werden (siehe Einleitung).

1.1 Herstellung von ES-*gsc* Klonen

Um den Einfluß des Homöoboxgens *gooseoid* auf die Differenzierung von ES-Zellen und die Entwicklung der Maus zu untersuchen, wurden Klone hergestellt, die *gooseoid* stabil unter der Kontrolle des *Ubiquitin*-Promotors exprimieren. Die Verwendung des *Ubiquitin*-Promotors erlaubt die hohe Expression eines Transgens in fast allen embryonalen und adulten Zellgeweben (Schorpp *et al.*, 1996).

HM-1 Zellen wurden mit 20 µg *Ubi-gsc* Plasmid elektroporiert. Nach 10 Tagen Selektion mit G418 (300 µg/ml Medium) konnten 55 Klone isoliert werden. Eine Southern Blot Analyse zeigte, daß von 22 untersuchten Klonen zwölf das Transgen in ihr Genom integriert hatten. *Abbildung 4-1A* zeigt eine Auswahl von drei repräsentativen Klonen (3/4, 4/4 und 4/10). Um zu bestimmen, wieviel Kopien des *Ubi-gsc* Konstrukts die Zellen in ihr Genom integriert hatten, wurden parallel *gsc*-Plasmide in Mengen, die 1, 5, 25 und 100 Kopien entsprechen, elektrophoretisch aufgetrennt. Klon 3/4 enthielt ca. drei, Klon 4/4 ca. 20 und Klon 4/10 ca. 30 Kopien des Transgens (*Abbildung 4-1*).

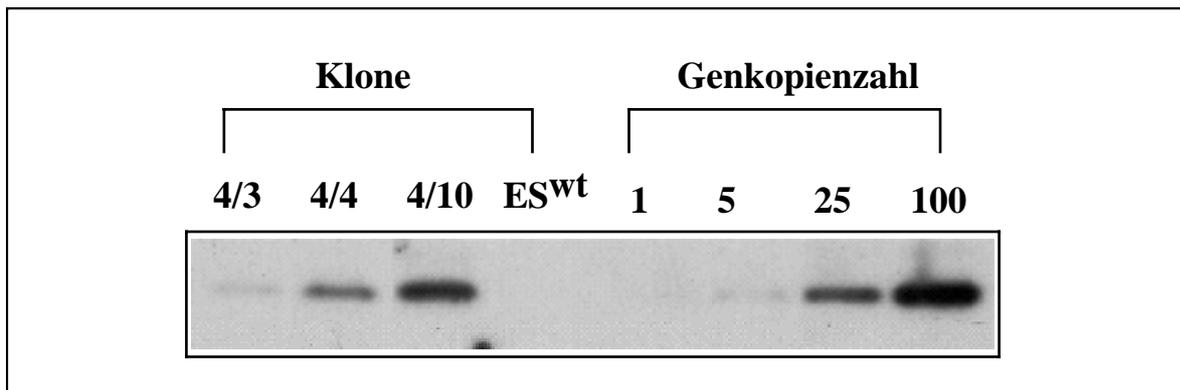


Abbildung 4-1: Charakterisierung von ES-Zellklonen, die stabil *gooseoid* exprimieren. Bestimmung der Anzahl der integrierten *gsc*-Genkopien durch Southern Blot Analyse. Genomische DNA der Klone 4/3, 4/4 und 4/10 wurde nach *EcoR* I Restriktionsverdau elektrophoretisch aufgetrennt, denaturiert und auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Quantifizierung wurden parallel *gsc*-Plasmide in Mengen aufgetrennt, die 1, 5, 25 und 100 Genkopien entsprechen. Die Membran wurde mit Gesamtlänge *gooseoid*-cDNA hybridisiert.

Die Klone 4/4 und 4/10 wiesen die größte Genkopienzahl auf und wurden für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Bereits bei der Kultivierung unter Standardbedingungen unterschieden sich beide Klone deutlich von den *Wildtyp*-Zellen. ES Zellen wachsen normalerweise in Kolonien, die zumeist eine deutlich runde Abgrenzung aufweisen. Der Zellkontakt ist dabei so eng, daß einzelne Zellen in einem solchen Verband nicht erkennbar sind (Abbildung 4-2A).

Die Klone 4/4 und 4/10 wuchsen nicht mehr in Kolonien, sondern ließen einzelne Zellen mit fibroblasten-ähnlichem Aussehen erkennen (Abbildung 4-2B und 4-2C).

In vivo ist *gooseoid* in den ersten mesenchymalen, den gastrulierenden Zellen exprimiert. Daher könnte ein ursächlicher Zusammenhang zwischen *gooseoid* und dem epithelial-mesenchymalen Übergang bestehen.

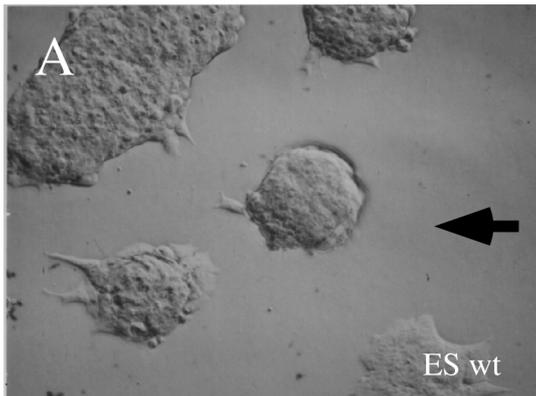
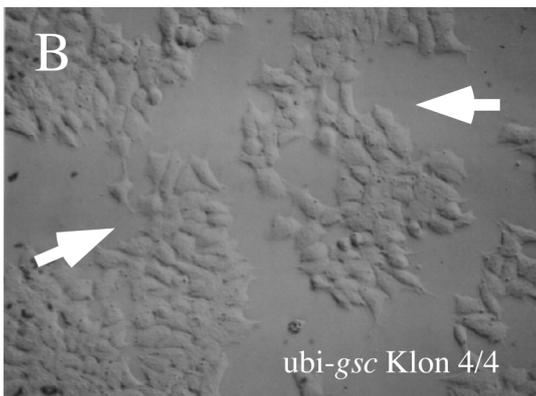


Abbildung 4-2:

Veränderte ES-Zellmorphologie nach Transfektion mit einem goosecoid-Expressionskonstrukt unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors.

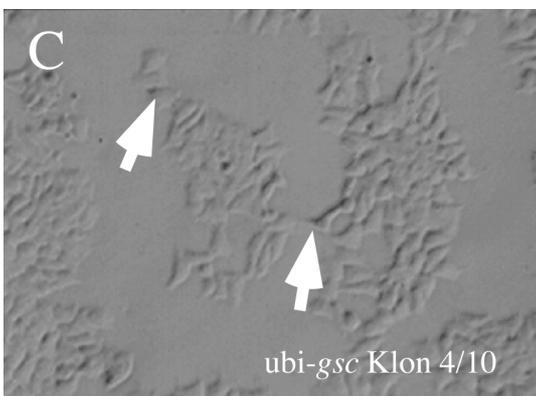


A: Normale ES Zellen (ES wt)

B: Klon 4/4

C: Klon 4/10

Während normale ES-Zellen (A) in dichten und runden Kolonien wachsen (schwarzer Pfeil), zeigen goosecoid-ES Zellklone (B und C) deutlich



erkennbare einzelne Zellen (weiße Pfeile), mit einem fibroblasten-ähnlichen mesenchymalen Aussehen.

Bei dem Vorgang der Gastrulation lösen sich Zellen aus der epithelialen Schicht des Epiblasten, indem sie eine mesenchymale Morphologie annehmen. Sie wandern in den Raum zwischen der endodermalen und ektodermalen Zellschicht entlang der basalen Lamina und bilden so das dritte Keimblatt, das Mesoderm, aus .

Da undifferenzierte ES-Zellen für die Herstellung transgener Mäuse unerlässlich sind, war die Verwendung dieser veränderten ES-Zellen für ein solches Experiment nicht mehr möglich.

Die Expressionsanalyse dieser Klone zeigte, daß nur 4/4 und 4/10 *gooseoid* exprimierten, obwohl in allen drei Klonen transgene *gooseoid* cDNA nachweisbar war (Abbildung 4-3).

Die morphologische Differenzierung der Klone deutete auf eine veränderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen und Transkriptionsfaktoren hin.

E-Cadherin ist ein Adhäsionsmolekül, das während der frühen Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielt (Larue *et al.*, 1996). Bereits im 8-Zell-Stadium der Mausentwicklung ist E-Cadherin für die Kompaktierung des Embryos essentiell (Vestweber und Kemler, 1984). Fehlt dieses Zelladhäsionsmolekül kann der Embryo kein trophektodermales Epithel ausbilden, nicht im Uterus implantieren und stirbt (Larue *et al.*, 1994). Zu Beginn der Gastrulation im Embryo lösen sich Zellen aus der ektodermalen Epithelzellschicht. Sie verändern ihren Charakter, da sie den Zell-Zell-Kontakt verlieren und eine Affinität zum Substrat der Basallamina zwischen Endoderm und Ektoderm erlangen (Burdsal *et al.*, 1985). Dies geht mit einer Reduzierung der *E-Cadherin*-Expression und der Aktivierung von *Brachyury* (Larue *et al.*, 1996), sowie *gooseoid* einher. Bei diesem Vorgang handelt es sich um einen *epithelialen-mesenchymalen Übergang* (EMT). Normale ES-Zellen entsprechen der epithelialen Zellschicht des Epiblasten. Daher lag es nahe, die erhaltenen Klone aufgrund ihrer veränderten Morphologie auf die Expression von *E-Cadherin* zu untersuchen (Abbildung 4-3).

Der organisatorspezifische Transkriptionsfaktor *lim-1* ist ein Marker für anteriores Primitivstreifenmesoderm und Prächordalplatte, die Region aus der sich im Lauf der Embryonalentwicklung der Kopf entwickelt während die Ausbildung der Körperachse nicht betroffen ist. (Shawlot und Behringer, 1995). *lim-1*^{-/-} Mausembryonen zeigen Fehlbildungen bereits kurz nach dem Start der Gastrulation, in welcher die Zellbewegungen nicht korrekt funktionieren. Die Zellpopulation die *gooseoid* exprimiert, befindet sich während der Gastrulation von *lim-1*^{-/-} Mausembryonen nicht mehr am anterioren Ende des Primitivstreifens, sondern in einer Region zwischen dem embryonalen und extraembryonalen Teil. Fehlt *lim-1* treten bereits während der frühen Embryogenese (E10) letale Fehlbildungen auf, weil sich der Kopf nicht entwickeln kann (Shawlot und Behringer, 1995).

Die *lim-1* -Expression könnte daher in den Klonen im Zuge der Differenzierung durch *gooseoid* angeschaltet worden sein.

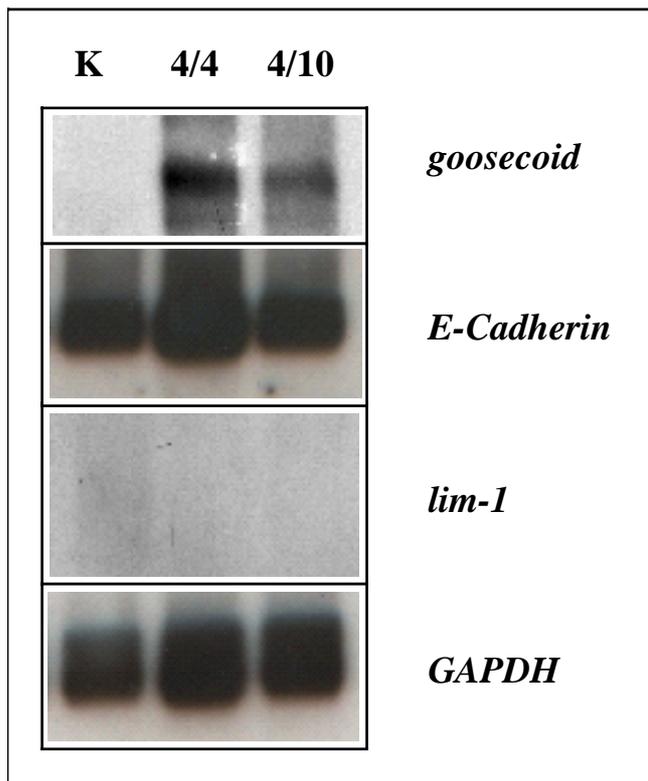


Abbildung 4-3: Expressionsanalyse der Klone 4/4 und 4/10, sowie ES-Zellen, die mit einem Kontrollplamid transfiziert wurden (K), durch Northern Blot.

Die Klone 4/4 und 4/10 exprimierten transgene *gsc*-cDNA (Probe: *goosecoid* - cDNA). Die *E-Cadherin*-mRNA Konzentration der Klone unterschied sich nicht von der der ES-Wildtyp-Zellen (Sonde: *E-Cadherin*-cDNA). In keinem Klon war *lim-1*-mRNA nachweisbar. Als Kontrolle wurde zur Hybridisierung eine *GAPDH* - cDNA Sonde (1,2kb *Pst* I-Fragment) verwendet.

Die *E-Cadherin*-mRNA Konzentration der Klone unterschied sich nicht von der der ES-Wildtyp-Zellen. In keiner Probe war *lim-1* mRNA nachweisbar. Als Kontrolle wurde zur Hybridisierung eine *GAPDH*-cDNA Sonde verwendet. Durch die morphologischen Veränderungen der ES-Zellklone ist evident, daß die Überexpression von *goosecoid* den totipotenten Zustand aufgehoben hat und die ES-Zellklone ein bestimmtes Zellschicksal angenommen haben.

Dies ist jedoch weder auf eine Reduzierung des *E-Cadherin* Expressionsniveaus zurückzuführen noch durch Expression des anterior-mesodermalen Markers *lim-1* manifestiert.

1.2 Analyse von Massenkulturen

Die Frage, ob die oben beschriebenen morphologischen Veränderungen von den Kultivierungsbedingungen, den transkriptionellen Eigenschaften von *goosecoid* selbst oder durch klonale Effekte (wie z.B. Integrationsstellen des Konstrukts) hervorgerufen wurden, konnte durch ein Massenkulturexperiment geklärt werden. In diesem Massenkulturexperiment wurden anstatt weniger Zellklone viele Zellkolonien untersucht.

ES-Zellen wurden in einem zweiten Ansatz mit 15 µg Expressionsplasmid (Ubi-*HGFP*, Ubi-*hgfp**gsc*, Ubi-*gsc*) bzw. einem Kontrollplasmid elektroporiert und für zehn Tage mit G418 selektioniert. Anschließend wurde die Morphologie der Kolonien untersucht.

Die Transfektion mit dem Kontrollplasmid (pcUBI 1.1.+) führte zu 92 Kolonien, von denen 40% differenziert waren. Nach Transfektion mit dem *hgfp**gsc*-Expressionsplasmid bildeten sich 48 Kolonien, von denen 59% differenzierten. Die Transfektion mit dem Expressionsplasmid pcUBI 1.1.+*gsc* führte zu 98 Kolonien, von denen 71% differenziert waren. Lediglich 36% von 69 erhaltenen Kolonien wiesen eine veränderte Morphologie nach Transfektion mit einem Expressionsplasmid für *HGFP* auf. Die Ergebnisse des Massenkulturexperiments sind in *Abbildung 4-4*, die Werte in *Tabelle 4-1* zusammengefaßt.

Obwohl 40% der Kontrollkolonien morphologisch differenziert waren, erzielte eine Überexpression mit *gooseoid* einen deutlichen Anstieg auf 71%. Die Ergebnisse legen nahe, daß der beobachtete morphologische Effekt auf *gooseoid*-Expression zurückzuführen ist.

Diese Massenkulturen stellen statistisch repräsentative Populationen dar. Klonale Effekte spielen daher keine Rolle. Die *HGFP*-Expression hatte einen ähnlich geringen Effekt auf die Zellen wie die Transfektion mit einem Kontrollplasmid. Dies spricht ebenfalls für die Spezifität der Differenzierung durch *gooseoid*.

Da die Kontrollansätze (mit leerem Expressionsplasmid oder Ubi-*hgfp*) ebenfalls differenzierte Kolonien aufwiesen, konnte bei den *gooseoid*- bzw. *hgfp**gsc*-exprimierenden ES-Zellen ein deutlich höherer Prozentsatz (Steigerung um 178%) an morphologisch veränderten Kolonien beobachtet werden.

Als Erklärung für die relativ hohe spontane basale Differenzierungsrate von ca. 40% kommen lediglich der Stress der Elektroporation und die Kultivierungsbedingungen in Betracht.

| Ansatz | Gesamtzahl der Kolonien pro Ansatz | Anzahl der differenzierten Kolonien | differenzierten Kolonien [%] |
|----------------------------------|---|--|-------------------------------------|
| Kontrolle(pcUBI 1.1.+) | 92 | 37 | 40 |
| Ubi-<i>hgfp</i> | 69 | 24 | 36 |
| Ubi-<i>hgfp</i><i>gsc</i> | 48 | 28 | 59 |
| Ubi-<i>gsc</i> | 98 | 69 | 71 |

Tabelle 4-1: tabellarische Zusammenfassung des Massenkulturexperiments.

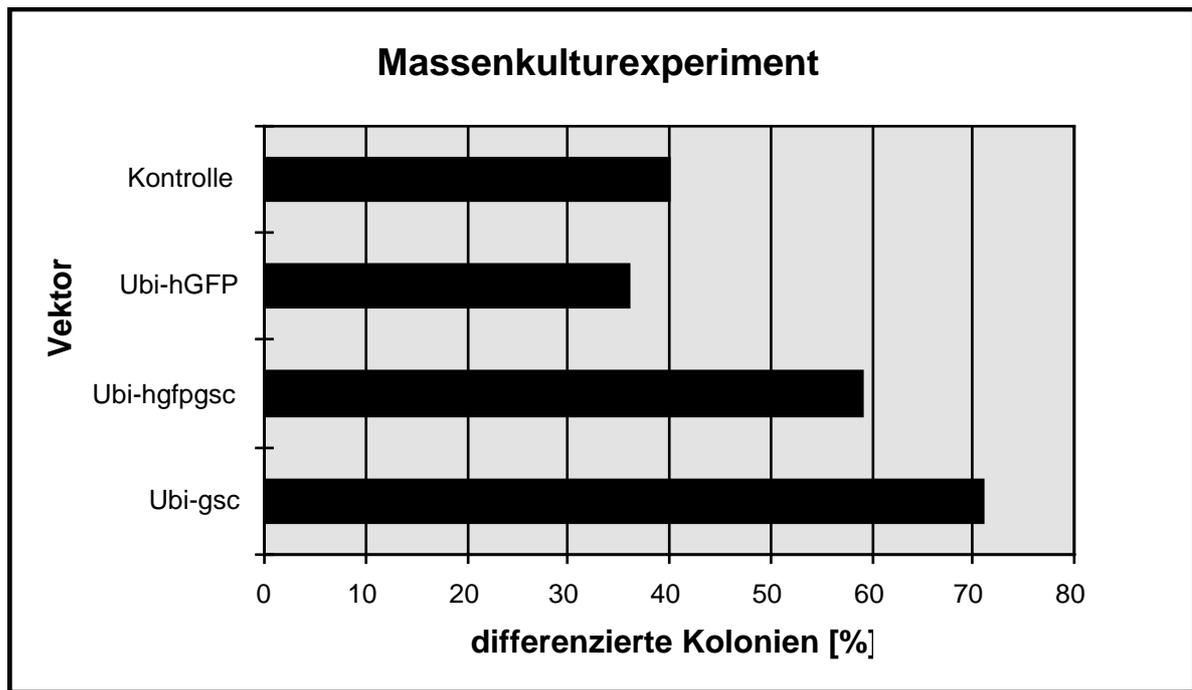


Abbildung 4-4: ES-Zellkolonien, die stabil *gsc* exprimieren, verändern ihre Morphologie. ES Zellen wurden mit 15 µg Expressionsplasmid (Ubi-hgfp: *pcUBI1.1+hgfp*; Ubi-hgfp gsc: *pcUBI1.1+hgfp gsc* und Ubi-gsc: *pcUBI1.1+gsc*) bzw. einem Kontrollplasmid (Kontrolle: *pcUBI1.1+*) elektroporiert und für 10 Tage mit G418 selektiert. Abschließend wurden die erhaltenen Kolonien aufgrund ihrer Morphologie bewertet.

Die Kriterien, mit denen die morphologischen Veränderungen bewertet wurden, verdeutlicht *Abbildung 4-5*.

Abbildung 4-5A zeigt das Wachstum normaler ES-Zellen auf gelatinebeschichteten Gewebekulturschalen. Die Kolonien, die einen scharfen, glatten Rand besitzen, sind deutlich zu erkennen. Es ist nicht möglich einzelne Zellen von einander zu unterscheiden.

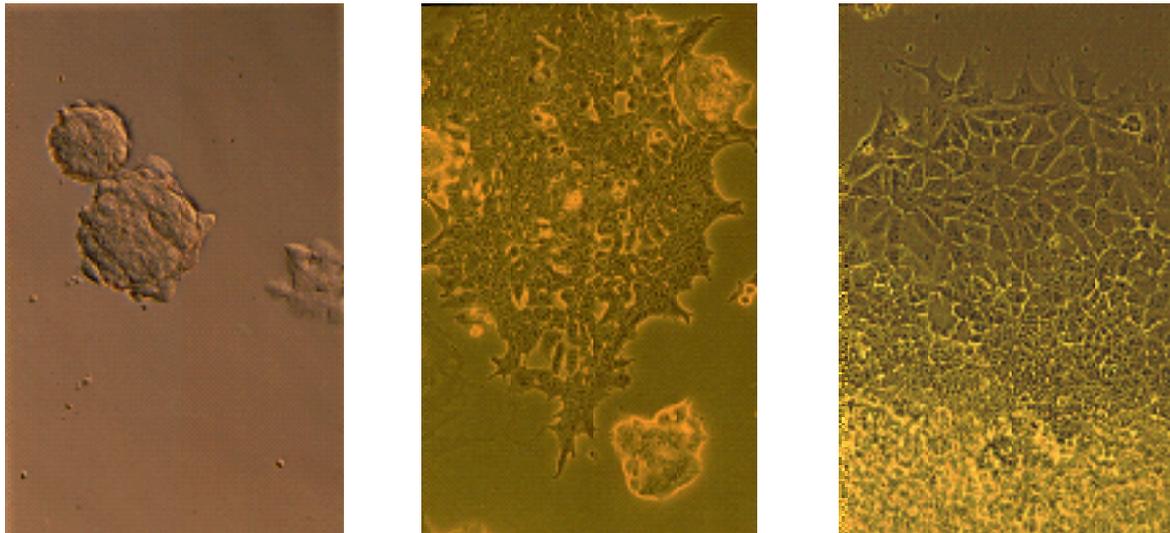


Abbildung 4-5: Morphologische Veränderungen bei Kolonien des Massenkulturexperiments. (A) zeigt das Wachstum normaler ES-Zellen (ESwt) auf gelatinebeschichteten Gewebekulturschalen. Die Kolonien, die einen glatten runden Rand zeigen, wachsen so dicht zusammen, daß einzelne Zellen nicht erkennbar sind. (B) und (C) zeigen ES-Kolonien, die mit Ubi-gsc transfiziert wurden. (B) stellt exemplarisch eine Kolonie dar, die sich vom Aussehen der Wildtyp-Zellen unterscheidet. Innerhalb einer Kolonie sind einzelne Zellen zu beobachten, die eine fibroblastenähnliche Morphologie besitzen. Bei größeren Kolonien fiel auf, daß sie häufig von einem breiten Rand differenzierter Zellen umgeben waren, wie in (C) zu sehen ist. Wildtyp-Kolonien wiesen dies nicht auf.

*Abbildung 4-5B und C zeigen ES-Zellkolonien, die mit Ubi-gsc transfiziert wurden. B stellt eine Kolonie dar, die sich vom Aussehen der Wildtyp-Zellen deutlich unterscheidet. Es gab keine glatte Abgrenzung der Kolonie; die Zellen wuchsen nicht mehr so dicht zusammen. Die Zellform hatte sich zu einem fibroblastenähnlichen, mesenchymalen Aussehen verändert, so daß Details, wie z.B. Kernkörperchen erkennbar waren. *Abbildung 4-5B* zeigt eine einzelne Kolonie; *4-5C* zeigt die Ränder einer größeren Kolonien, die von einem breiten Rand differenzierter Zellen umgeben ist. Dieses Phänomen trat bei größeren Kolonien häufiger auf. Wildtyp-Kolonien weisen dies nicht auf.*

2. *Vimentin* - ein Zielgen für *goosecoid*?

Die Veröffentlichung von Burdsal *et al.* (1993) beschreibt Versuche, in denen gastrulierende Mausembryonen in ihre drei Keimblätter zerlegt, *in vitro* weiter kultiviert und analysiert wurden.

Immunfluoreszenzanalysen zeigten, daß die Zellen des Epiplasten positiv für E-Cadherin, die des Primitivstreifens dagegen negativ für dieses Zelladhäsionsmolekül waren. Umgekehrt verhielt es sich für *Vimentin*, das nur in Zellen des Primitivstreifenmesoderms nachweisbar war. *Vimentin* ist ein zelluläres Strukturprotein und gehört zur Klasse der Intermediären Filamentproteine (IF). Es wird häufig als Markergen für mesenchymale Zellen genannt (Traub, 1995; Franke *et al.*, 1982).

Die Gastrulation in der Maus ist ein epithelialer-mesenchymaler Übergang, bei dem das Homöoboxgen *goosecoid* eine wichtige Rolle spielt. Da auch ES-Zellen, die *goosecoid* exprimieren, ihre Morphologie verändern und die Klone ein mesenchymales, fibroblastenähnliches Aussehen annehmen, lag es nahe zu untersuchen, ob genetische Interaktionen zwischen *Goosecoid* und *Vimentin* existieren.

2.1 Hinweise aus der *Vimentin*-Promotorsequenz

Ausgangspunkt für diese Hypothese war die Untersuchung der *Vimentin*-Promotorsequenz auf mögliche Bindesequenzen für Homöoboxproteine.

Abbildung 4-6 zeigt eine Auflistung verschiedener Bereiche des *Vimentin*-Promotors der Maus³⁸, in denen ein ATTA- und fünf TAAT-Motive zu finden sind. In dem ca. 3 kb großen proximalen Promotorbereich befindet sich insgesamt neben den acht TAAT- und vier ATTA-Elementen auch eine fast perfekte Konsensusbindesequenz für *goosecoid*: TAGGTaggATTA. Die perfekte Sequenz enthält anstelle des markierten G ein A, nach dem Schema TAAT (N)₃ ATTA. Obwohl in diesem relativ großen Promotorfragment nur sieben solcher Elemente zu finden sind, fallen aber ihre Positionen innerhalb des Promotors auf. Die konsensus-ähnliche Sequenz befindet sich in einem Bereich des Promotors, der in anderen Untersuchungen bereits als "Enhancer"-Region beschrieben wurde (Nakamura *et al.*, 1995).

Vier weitere TAATs liegen geklustert in einem Promotor-Fragment von 181 bp, die von drei möglichen Bindestellen für LEF-1 flankiert werden (-1880 bis -1430). Das einzige einzelne ATTA-Element ist der Transkriptionsstartstelle am nächsten (-187) und befindet sich

³⁸ Genbank-Nummer: Z22526

zwischen einer möglichen Bindestelle für das Brachyury-Protein (-253;) und der Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AP-2 (-62) und einer CAAT-Box (-89) (Nakamura *et al.*, 1995).

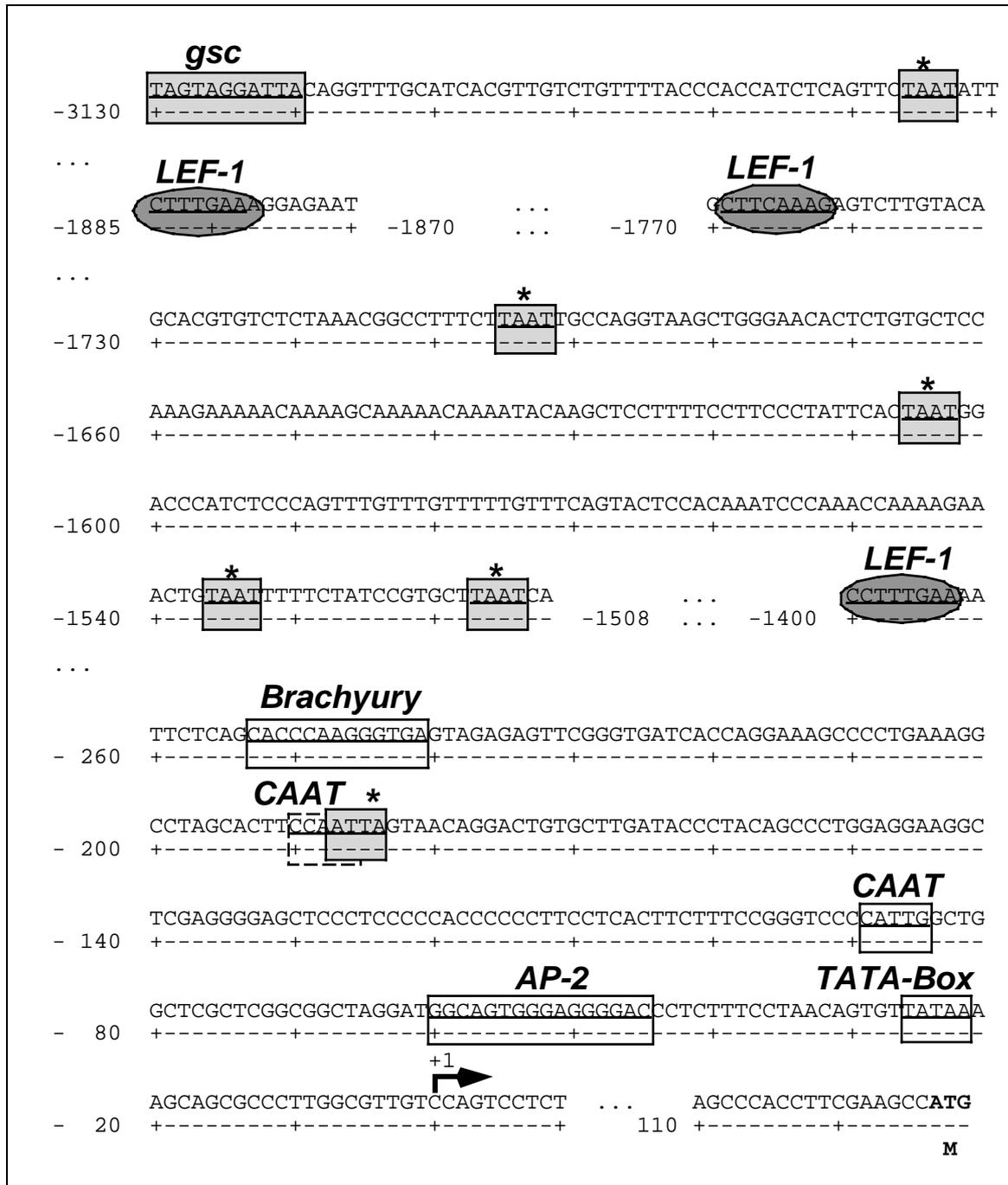


Abbildung 4-6: Auflistung markanter Bereiche des Vimentin-Promotors der Maus (Genbank-Nummer: Z22526) bis zum Startkodon (ATG). Die Sequenz wurde in Bezug auf die Transkriptionsstartstelle nummeriert (Pfeil). Unterbrechungen in der Auflistung der Sequenz sind durch "..." gekennzeichnet. Potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind durch Rahmen

hervorgehoben und benannt. Konsensus Homöobox-Bindestellen (TAAT und ATTA) sind durch graue Kästchen und einem * markiert.

2.2 Immunhistochemie der HM-1 Klone

Um herauszufinden, ob das Vimentin-Protein auch in den Klonen nachweisbar ist, wurden Wildtyp-ES-Zellen, sowie der Klon 4/10 auf gelatinebeschichteten Objektträgern (NUNC, Wiesbaden) kultiviert, nach 48 Stunden fixiert und anschließend analysiert. *Abbildung 4-7* zeigt eine immunhistologische Analyse von ES-Zellen und Klon 4/10. Als positive Kontrolle wurden HeLa-Zellen in dem Experiment verwendet.

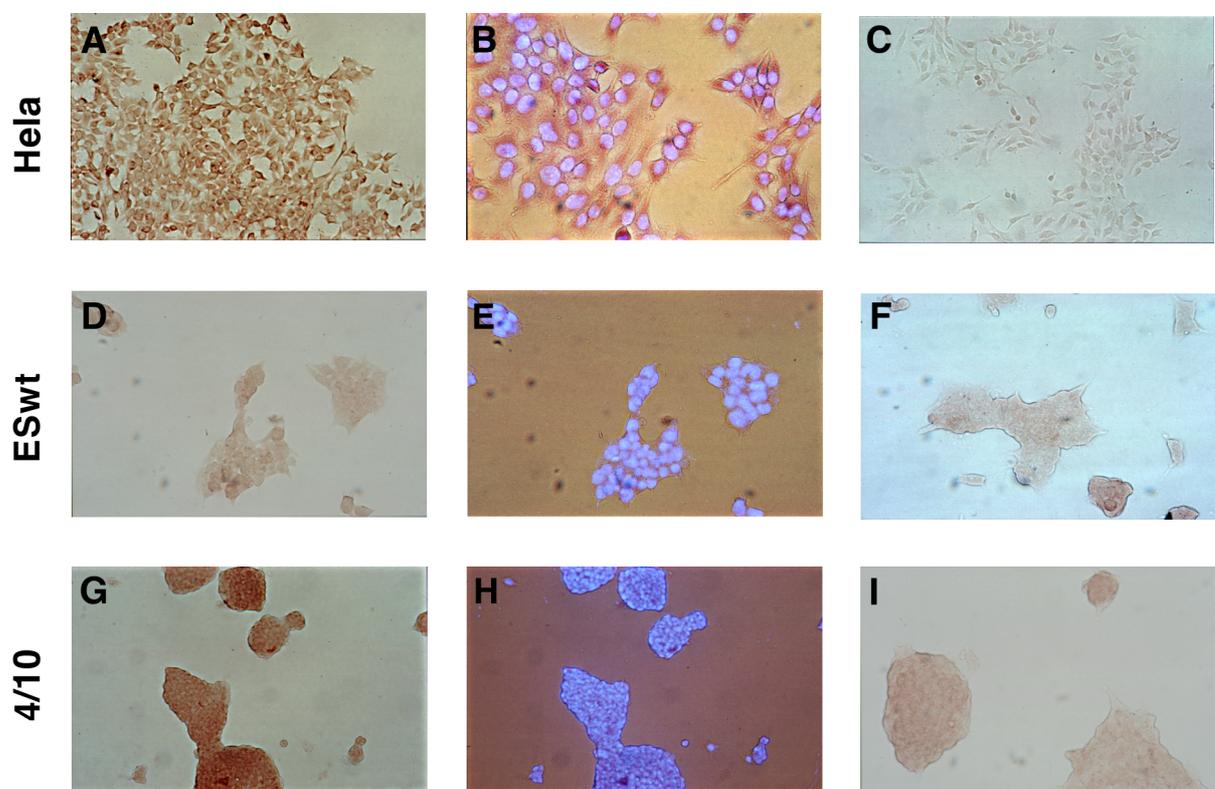


Abbildung 4-7: Detektion des Vimentin-Proteins in HeLa-, ESwt- und 4/10- Zellen mittels Immunhistochemie: Abbildungen (A), (D) und (G) stellen die komplette, spezifische Antikörperreaktion dar. Abbildungen (B), (E) und (H) zeigen die Zellkerne der Zellen, die nach Inkubation mit Hoechstfarbstoff und UV-Anregung sichtbar gemacht wurden. Abbildungen (C), (F) und (I) zeigen die Negativkontrolle der Färbungsreaktion für die verschiedenen Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. HeLa-Zellen (A-C) waren erwartungsgemäß positiv für Vimentin. Durch die Kernfärbung ist deutlich zu erkennen, daß die Vimentin-Proteine ausschließlich im Zytoplasma zu finden sind. In Wildtyp-ES-Zellen war außer einer leichten unspezifischen Färbung kein Vimentin nachweisbar.

Klon 4/10, der repräsentativ ausgewählt wurde, zeigte eine deutliche Färbung für Vimentin.

Die Tatsache, daß Klon 4/10 im Gegensatz zu *wildtyp*-ES-Zellen positiv für Vimentin war, bestätigte die Vermutung, daß die Zellklone durch die Überexpression von *goosecoid* ihr Zellschicksal veränderten. Dabei durchliefen die Klone einen epithelial-mesenchymalen Übergang. Die Expression von *vimentin* belegt den mesenchymalen Charakter der Zellklone.

3. *goosecoid*-Fusionskonstrukte

3.1 Klonierung

Um das Goosecoid-Protein direkt nachweisen zu können, wurden Fusionskonstrukte kloniert. Die hinzugefügten Bereiche sollten für spezifische Antikörper erkennbar sein und eine Detektion in der Western Blot-Analyse, für Immunhistochemie bzw. -fluoreszenz, sowie bei der FACS-Analyse ermöglichen. *Abbildung 4-8* zeigt eine Übersicht der verwendeten Fusionskonstrukte.

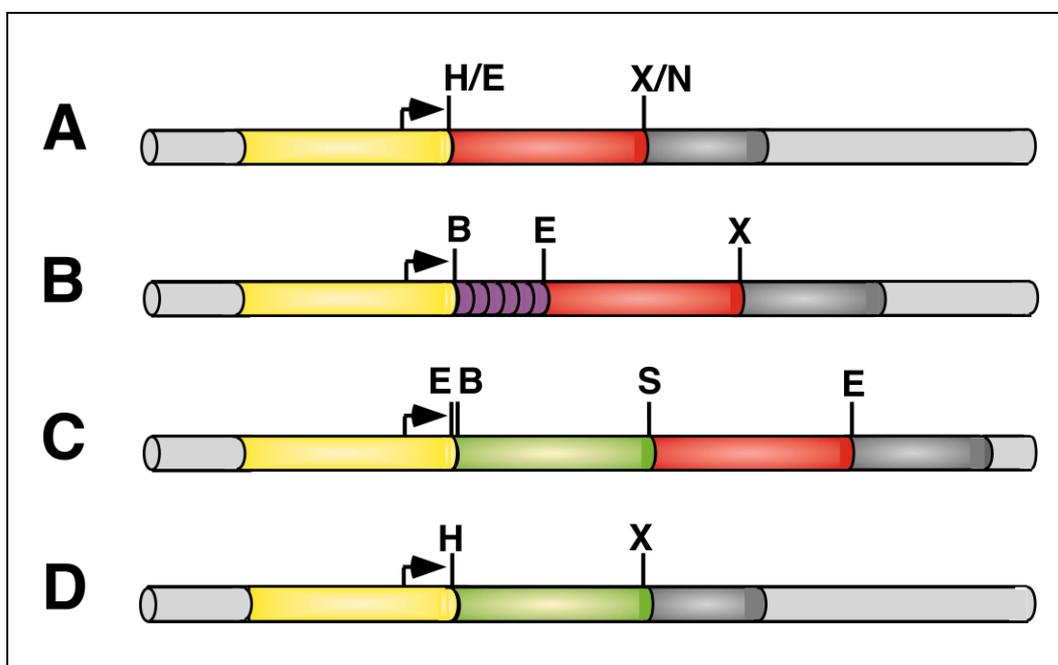


Abbildung 4-8: Schematische Übersicht über die verwendeten Konstrukte. Hellgrau: Vektor

gelb: Promotorbereich (CMV oder Ubi), rot: *goosecoid*-cDNA, violett: Myc-tag, grün: HGFP,

dunkelgrau: Polyadenylierungssequenz.

B = *BstE* II, E = *EcoR* I, H = *Hind* III, N = *Not* I, S = *Sph* I, X = *Xba* I.

A: *goosecoid*-cDNA unter der Kontrolle des CMV bzw. des Ubi-Promotors.

B: Myc-*gsc* Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des CMV bzw. des Ubi-Promotors.

C: *hgfgsc* Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des CMV bzw. des Ubi-Promotors.

D: HGFP-cDNA unter der Kontrolle des CMV bzw. des Ubi-Promotors.

3.1.1 N-terminale Fusion mit dem Grün-Fluoreszierenden Protein (GFP)

Das grün-fluoreszierende Protein (*Green Fluorescent Protein; GFP*), das aus der Meeresqualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Ward, 1979), bietet direkte Detektionsmöglichkeiten. Nach Anregung mit kurzwelligem Licht (488 nm) kann GFP durch Emission von grünem Licht (525 nm) nachgewiesen werden. Dies ist in fixierten, wie in lebenden Organismen möglich (Prasher *et al.*, 1992). Zusätzlich war von der Firma Clontech (Heidelberg) ein polyklonaler Antikörper käuflich erhältlich.

Zur Klonierung des Fusionsproteins wurde folgende Strategie verfolgt:

Die codierenden Bereiche der beiden Gene wurden durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Der hohe GC-Gehalt (ca. 65%) der *gsc*-cDNA machte die Zugabe von 5% DMSO und eine relativ hohe Annealing-Temperatur von 62°C erforderlich. Zusätzlich erwies sich die Erhöhung der MgCl₂-Konzentration im Reaktionspuffer von 1 mM auf 1,5 mM als notwendig. Die bei der PCR verwendeten Oligonukleotide waren so konstruiert, daß durch sie an den Enden der beiden Gene neue Restriktionsschnittstellen eingeführt wurden; im Falle der *GFP*-cDNA mußte zusätzlich noch am 3'-Ende das STOP-Codon deletiert werden. Die beiden so modifizierten cDNAs wurden zunächst in den Blueskript II-Vektor (Stratagene) kloniert. Durch einen Doppelverdau mit *BstE* II und *Sph* I konnte im Fall des *GFP*-Vektors das Insert und im Fall des *gsc*-Vektors das geöffnete Plasmid erhalten werden. Mit weiteren Klonierungsschritten konnte die *GFP*-cDNA mit der *gsc*-cDNA fusioniert werden.

Das so erhaltene Konstrukt wurde in eukaryotischen Expressionsvektoren als *Hind* III/*Xba* I-Fragment in den pRc/CMV- bzw. pcDNA 3.1.+ -Vektor (Expression des *hgfgsc*-Konstruktes unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-Promotors) und als *Xba* I/ *Xho* I-Fragment in den pUbi-Vektor³⁹ bzw. in den pcUBI 1.1+ Vektor als *EcoR* I-Fragment⁴⁰ (Expression unter der Kontrolle des *Ubiquitin*-Promotors) umkloniert. Durch die Wahl der Oligonukleotide stellte

³⁹ als pUbiJunB-Vektor von P. Angel, Heidelberg erhalten.

⁴⁰ die Sequenz des *hgfgsc*-*EcoR* I-Fragments befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

die Aminosäure G (Glycin) das Bindeglied zwischen der *GFP*- und der *gooseoid*-Sequenz dar.

Zu einem späteren Zeitpunkt der Untersuchungen stand eine verbesserte Version des GFP zur Verfügung, das "*humanized*"-*GFP*, *HGFP*. Eine Punktmutation, durch die im Protein an Position 65 die Aminosäure Serin gegen Threonin ausgetauscht wird, führt zu einem 45-fachen Anstieg der Fluoreszenz im Vergleich zum *Wildtyp*-*GFP*. Außerdem wurden 80 Codone der cDNA so verändert, so daß sie dem humanen Codongebrauch entsprachen. Somit kann *HGFP* effizienter in Säugerzellen transkribiert werden (Zolotukhin *et al.*, 1996).

Bis auf die FACS-Analyse (3.2.2) wurden sämtliche Versuche mit *HGFP* und dem Fusionskonstrukt *hgfp_{gsc}* durchgeführt.

3.1.2 N-terminale Fusion mit Myc

Ein anderer Versuchsansatz zur Detektion von Goosecoid-Proteinen besteht in einem Fusionskonstrukt, das 5' vor der gesamten kodierenden Region des Gens zusätzlich ein "Myc-tag" enthält. Dabei handelt es sich um ein Hexamer einer kurzen DNA-Sequenz des *Myc*-Gens. Auf der Proteinebene stellt dieser Bereich ein Epitop für den Myc-Antikörper (MEQKLISEEDLNE) dar, so daß das Fusionsprotein im Western Blot detektiert werden kann. Die *Myc_{gsc}*-cDNA⁴¹ konnte zur weiteren Klonierung als *Bam*H I/ *Xba* I- Fragment verwendet werden.

Durch die bereits vorhandenen eukaryontischen Expressionsvektoren (pcDNA 3.1+ und pcUBI 1.1+) soll das Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-(CMV) bzw. des Ubiquitin-Promotors (Ubi) exprimiert werden.

3.2. Überprüfung der Funktionalität der Fusionskonstrukte

3.2.1 Überprüfung der korrekten Proteingröße durch Western Blot

Zunächst wurden die Fusionsproteine *hgfp_{gsc}* und *Myc_{gsc}* durch *in vitro*-Translation und durch Expression nach transienter Transfektion in P19 Zellen hergestellt. Die Lysate beider Ansätze, sowie Kontrollansätze (Leerplasmid, bzw. hGFP) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. *Abbildung 4-9* zeigt Western Blots für (A) das *hgfp_{gsc}*- und (B) das *Myc_{gsc}*-Fusionsprotein.

⁴¹ Die *Myc_{gsc}*-cDNA wurde freundlicherweise von Frau Dr. Campione zur Verfügung gestellt.

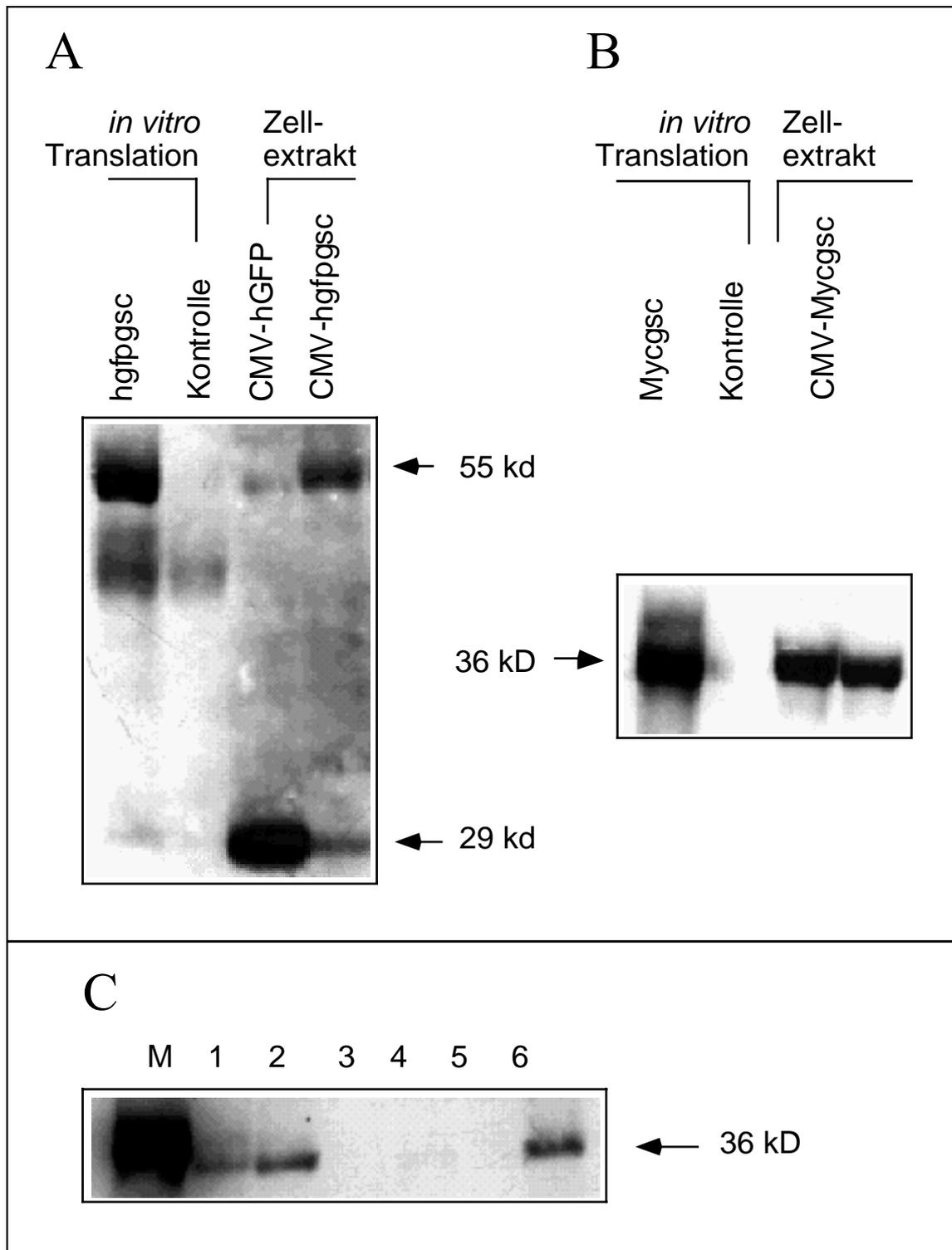


Abbildung 4-9: Überprüfung der Proteingröße von *gsc*-Fusionskonstrukten durch Western Blot. A/B: Lysate wurden nach *in vitro*-Translation und transienter Transfektion von P19

Zellen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion der korrekten Proteingrößen wurden für (A) ein polyklonaler anti-GFP und für (B) ein monoklonaler Antikörper gegen das Myc-Epitop verwendet. C: Western Blot-Analyse von sechs Lysaten stabil transfizierter P19 Klonen. Drei P19-Klone (1,2 und 6) transkribieren das Mycgsc-Fusionsprotein. Ein Aliquot der *in vitro*-Translationsreaktion aus (B) für Mycgsc wurde als Marker (M) aufgetragen.

Die Proteine wurden mit (A) einem polyklonalen anti-GFP- (Clontech, Heidelberg) und mit (B) einem monoklonalen Antikörper gegen das Myc-Epitop detektiert. Die nachgewiesenen Proteine wiesen im einzelnen folgende Größen auf: das hgfgsc-Protein zeigte eine Größe von 55 kD (496 Aminosäuren; AS), die Kontrolle mit hGFP 29 kD (240 AS) und das Mycgsc-Fusionsprotein wies eine Größe von 36 kD (328 AS) auf.

Abbildung 4-9C zeigt eine Western Blot-Analyse von sechs Lysaten stabil transfizierter P19 Klone, die mit dem *CMV-Mycgsc* Expressionsplasmid elektroporiert wurden. In drei (Nr. 1, 2 und 6) von sechs analysierten Klonen konnte das Mycgsc-Fusionsprotein nachgewiesen werden. Als positive Kontrolle (M) wurde ein Aliquot der *in vitro*-Translationsreaktion wie in *Abbildung 4-9B* aufgetragen.

3.2.2 FACS Analyse von gfp_{gsc}

Die Expression von *GFP* bzw. *hGFP* in lebenden Zellen kann im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Durch die Verwendung des FITC-Filtersets (530 nm ± 30), das der Wellenlänge des von GFP emittierten Lichts entspricht (525 nm), bestand die Möglichkeit mit Hilfe eines FACS⁴²-Gerätes in einem Zellpool GFP-positive von -negativen Zellen zu unterscheiden (Cheng und Kain, 1995).

Dies sollte ebenfalls mit dem vorliegenden *gfp_{gsc}*-Fusionskonstrukt möglich sein.

Dazu wurden ES-Zellen mit 20 µg Expressionsplasmid transfiziert und mit G418 zehn Tage selektioniert. Die erhaltenen Kolonien, sowie *Wildtyp* ES-Zellen wurden trypsiniert, zweimal mit *PBS* gewaschen und direkt vermessen. GFP-Fluoreszenz wurde in einem mit einem Argon Laser ausgestatteten FACS Star Plus-Durchflußzytometer (Becton Dickinson, San José USA) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm detektiert. Der FL1 Emissionskanal

⁴² FACS: fluorescence activated cell sorting

(normalerweise zur FITC Detektion benutzt) wurde zur Detektion der GFP-Fluoreszenz verwendet. Die bei der Messung erhaltenen Histogramme sind in *Abbildung 4-10* dargestellt.

Im Gegensatz zu den *Wildtyp* ES-Zellen trat bei dem *gfpgsc*-Zellpool eine zweite Zellpopulation (grüne Fläche) auf, die den *gfpgsc*-exprimierenden Zellen entsprach. Somit ist es möglich, daß Zellen ohne vorherige Fixierung, ohne zusätzliche Substrate und ohne Inkubation mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht werden können.

Dieses Ergebnis wurde im Laufe der vorliegenden Arbeit von einer anderen Forschergruppe bestätigt. (Ropp *et al.*, 1995)

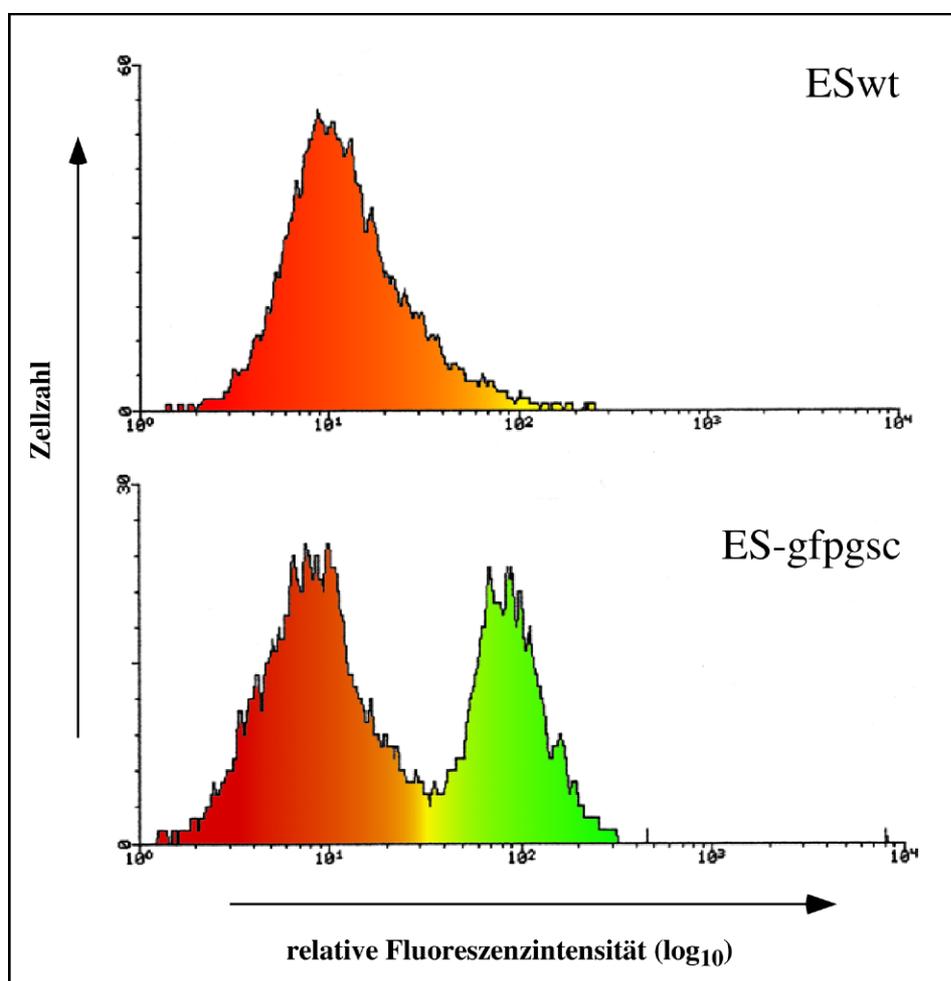


Abbildung 4-10: ES-Zellen, die gfpgsc exprimieren, können in einem Durchflußzytometer sortiert werden. Nach Transfektion mit einem gooseoid-Expressionsplasmid und Selektion mit G418 wurden die erhaltenen ES-Zellkolonien gepoolt und mittels Durchflußzytometrie

analysiert. Es wurden jeweils 10 000 Zellen ausgewertet. Im vorliegenden Histogramm ist die Zellzahl gegen die relative Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen. Da die Messung bei einer Wellenlänge erfolgte, dient die Färbung der Histogramme lediglich der Hervorhebung. Die Zellpopulation unter der roten Fläche entspricht den Wildtyp ES-Zellen, diejenige unter der grünen Fläche dem gfp_{gsc}-positiven Zellpool.

3.2.3. Repressionsassay

Die Tatsache, daß Goosecoid an seinem eigenen Promotor binden kann und somit seine eigene Expression reprimiert (Danilov *et al.*, 1998), kann als funktioneller Nachweis für die Fusionskonstrukte verwendet werden. In transienten Transfektionen wurde das Reporterkonstrukt (2,3 kb *goosecoid*-Promoter der Maus 5' vor dem *Luziferase*-Gen; mr) zusammen mit den Fusions-konstrukten als Effektor in P19 Zellen eingebracht und 40-48 Stunden später auf ihre Luziferase-Aktivität hin untersucht. Das Verhältnis der eingesetzten Menge von Reporter zu Effektor betrug dabei stets 5:1. Der jeweilige Mittelwert von je drei unabhängigen Messungen, sowie deren Standardabweichungen als Fehlerbalken, ist in *Abbildung 4-11* dargestellt. Damit die Werte verschiedener Experimente miteinander vergleichbar sind, wurden die Meßwerte (siehe *Tabelle 4-2*) normalisiert und auf eine konstante Gesamtproteinkonzentration bezogen.

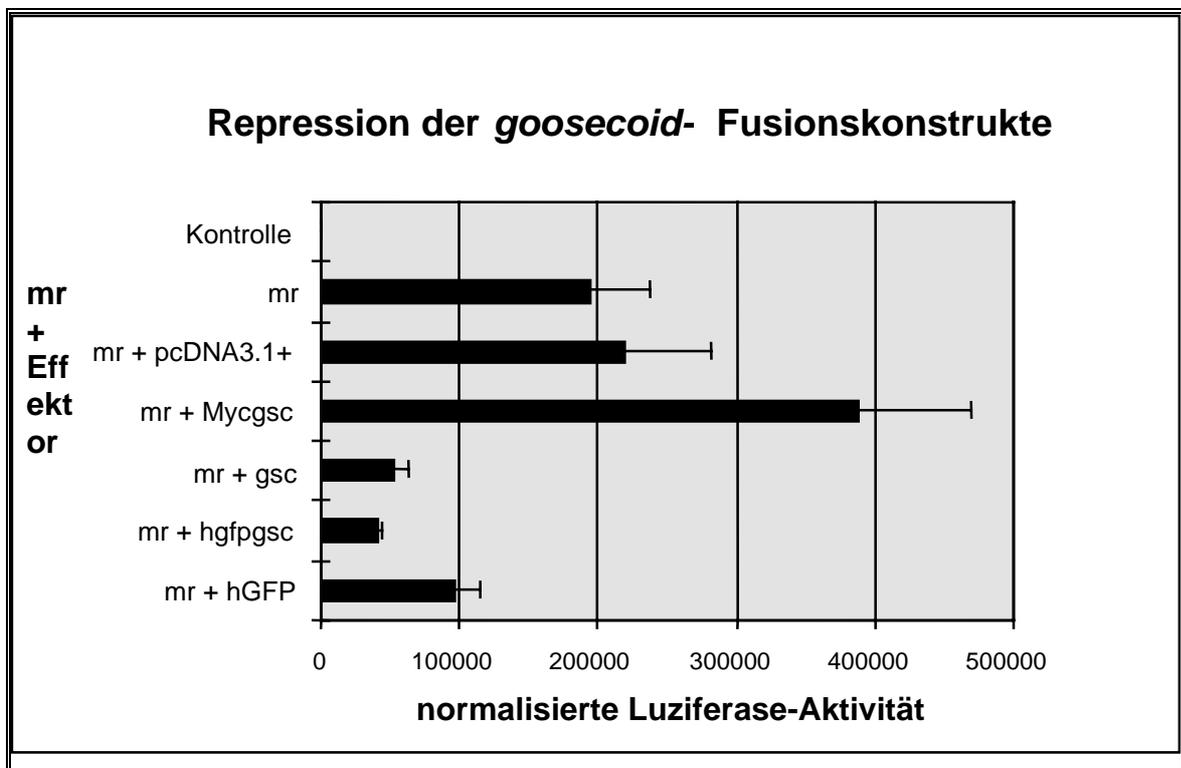


Abbildung 4-11: Repression des goosecoid-Promotors durch goosecoid-Fusionskonstrukte. Transiente Kotransfektion des 2,3 kb großen goosecoid-Luziferase Reporters (mr) mit ver-

schiedenen Fusionskonstrukten in P19 Zellen. Das *gsc*- und das *hgfp_{gsc}*-Effektorplasmid konnten die Aktivität des Reporterkonstrukts bis auf ein Fünftel reduzieren, wohingegen eine Kotransfektion mit einem *Mycgsc*-Effektorplasmids eine zweifache Aktivierung bewirkte. Das *hGFP*-Expressionsplasmid zeigt im Rahmen der Fehlertoleranz keine reduzierte Reporteraktivität.

| Ansatz: <i>mr</i> + Effektor (n = 3) | normalisierte Luziferase- Aktivität | Standardabweichung |
|---|--|--------------------|
| Kontrolle (pT81luc) | 192 | ± 16 |
| <i>mr</i> | 194563 | ± 42716 |
| <i>mr</i> + pcDNA 3.1+ | 219988 | ± 61504 |
| <i>mr</i> + <i>Mycgsc</i> | 389666 | ± 79760 |
| <i>mr</i> + <i>gsc</i> | 52959 | ± 10152 |
| <i>mr</i> + <i>hgfp_{gsc}</i> | 41503 | ± 1836 |
| <i>mr</i> + <i>hGFP</i> | 96762 | ± 17759 |

Tabelle 4-2: tabellarischer Überblick über die gemessene *gooseoid*-Promotor Reporteraktivität mit verschiedenen Effektoren.

Das Expressionsplasmid *CMV-gsc* wies - wie das Fusionskonstrukt *hgfp_{gsc}* - eine 4-5 fache Repression auf. Im Gegensatz dazu konnte das Effektorplasmid für *Mycgsc* sogar eine zweifache Aktivierung hervorrufen. *gooseoid* hat durch die Fusion mit dem "Myc-Tag" die Eigenschaft als Repressor verloren. Eine Kotransfektion mit einem leeren Expressionsvektor zeigte erwartungsgemäß keinen Effekt. Erstaunlicherweise zeigte *hGFP* als Effektor eine zweifache Repression. Dies hängt vermutlich mit der fluoreszierenden Eigenschaft des Proteins sowie des Fusionsproteins zusammen, das die Messung der Lumineszenz beeinflussen könnte.

Die Expression von *hGFP* war im Fluoreszenzmikroskop durch eine deutliche, grüne Fluoreszenz innerhalb der gesamten Zelle zu beobachten. Bei Zellen, die *hgfp_{gsc}* exprimierten, war die Fluoreszenz nur im Zellkern lokalisiert (nicht gezeigte Daten). Dies ist wie die Fähigkeit, die *gooseoid*-Promotoraktivität zu reprimieren, Indiz für die Funktionalität des *hgfp_{gsc}*-Fusionskonstrukts.

Ein anderer Nachweis für die Funktion von *gooseoid* ist die Injektion von mRNA in die ventrale Marginalzone eines 16-Zell *Xenopus* Embryos. Dies führt zur Ausbildung einer zweiten Körperachse. Eine 1998 erschienene Publikation (Ferreiro *et al.*) verglich die Wirkung von *gsc*- mit *Mycgsc*-Transkripten in *Xenopus* Embryonen. Injektionen von *Mycgsc*-mRNA konnten nicht die Ausbildung einer zweiten Körperachse hervorrufen. *Mycgsc* wirkt zum einen als ein transkriptioneller Aktivator und zum anderen als antimorphisches

goosecoid, da es die Entwicklung von dorsalem Mesoderm hemmt und der charakteristischen Dorsalisierung von ventralem Mesoderm in Fehlexpressionsexperimenten von *Wildtyp-goosecoid* entgegenwirkt. Daher bestand bei weiterer Verwendung von "getaggtten" *gsc*-Fusionskonstrukten die Gefahr, falsche Versuchsergebnisse zu erhalten. Aus diesem Grund wurde auf die weitere Verwendung von Fusionskonstrukten verzichtet.

4. *In vitro*-Analyse der Klone

Wie bereits in *Abbildung 4-3* dargestellt, unterscheiden sich die *E-Cadherin*-mRNA Mengen der ES-Zellklone nicht von der der ES-Wildtyp-Zellen; *lim-1*-mRNA ist in keiner Probe nachweisbar.

Die ES-Zellklone 4/4 und 4/10 waren durch ihre *goosecoid*-Expression und ihre veränderte Morphologie von besonderem Interesse.

In einer Reihe von Expressionsanalysen sollte untersucht werden, wie die Expression von *goosecoid* das Zellschicksal der ES-Zellen veränderte, und wie dies durch das Auftreten von bestimmten Markergenen charakterisiert ist. *Abbildung 4-12* faßt die Ergebnisse dieser RT-PCR Analysen zusammen.

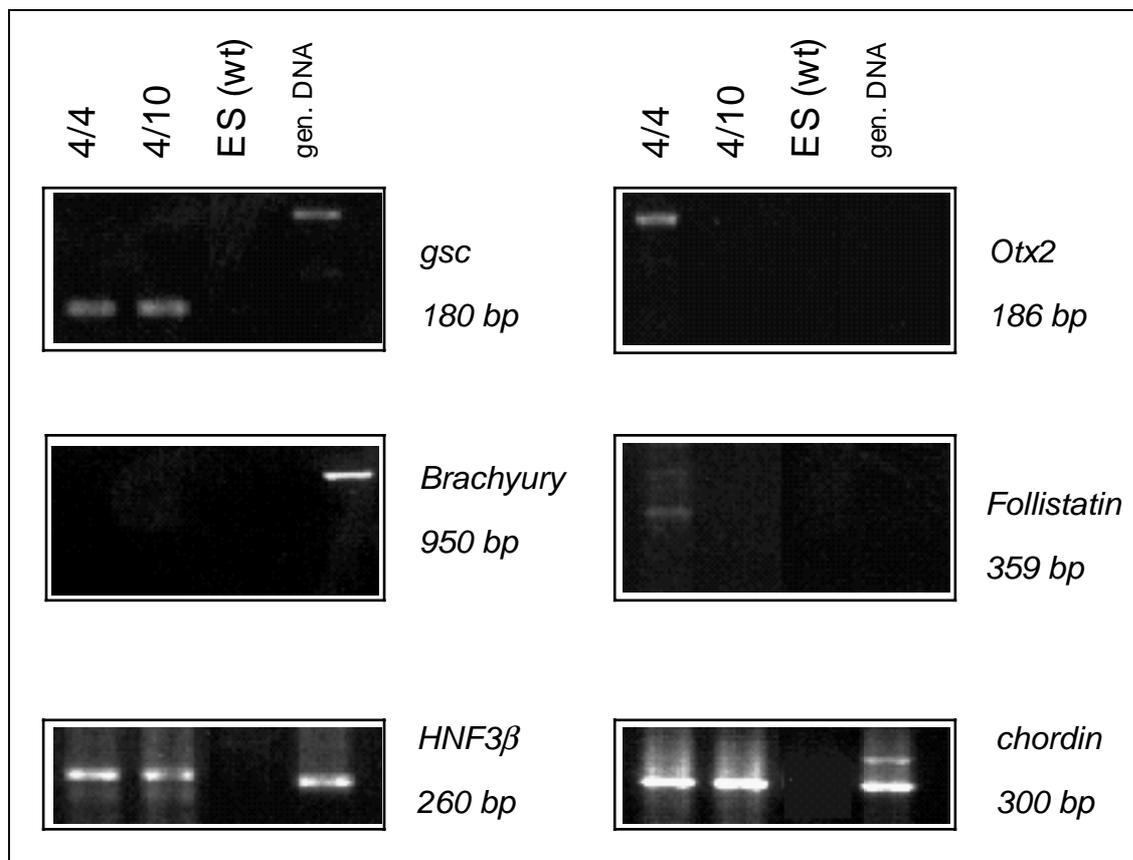


Abbildung 4-12: Expressionsanalyse der ES-Zellklone 4/4 und 4/10 im Vergleich zu den Wildtyp ES-Zellen (ES (wt)) durch RT-PCR. Als positive Kontrolle der PCR-Reaktionen wurde -soweit verfügbar- genomische DNA des Wildtyps verwendet (gen. DNA).

In beiden Klonen ließ sich mRNA für *goosecoid*, *HNF3 β* und *chordin* nachweisen, *Otx2* und *Follistatin* nur in Klon 4/4. Diese mRNAs waren in den Wildtyp-Zellen nicht nachweisbar. Die Klone exprimieren anteriore mesodermale Markergene als Folge von *goosecoid*-induzierter Differenzierung.

HNF3 β ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Familie der "Fork head" Gene gehört (Kaufmann *et al.*, 1996). Er ist ab E6,5 im anterioren Endes des Primitivstreifens in allen drei Keimblättern exprimiert. Innerhalb der folgenden 24 Stunden verlängert sich der Primitivstreifen, wobei die *HNF3 β* -Expression am distalsten Punkt des Eizylinders lokalisiert ist. Dieser Knoten stellt das Maus-Äquivalent zum Spemann'schen Organisator dar.

HNF3 β -"Knock-out"-Mäuse (Ang und Rossant, 1994) sterben am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung an Gastrulationsdefekten, die sich durch einen deformierten Eizylinder und verstreute anteriore Zellen des Primitivstreifens äußern. Eine gemeinsame Rolle von *HNF3 β* und *goosecoid* während der frühen Embryonalentwicklung konnte kürzlich (Filosa *et al.*, 1997) durch doppelt mutante transgene Mäuse gezeigt werden. *HNF3 β* und *goosecoid* stehen in genetischer Wechselwirkung miteinander und regulieren die Entwicklung von Neuralrohr, Kiemenbögen, Herz und Vordarm. Schon ab E6,5 findet man im Embryo Zellen die *HNF3 β* und *goosecoid* exprimieren ausschließlich im anterioren Teil des Primitivstreifens. In dem Zusammenhang war es von besonderem Interesse, die erhaltenen ES-Klone auf *HNF3 β* zu untersuchen.

In Proben beider Klone konnte auch mRNA für *HNF3 β* nachgewiesen werden. Die Expression dieses Markergens legt nahe, daß die Klone 4/4 und 4/10 der anteriorsten Zellpopulation des Primitivstreifens entsprechen.

Das Homöoboxgen *Otx2* und sein *Drosophila*-Homolog *orthodenticle* spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Kopfes und bei den Vertebraten insbesondere bei der Bildung des Gehirns. Das Genprodukt *Otx2* besitzt wie *Goosecoid* eine Homöodomäne der *bicoid*-Klasse (Simeone *et al.*, 1993) und ist bereits ab E5,5 im Epiblasten exprimiert. Ab E7 ist *Otx2* nur noch in Regionen des Mausembryos zu finden, die dem anterioren Neuroektoderm entsprechen. Aus diesen Zellen entwickelt sich das Vorder- und Mittelhirn.

Otx2-"Knock-out"-Mäuse (Acampora *et al.*, 1995) sterben am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung durch fehlende Kopfanlagen des Embryos. Während der Gastrulation waren *goosecoid*- und *lim-1*-Expression nicht nachweisbar und die anteriore Struktur des Knotens

nicht zu finden. In den *Otx2*^{-/-}-Embryonen findet daher die Spezifizierung des anterioren Neuro-ektoderms nicht statt.

In *Xenopus*-Embryonen gleichen sich die räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster von *Xotx2* und *gooseoid* im anterioren Mesoderm. Die Injektion von *gooseoid*-mRNA in ein ventrales Blastomer in einem *Xenopus*-32-Zell-Embryo führt zur ektopischen Expression von *Xotx2*. Manipulationen an *Xenopus*-Embryonen, die die *gooseoid*-Expression verändern (LiCl, UV, all-trans-Retinsäure, Aktivin und *Xwnt8*) betreffen auch die Expression von *Xotx2*. Die Autoren (Blitz und Cho, 1995) folgern daraus, daß *Xotx2* ein Zielgen von *gooseoid* sein könnte.

Daher lag es nahe, die *gsc*-Klone auf *Otx2*-Expression hin zu untersuchen. *Otx2* war nur in Klon 4/4 exprimiert und konnte weder in *gooseoid*-Klon 4/10 noch in *Wildtyp*-HM-1 Zellen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den Transkriptionsfaktoren Lim-1, HNF3 β , *Otx2*, *Gooseoid* und *Brachyury* sind *Follistatin* und *Chordin* dorsale Signalmoleküle des Organisators mit Potential zur neuralen Induktion. Diese Proteine können durch ektopische Expression im "*Xenopus* animal cap assay" neurales Gewebe ohne die Anwesenheit von Mesoderm induzieren (Hemmati-Brivanlou *et al.*, 1994; Sasai *et al.*, 1994).

Von *chordin* weiß man, daß seine Expression durch *gooseoid* induziert wird (Sasai *et al.*, 1994). Daher ist zu erwarten, daß *gooseoid* -ES-Zellklone *chordin* exprimieren. Wie aus *Abbildung 4-12* ersichtlich, konnten *chordin*-Transkripte in beiden Klonen durch RT-PCR Analyse nachgewiesen werden. Das neurale Signalmolekül des Organisators *Follistatin* war hingegen nur in Klon 4/4 exprimiert.

Das *Brachyury*-Gen ist wichtig für die normale Ausbildung von Mesoderm und der antero-posterioren Achse (Herrmann *et al.*, 1990). Es ist in Mausembryonen ab Tag 6,5 in mesodermalen Zellen des Primitivstreifens exprimiert. Mausembryonen, die homozygot für eine Deletion im *T*-Lokus sind, produzieren nur ein ungenügend ausgebildetes Primitivstreifen-mesoderm (Glücksohn-Schönheimer, 1944). Die Ausbildung des Notochord ist gestört, bevor die anterioposteriore Achse ausgebildet ist. *Brachyury*, das Markergen für Primitiv-streifenmesoderm, war weder in den Proben für die Klone noch in den *wildtyp* ES-Zellen nachweisbar.

Die Klone exprimieren anteriore, mesodermale Markergene als Folge von *gooseoid*-induzierter Differenzierung. Da Klon 4/4 zusätzlich die anterioren, neuroektodermalen Markergene *Otx2* und *Follistatin* exprimierte, entspricht er einer mehr anterior gelegenen Zellpopulation.

5. Repression der *Brachyury*-Expression durch *gooseoid*

In Zusammenarbeit mit Diane Boucher (UCSF, San Francisco, USA) wurden ES-Zellklone hergestellt, die *gooseoid* stabil unter der Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV)-Promotors exprimieren. JM-1 Zellen (Miettinen *et al.*, 1995) wurden mit 10 µg *Pvu* I linearisierten *CMV-gsc* Plasmid elektroporiert, das zusätzlich ein *Neomycin*-Resistenzgen unter der Kontrolle des Rous Sarcoma Virus (RSV) Promotors enthielt (Boucher *et al.*, eingereicht). Zur Kontrolle wurden JM-1 Zellen mit dem leeren Expressionsvektor transfiziert.

Neben der Kontrolle (c1) wurden nach der Selektionsprozedur *gooseoid*-exprimierende Klone isoliert, von denen drei (g185, g191, g202) repräsentativ *in vitro* und *in vivo* (Boucher *et al.*, eingereicht) untersucht wurden.

5.1 Vergleich der Expressionsniveaus von *Brachyury* und *gooseoid* in ES-Zellklonen durch semiquantitative RT-PCR

Um herauszufinden, ob die *gooseoid*-Expression in ES Klonen mit einer Veränderung der Genexpression von Markergenen für den Primitivstreifen verbunden ist, wurden der Kontrollklon c1 und die drei stabilen *gooseoid*-Klone auf *Brachyury*-Transkripte hin untersucht.

Semiquantitative Analysen mit radioaktiver RT-PCR zeigten, daß der Kontrollklon weder *gooseoid* noch *Brachyury* exprimierte (Abbildung 4-13). Die Menge der *gooseoid*- und *Brachyury*-mRNAs waren in den Klonen g185 und g191 gleich groß, während der dritte Klon g202 ein 57-fach höheres *gooseoid*-Niveau hatte und *Brachyury*-Transkripte kaum nachweisbar waren.

Diese Ergebnisse zeigen eine inverse Korrelation der Aktivitäten dieser beiden Gene und legen nahe, daß *gooseoid*-Expression in ES-Zellen in einem anderen Zellschicksal resultiert als das des Primitivstreifenmesoderms, was durch *Brachyury*-Expression charakterisiert ist.

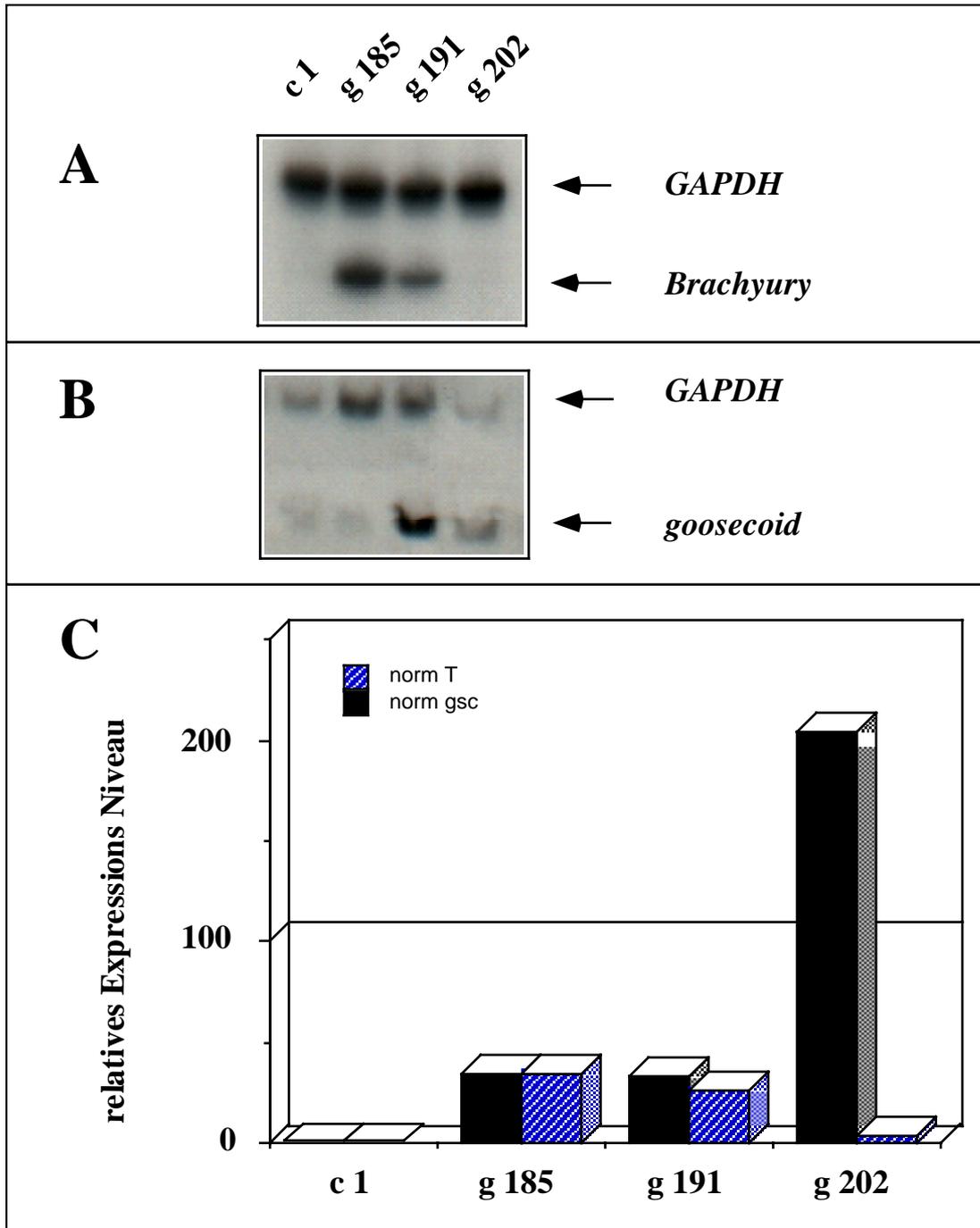


Abbildung 4-13: Inverse Korrelation von *Brachyury*- und *goosecoid*-Transkript-Mengen in ES-Zellklonen, die mit Kontroll-(c1) oder *goosecoid*-Expressionsplasmid transfiziert wurden (g185, g191, g202). Die mRNA-Konzentrationen wurden durch semi-quantitative RT-PCR für *Brachyury* (A) und *gsc* (B) bestimmt. Die Werte wurden zu den GAPDH-mRNA-Konzentrationen normalisiert (C, alle Werte für GAPDH=100). Auffällig war, daß in Klon g202, der das höchste Expressionsniveau für *goosecoid* zeigte, keine *Brachyury*-mRNA nachweisbar war.

5.2 Analyse des *Brachyury*-Promotors der Maus

5.2.1 Vergleich von *Brachyury*-Promotersequenzen von Maus und *Xenopus*

Kürzlich zeigten zwei Studien, daß *goosecoid* als ein Repressor der *Brachyury*-Transkription in *Xenopus* fungiert (Artinger *et al.*, 1997; Latinkic *et al.*, 1997). Die inverse Korrelation der Transkriptmengen, wie in *Abbildung 4-13* gezeigt, deutet darauf hin, daß ein solcher Mechanismus auch in der Maus existieren könnte.

Ein Vergleich der Promotorregion des *Brachyury* Gens in Frosch und Maus ließ keinen signifikanten Grad an Konservierung erkennen (*Abbildung 4-14*).

Die Konservierung war auf fünf (I-V) Regionen beschränkt, die potentielle Konsensus-Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren wie LEF-1, caudal, HNF3, CAAT-Box und Homöoboxgene enthielten. Insbesondere die *goosecoid*-Bindungssequenz, die von Artinger *et al.* (1997) identifiziert wurde und durch die die *Brachyury* Repression abläuft, war nicht konserviert (*Abbildung 4-14*; Region V).

Abbildung 4-14 (folgende Seite)

Vergleich der Brachyury-Promotor Sequenzen von Maus und Xenopus.

Die Sequenzen sind bis zum Startcodon (ATG) aufgelistet. Maus- und Xenopus-Sequenzen (Genbank-Nummer: U61531 und AF007123) wurden miteinander verglichen und in Bezug auf die Transkriptionsstartstelle nummeriert (Pfeil). Die konservierten Nukleotide sind mit Großbuchstaben kenntlich gemacht (Konsensus). Die Konservierung ist auf fünf Regionen begrenzt (I-V) und durch graue Kästchen markiert. Potentielle Bindestellen für Transkriptions-faktoren (LEF-1, HNF3, CAAT-Box, und caudal) sind extra hervorgehoben. Sternchen () markieren Konsensus Homöobox- Bindestellen (TAAT und ATTA); diejenigen, die nicht konserviert sind, wurden unterstrichen. Mögliche LEF-1 Stellen, die nicht zwischen*

Maus und Frosch konserviert sind, wurden durch einfache, transparente Kästchen gekennzeichnet.

| | | | | | | | | | | |
|---------------|------|-------------|-------------|-------------|------------|------------------|------------|------|--|--|
| LEF-1? | | | | | | | | | | |
| Maus | -499 | ccgcgGggca | aaGtgcgAgg | cgcCggtGtg | cgCTtggAcA | gcGcgTGggA | -450 | | | |
| Xenopus | -365 | attatGt | cat ttGaa | caAtc | tatCcagGcc | acCTaaaAtA | taGaaTGatA | -316 | | |
| Consensus | | -----G----- | -----G----- | -----A-- | ---C---G-- | --CT---A-A | --G--TG--A | | | |
| | | | | | | | | | | |
| Maus | -449 | gtGgagagtt | taGcagtgGc | TctagGagcc | aggGTcctgg | GtgGctccag | -400 | | | |
| Xenopus | -315 | aaGtgaccag | gtGtcagttC | TtactGgatg | taaGTttatt | GaaGgcaggc | -266 | | | |
| Consensus | | --G----- | --G----- | C | T---G--- | ---GT----- | G--G----- | | | |
| | | | | | | | | | | |
| LEF-1? | | | | | | | | | | |
| Maus | -399 | cccGGcttct | cGccctcCct | cCCcCagggT | CcgccC | GCc CTTTGATggA | -350 | | | |
| Xenopus | -265 | tggGGggggg | gGggtgaCac | aCCaCttccT | CattgCa | GCt CTTTGATatA | -216 | | | |
| Consensus | | ---GG----- | -G----- | C-- | -CC-C---- | T C----C-GC- | CTTTGAT--A | | | |
| | | | | | | | | | | |
| HNF-3 | | | | | | | | | | |
| Maus | -349 | GGTGAAACA | TTTGGGGgag | ggCgggggtg | tCgggactgc | gcCcgacgct | -300 | | | |
| Xenopus | -215 | GGTGTAAACA | TTTGGGGatt | taCataaagt | aCctctgact | tgCaattaa | -166 | | | |
| Consensus | | GGTG-AAACA | TTTGGGG | --- | -C----- | -C----- | --C----- | | | |
| | | | | | | | | | | |
| Maus | -299 | TTCCttacAg | gAagcgcGcG | CTggagccca | TTgtTGgcCc | CCAgcCtcCg | -250 | | | |
| Xenopus | -165 | TTCCcaggAt | tAtcataGaG | CTctctgggg | TTtcTGtgCt | CCAatCagCa | -116 | | | |
| Consensus | | TTCC----A- | -A-----G-G | CT----- | TT--TG--C- | CCA--C--C- | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| LEF-1? | | | | | | | | | | |
| Maus | -249 | GgccCgcCcg | gccagTctgA | cAcggccgcG | caccg | CCAAT GgGCagcTGC | -200 | | | |
| Xenopus | -115 | GttgCctCac | caa caTcaA | gAgaaaaactG | a.... | CCAAT GaGC...TGC | -73 | | | |
| Consensus | | G---C--C-- | -----TC--A | -A----- | G | -----CCAAT | G-GC---TGC | | | |
| | | | | | | | | | | |
| LEF-1 | | | | | | | | | | |
| Maus | -199 | tcGGtA | Cttc aaagg | TGtc | ccgcCCAatc | cgccgcacccc | CcTGCcGAGG | -150 | | |
| Xenopus | -72 | ctGGcACcgC | cgttGaTGaa | gacaCCAacag | | CtTGtCcAGG | -33 | | | |
| Consensus | | --GG-AC--C | ----G-TG-- | ---- | CCA--- | ----- | C-TG-C-AGG | | | |
| | | | | | | | | | | |
| caudal | | | | | | | | | | |
| Maus | -149 | CCaccacggc | tgTATTTATG | GggagGgGAc | ccAttttTCT | CTtcCccaga | -100 | | | |
| Xenopus | -32 | CC..... | TATTTATG | GaagaGtGAa | atA...TCT | CTatCt.... | -1 | | | |
| Consensus | | CC----- | TATTTATG | G---- | G-GA- | --A---TCT | CT--C----- | | | |
| | | | | | | | | | | |
| Maus | -99 | gacttactct | tgtgccgcct | tgcgggagtt | caagtggagc | cacggctccc | -50 | | | |
| Xenopus | | | | | | | | | | |
| Consensus | | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| Maus | -49 | caggccctct | ccccatccc | cgcccccttc | ccccctcacc | ccgatctcTg | +1 | | | |
| Xenopus | | | | | |Ta | +2 | | | |
| Consensus | | ----- | ----- | ----- | ----- | -----T- | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| TAAT | | | | | | | | | | |
| Maus | +2 | gTgcT..Cct | TTggcgaatg | tgcagggacc | cagggt | TAAT cTttgggctc | +49 | | | |
| Xenopus | +3 | aTcaTgcCtc | TTattcccc. | | | TAAT gTcaattgga | +35 | | | |
| Consensus | | -T--T--C-- | TT----- | ----- | ----- | TAAT -T----- | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| IV | | | | | | | | | | |
| Maus | +50 | cgcAgagtga | cCc..... | | tTTTTcTT.. |GGA | +73 | | | |
| Xenopus | +36 | tttActacct | gCtgatcaat | cgcaccttgg | gTTTTgTTcc | gattagtGGA | +85 | | | |
| Consensus | | ---A----- | -C----- | ----- | TTTT--TT-- | -----GGA | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| V | | | | | | | | | | |
| Maus | +74 | AAAGCgGtgg | cgAgagaagt | gaagGTggcT | GTtgggtagg | gagtcAAGaC | +123 | | | |
| Xenopus | +86 | AAAGCtGcta | aaAtttttcc | cccaGTctgT | GTgttacg.. |AAGcC | +128 | | | |
| Consensus | | AAAGC-G | ---A----- | ----GT---T | GT----- | -----AAG-C | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| Maus | +124 | TCctggaagg | tggagaggggt | ggcGGgagGgA | TG | +155 | | | | |
| Xenopus | +129 | TCCctttct. | | ...GGagGaA | TG | +146 | | | | |
| Consensus | | TCC----- | ----- | ---GG--G-A | TG | | | | | |

5.2.2. *gooseoid* wirkt als Repressor der *Brachyury*-Transkription in der Maus.

Clements *et al.* (1996) stellten transgene Mäuse her, die *lacZ* unter der Kontrolle des proximalen *Brachyury*-Promotors (von -500 bis +150 in bezug zur Startstelle der *Brachyury*-Transkription), exprimierten. Die Expression des β -Galaktosidase-Proteins war nur im Primitivstreifen nachweisbar. Das Promotor-Fragment, das diese spezifische Expression reguliert, wird daher Primitivstreifen-Enhancer genannt. Die Sequenzen, die für die *Brachyury*-Expression im Knoten und im Notochord benötigt werden, liegen weiter 5' im *Brachyury*-Promotor.

Mit einem Maus-*Brachyury* Reporterkonstrukt, das die 650 bp des Primitivstreifen-Enhancers (Clements *et al.*, 1996) 5' des *Luziferase* Reportergens enthält, sollte die Frage geklärt werden, ob auf Promotorebene ein direkter Zusammenhang zwischen *gooseoid*-Expression und *Brachyury*-Repression besteht.

Nach transienter Transfektion und Induktion mesodermaler Differenzierung mittels DMSO war das Reporterkonstrukt in P19 Zellen aktiv. Kotransfektion mit einem *gooseoid*-Expressions-plasmid resultierte in einer moderaten zwei- bis dreifachen, aber deutlichen Reduktion der Reportergen-Aktivität (Abbildung 4-15; Werte in Tabelle 4-3).

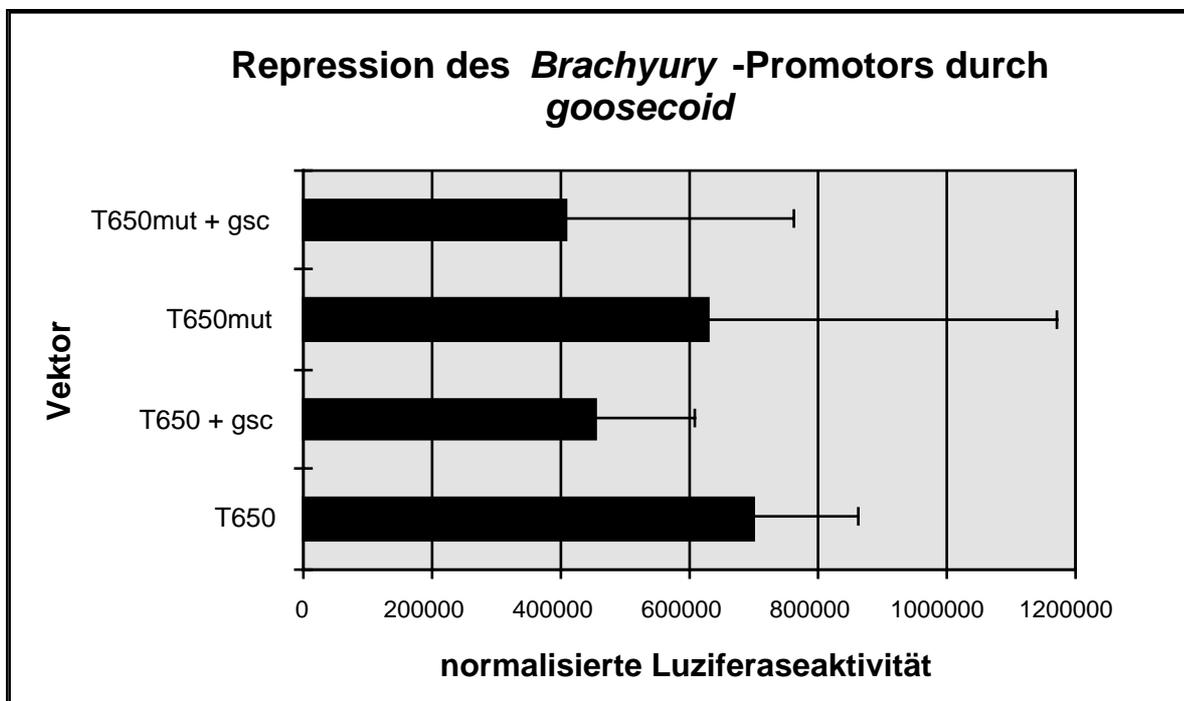


Abbildung 4-15: Repression der *Brachyury*-Transkription durch *gooseoid*.
 Transiente Transfektion eines 650 bp *Brachyury* Luziferase Reporterkonstrukts (T650) mit

bzw. ohne *goosecoid* Effektorplasmid (*gsc*) in P19 Zellen im Vergleich zum mutierten Reporter T650mut; (Bereich IV wurde gegen ACTG ausgetauscht). Mit beiden Reporterkonstrukten konnte ein vergleichbarer Repressionseffekt beobachtet werden.

| T-Promotor-Konstrukt Ansatz (n=6) | normalisierte Luziferase- Aktivität | Standardabweichungen |
|--------------------------------------|--|----------------------|
| T650mut + <i>gsc</i> | 410344 | ± 352805 |
| T650mut | 627729 | ± 543669 |
| T650 + <i>gsc</i> | 456202 | ± 153231 |
| T650 | 701655 | ± 159424 |

Tabelle 4-3: Repression der *Brachyury*-Transkription durch *goosecoid*.
Erhaltene Werte aus 6 Messungen .

Eine genauere Analyse des *Brachyury*-Promotors der Maus zeigte nur eine potentielle Homöo-box-Bindesequenz TAAT bzw. ATTA, wohingegen fünf dieser Bindestellen im *Xenopus*-Promotor vorhanden sind (Abbildung 4-14). Dieses Element war als einziges zwischen Maus und Frosch konserviert (Region IV, umrandet und mit einem * markiert). Die TAAT-Stelle im 650 bp Promotor wurde zu ACTG mutiert um in transienten Transfektionen zu analysieren, ob der Effekt durch *goosecoid*-Koexpression in P19 Zellen noch beobachtbar war.

Wie in Abbildung 4-15 zu erkennen ist, konnte die Aktivität des mutierten Reporterkonstrukts trotz Kotransfektion mit *goosecoid* reprimiert werden. Dies deutet auf einen anderen Repressionsmechanismus hin - über andere Bindestellen oder indirekt durch andere Faktoren.

5.2.3 Analyse von Längenmutanten des *Brachyury*-Promotors

Um die Rolle der einzelnen Bereiche im 650 bp *Brachyury*-Promotor zu untersuchen, wurden fünf Längenmutanten hergestellt, die den *Brachyury*-Promotor schrittweise um ca. 100 bp verkürzen (535, 441, 334, 238 und 144 bp). Die verwendeten Reporterkonstrukte sind in Tabelle 4-4 aufgelistet.

In transienten Transfektionen dieser oben genannten Konstrukte und nach DMSO induzierter, mesodermaler Differenzierung wurden die Ergebnisse mit und ohne Kotransfektion von *goosecoid* miteinander verglichen.

Brachyury-Promotor Reporter-Konstrukte, Übersicht über die Längenmutanten

| Name des Konstrukts | Promotorbereich | Länge in [bp] | Deletion in [bp] zum Wildtyp | Besonderes |
|---------------------|-----------------|---------------|------------------------------|---|
| T | -500 bis +150 | 650 | 0 | Wildtyp=Primitivstreifen-Enhancer |
| T650 | -500 bis +135*) | 634 | 16 | *) durch PCR-Klonierung bedingt |
| T535 | -401 bis +135*) | 535 | 115 | " |
| T441 | -307 bis +135*) | 441 | 209 | " |
| T334 | -200 bis +135*) | 334 | 316 | " |
| T238 | -104 bis +135*) | 238 | 412 | " |
| T144 | - 10 bis +135*) | 144 | 506 | " |
| Tmut | -500 bis +135*) | 634 | 16 | Punktmutation an Position +62 TAAT zu ACTG |

Tabelle 4-4: Tabellarische Übersicht über die verwendeten Brachyury-Promotor Reporter-Konstrukte und ihre Längenmutanten. Durch geeignete Oligonukleotide wurde der Wildtyp Brachyury-Promotor (T650) in PCR-Reaktionen schrittweise um ca. 100 Basen verkürzt. Durch die hinzugefügten Restriktionsschnittstellen (5'-: BamH I und 3'-: HinD III) konnten die Promotor-Längenmutanten in den pT81luc-Vektor (Anhang) kloniert werden. Durch die Einführung der HinD III-Schnittstelle wurde ein um 16 bp kürzerer T-Promotor erhalten. Die Promotoren regulierten die Expression des Luziferase-Gens. Die Positionen im Promotor sind in bezug auf die Transkriptionsstartstelle nummeriert (vergl. auch Abbildung 4-14).

Da sich die Basalaktivitäten der Promotor-Konstrukte mit abnehmender Länge verringerten, wurden die bei der Auswertung erhaltenen Daten für die Reporterstrukturen allein (Tx) auf 100% gesetzt und die entsprechenden Werte für die Kotransfektion mit *gooseoid* berechnet (Abbildung 4-16)

Zwischen dem längsten Reporterkonstrukt T634 und dem um 99 bp kleineren T535 nimmt die Reporteraktivität bei der Kotransfektion mit *gooseoid* von 65% auf 47% ab. Von allen Reporterkonstrukten wies nur T441 keine Repression (100%) durch *gooseoid* auf. Der um 107 bp kleinere Promotorreporter (T334) konnte am stärksten durch *gooseoid* reprimiert werden; seine Reporteraktivität betrug nur noch 35% im Vergleich zur Transfektion ohne *gooseoid*. Weitere Deletionen um 107 bp und 94 bp resultierten nicht in einem weiteren Verlust, sondern führten zu einem Anstieg der normierten Reporteraktivität (T238: 43%; T144: 66%).

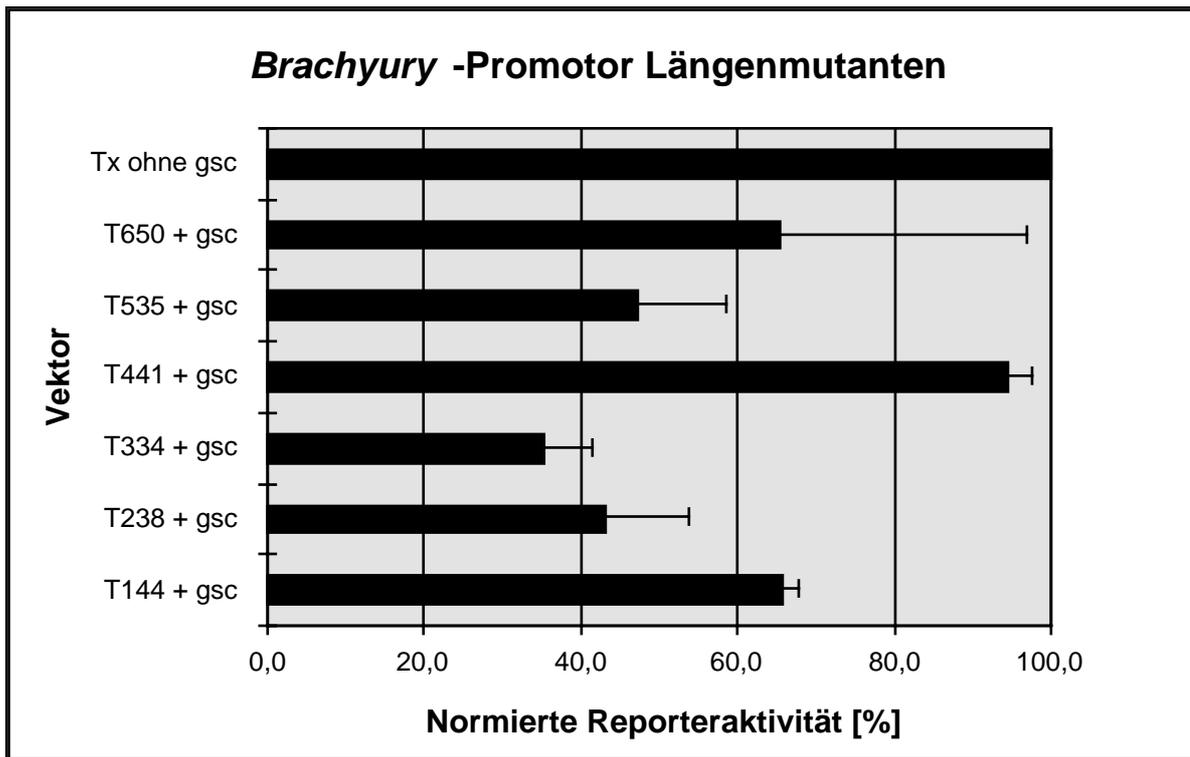


Abbildung 4-16: Brachyury-Promotor Längenmutanten (T, Länge in bp) und ihre Reporteraktivität im Vergleich. Transiente Kotretransfektion von Brachyury-Promotor Reporterkonstrukten mit einem gsc-Expressionsplasmid in P19 Zellen. Die Werte für die Reporterkonstrukte ohne goosecoid (Tx -ohne gsc) wurden auf 100% gesetzt. Im Gegensatz zu allen anderen Brachyury-Promotor Längenmutanten ließ sich Reporter T441 nicht durch gsc reprimieren.

| T-Promotor-Mutante Ansatz (n=6) | normierte Luziferase- reporteraktivität [%] | Standardabweichung |
|------------------------------------|--|--------------------|
| Tx ohne gsc | 100,00 *) | k.a. *) |
| T650 + gsc | 65,33 | ± 31,73 |
| T535 + gsc | 47,10 | ± 11,36 |
| T441 + gsc | 94,43 | ± 3,05 |
| T334 + gsc | 35,39 | ± 6,14 |
| T238 + gsc | 43,00 | ± 10,60 |
| T144 + gsc | 65,69 | ± 2,22 |

Tabelle 4-5: tabellarischer Überblick der erhaltenen Werte der Reporteraktivität von Brachyury-Promotor Längenmutanten (T, Länge in bp) mit gleichzeitiger goosecoid-

Expression.

**)Die Werte für die Reporteraktivität der Promotoren ohne gooseoid wurden auf 100% gesetzt, daher konnte kein Wert für die Standardabweichung angegeben werden (k.a.).*

Nach den vorliegenden Ergebnissen befinden sich die Promotorbereiche, die offenbar für die Repression durch *gooseoid* verantwortlich sind, zwischen den Positionen -401 und -308 sowie -200 und -105, bezogen auf die Transkriptionsstartstelle. Der Promotorbereich von -307 bis -200 enthält eine CAAT-Box und ist aus diesem Grund wahrscheinlich für die Aktivierung des Promotors verantwortlich.

Diskussion

V. Diskussion

1. ES-Zellklone, die stabil *gooseoid* exprimieren, verändern ihre Morphologie

Die untersuchten *gsc*-ES-Klone 4/4 und 4/10 fielen durch ihre veränderte Morphologie auf. Anders als *Wildtyp*-ES-Zellen wuchsen sie nicht in Kolonien, die eine deutliche Abgrenzung aufwiesen, sondern vereinzelt in klar erkennbaren Zellen mit mesenchymalem, fibroblastenähnlichem Aussehen. Die Zellen haben ihren engen Zell-Zell-Kontakt verloren. Für diese Anheftung von Zellen aneinander sind Zelladhäsionsmoleküle verantwortlich.

Die Differenzierung von *Wildtyp*-ES-Zellen und den *gsc*-ES-Klonen 4/4 und 4/10 in Bakterien-schalen führten in allen Fällen zur Ausbildung morphologisch normaler embryoider Körperchen ("*embryoid bodies*"). Der einzig auffällige Unterschied zu *Wildtyp*-ES-Zellen bestand in der zusätzlichen Fähigkeit der Klone, am Schalenboden anzuheften. Diese Beobachtung deutet ebenfalls auf eine veränderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen hin.

E-Cadherin ist ein Adhäsionsmolekül, das während der frühen Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielt (Larue *et al.*, 1996). Deswegen wurden die Zellklone auf veränderte *E-Cadherin*-Expression untersucht. Da die *E-Cadherin*-mRNA Konzentration der Klone sich nicht von der der ES-*Wildtyp*-Zellen unterschied, müssen andere Faktoren für die Veränderung der Zellen verantwortlich sein.

Eine epitheliale Zelle zeigt eine strukturelle und funktionelle Asymmetrie, die auch apikal-basale Polarität genannt wird. Die Plasmamembran besteht aus drei unterscheidbaren Bereichen. Ihre freie Seite bzw. apikale Domäne ist z.B. mit Mikrovilli oder Cilien besetzt. Die laterale (seitliche) Domäne ist für Wechselwirkungen mit den benachbarten epithelialen Zellen verantwortlich. Die Zelladhäsion wird durch sog. undurchlässige Verbindungen (tight junctions), kommunizierende Verbindungen (sog. gap-junctions) sowie durch Haftverbindungen (z.B. Desmosomen) vermittelt. Die basale Domäne "verankert" die Zelle durch spezifische Rezeptorproteine an die Basallamina. Die korrekte Verteilung neu synthetisierter Proteine an die entsprechenden Domänen scheint verantwortlich für den Prozeß der Bildung und Aufrechterhaltung der zellulären Asymmetrie zu sein (Reichmann *et al.*, 1992; Simons und Fuller 1985). Während eines epithelial-mesenchymalen Überganges sind die Zellhaftproteine zwar noch nachweisbar, jedoch können sie nicht mehr an ihre funktionellen Orte verteilt werden. Letztendlich verschwinden diese epithelialen Marker nach der Etablierung des mesenchymalen Phänotyps vollständig (Reichmann *et al.*, 1992).

Vermutlich ist aber gerade aus diesem Grund eine Reduktion der *E-Cadherin*-Expression nicht nötig, um den beschriebenen Effekt hervorzurufen. Es könnten daher zwei unterschiedliche Gründe zu den unveränderten *E-Cadherin*-Expressionsniveaus in den *gooseoid*-Klonen geführt haben.

Reichmann *et al.* (1992) führten durch experimentelle Induktion einen epithelial-mesenchymalen Übergang in Epithelzellen durch. In den *Wildtyp*-Zellen war die *E-Cadherin*-Expression auf die lateralen Seiten beschränkt. Nach der Induktion war dieses Zelladhäsionsmolekül ausschließlich auf der apikalen und der basalen Seite nachweisbar. Obwohl die Zellen weiterhin *E-Cadherin* exprimieren, kann die epitheliale Morphologie nicht aufrechterhalten werden. Dies könnte auch bei den *gooseoid*-ES-Klonen der Fall sein, falls *gooseoid* den intrazellulären Verteilungsmechanismus stört.

Der zweite Grund könnte mit der Funktion der intrazellulären Domäne von E-Cadherin und den beteiligten Kofaktoren zusammenhängen:

Die intrazelluläre Domäne des Adhäsionsmoleküls bildet zusammen mit α -, β - und γ -Catenin (Plakoglobin) einen Komplex und verbindet so E-Cadherin mit dem Aktinfilamentennetzwerk der Zelle. Ohne die Catenine können die Cadherine ihre Zelladhäsionsfunktion nicht ausführen (Nagafuchi *et al.*, 1988). β -Catenin kommt in diesem Zusammenhang eine Schlüsselrolle zu. Seine hohe Homologie in der Aminosäuresequenz (70%) zu dem *Drosophila* Segmentpolaritäts-Genprodukt Armadillo zeigte, daß β -Catenin, wie sein Homolog, an entwicklungsbiologischen Vorgängen und Signaltransduktionswegen beteiligt sein könnte (McCrea *et al.*, 1991). Untersuchungen von Birchmeier *et al.* (1993) zeigten, daß die Wechselwirkung zwischen Cadherinen und Cateninen Auswirkungen auf die Zelladhäsion, Zellwanderungen und auf den epithelialen Phänotyp in der Embryonalentwicklung und der Tumorentstehung hat.

Im Ausgangszustand - ohne äußeres Signal - bindet das Adenomatous Polyposis coli Tumorsuppressorprotein (APC) freies β -Catenin. Durch das Protein Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) wird der APC/ β -Catenin-Komplex phosphoryliert und ubiquitiniert, so daß sein Abbau über den Proteosomen-Reaktionsweg gefördert wird. Dies sorgt für eine geringe Konzentration an zytosolischem, freiem β -Catenin, während der Cadherin-Catenin-Komplex stabil ist. Durch ein äußeres Signal, die Bindung des Wnt-1 Proteins an seinen Rezeptor, wird die Funktion von GSK-3 durch die Aktivierung von dishevelled (dsh) gehemmt. Dies führt zu einer längeren Halbwertszeit des APC/ β -Catenin-Komplexes und zu einem geringeren Abbau an β -Catenin. Die Zellen benötigen β -Catenin zur Übertragung des extrazellulären Wnt-1 Signals. Versuche in *Xenopus* Embryonen zeigten, daß β -Catenin-, wie *Wnt-1*-Injektionen, zur Ausbildung einer zweiten Körperachse führen. Ektopische Expression hoher *E-Cadherin*-

mRNA Niveaus wirken dem entgegen (Fagotto *et al.*, 1996). Die Ansammlung von freiem β -Catenin im Zytosol fördert die Bindung an den HMG-Box Transkriptionsfaktor LEF-1 und die Translokation in den Zellkern. Der LEF-1/ β -Catenin-Komplex bildet mit der DNA eine ternäre Struktur, die die DNA verbiegt (Behrens *et al.*, 1993) und zur Stimulierung der Expression mesenchymaler Gene (Huber *et al.*, 1996; Miller & Moon, 1996; Barth *et al.*, 1996) führt.

In *Xenopus* konnten zwei Zielgene des LEF-1/ β -Catenin-Komplexes identifiziert werden, für die jedoch noch kein Maus homolog gefunden wurde: *Siamois* (Lemaire *et al.*, 1995) und *Twin* (Laurent *et al.*, 1997). *Siamois*, ein Wnt-induzierbares Homöoboxgen, spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung des Spemann'schen Organisators (Fan *et al.*, 1997). Es kann durch ventrale Expression eine ektopische Körperachse induzieren und nach Explantation des Ektoderms ektodermale, mesodermale Markergene aktivieren. Sein Promotor enthält eine LEF-1 Bindestelle, die seine Expression reguliert (Fan *et al.*, 1998). Auch *Twin* kann durch den LEF-1/ β -Catenin-Komplex aktiviert werden. Es verursacht, ebenso wie *Siamois*, zu dem es eine ca. 50%ige Aminosäuresequenzhomologie hat, eine zweite Körperachse. Laurent *et al.* (1997) belegten, daß *Twin* *gooseoid* aktiviert, indem es an das "Wnt-Response"-Element (Watabe *et al.*, 1995) im *gooseoid*-Promotor bindet.

Im vorliegenden Fall der *gooseoid*-exprimierenden ES-Zellklone zeigten die morphologisch veränderten Zellen keine Veränderung in ihrem *E-Cadherin*-mRNA-Niveau gegenüber *Wildtyp*-Zellen. Daraus allein lassen sich allerdings keine Schlüsse ziehen, ob dieses Zelladhäsions-molekül seine Funktion ausüben kann oder nicht. Vorhandenes E-Cadherin ist eine erforderliche, aber keine hinreichende Bedingung für seine Funktion als Zelladhäsionsmolekül. Es muß zusätzlich über die oben beschriebenen Catenine mit dem Aktinfilamentgerüst der Zelle verbunden sein.

Eine vergleichende Analyse über die Expression und die Lokalisation von β -Catenin könnte weitere Erkenntnisse liefern, ob E-Cadherin und folglich auch β -Catenin an dem veränderten Schicksal der *gooseoid*-Zellen beteiligt sind. Larue *et al.* (1996) diskutierten eine inverse Korrelation zwischen *E-Cadherin*- und *Brachyury*-Expression in ES-Zellen.

Die Tatsache, daß in den Zellklonen kein *Brachyury* nachweisbar und die *E-Cadherin*-Expression unverändert hoch war, legt den Schluß nahe, daß durch die Repression der *Brachyury*-Expression durch *gooseoid* *E-Cadherin* nicht reprimiert werden konnte.

Da *gooseoid*, wie jedoch nur für *Xenopus* belegt ist, "downstream" dieser Vorgänge liegt, sind die beobachteten Effekte vermutlich allein auf die ektopische Expression dieses Homöoboxgens zurückzuführen.

Die beobachteten Effekte könnten auf die Integrationsstelle des Transgens in das Genom der Zelle zurückzuführen sein. Daher wurden HM-1 ES-Zellen in einem zweiten Ansatz mit den

entsprechenden Plasmiden elektroporiert, auf positive Klone selektioniert und anschließend auf morphologische Veränderungen hin untersucht. Obwohl 40% der Kontrollkolonien morphologisch differenziert waren, erzielte eine Überexpression mit *gooseoid* einen deutlichen Anstieg auf 71% in der Anzahl differenzierter Kolonien. Die Ergebnisse legen nahe, daß der beobachtete morphologische Effekt auf *gooseoid*-Expression zurückzuführen ist. Diese Massenkulturen stellen statistisch repräsentative Populationen dar, so daß klonale Effekte hier keine Rolle spielen. Auffällig ist dennoch, daß die Kontrollkolonien (pcUBI1.1+; Ubi-*hGFP*) eine basale Differenzierungsrate von ca. 40% aufweisen.

Als Erklärung dafür könnten die Kultivierungsbedingungen in Betracht kommen. Die Autoren der Veröffentlichung, die die HM-1 Kolonien beschreiben (Magin *et al.*, 1992), weisen darauf hin, daß diese ES-Zellen im Gegensatz zu den normalerweise üblichen Kultivierungsbedingungen nicht auf Feeder-Zellen wachsen müssen. ES-Zellen sind eine homologe Zellpopulation (Robertson, 1987). Bei längerer Kultivierung, wie etwa während der Isolierung von Klonen, können jedoch chromosomale Veränderungen auftreten. In diesen Fällen ist häufig eine Trisomie 8 zu beobachten, die den ES-Zellen einen Wachstumsvorteil verschafft. (McBurney 1976; H. Schorle, pers. Mitteilung). In diesem Fall behalten sie zwar ihr charakteristisches Aussehen, verlieren aber die Fähigkeit, in chimären Mäusen ihre Erbanlagen in die Keimbahn zu bringen. Bei der Selektionsprozedur sind die Kultivierungsbedingungen nicht mehr homogen. Innerhalb von ca. 14 Tagen bilden sich Kolonien aus einzelnen, resistenten Klonen. Während der Transfektion nehmen auch andifferenzierte Zellen die DNA auf und können so die Selektion überleben. Auf diese Weise kann sich der Anteil an differenzierten Zellen erhöhen, was in dem beschriebenen Versuch als basale Differenzierung zu beobachten war.

Da die Feeder-Zellen ebenfalls eine fibroblastenähnliche Morphologie aufweisen und aus embryonalem Gewebe gewonnen werden (Wobus *et al.*, 1984), wurde auf sie bei den Analysen verzichtet, um Verwechslungen mit den Klonen auszuschließen und um falsch positive Ergebnisse (z.B. bei RT-PCR, Northern Blot etc.) zu vermeiden.

Ein anderer Faktor, der für die basale Differenzierungsrate verantwortlich sein könnte, ist der Stress bei der Elektroporation der ES-Zellen. Durch diese effiziente Transfektionsmethode kann Plasmid-DNA in Zellen eingebracht werden; durch kurzes Anlegen einer Spannung (hier 240 V) an eine mit Zellsuspension gefüllte Elektrodenküvette (mit einer Kapazität von 500 μ F) werden kurzfristig die Oberflächenladungen der Zellen umgekehrt, was zu einem Aufreißen der Zellporen führt. Dabei strömt neben der DNA auch Puffer in die Zellen. Dieser Schock reicht aus, um viele Zellen zu töten, möglicherweise auch, um einen größeren Anteil der ES-Zellen spontan differenzieren zu lassen (Ausubel *et al.*, 1991; Wong und Neumann, 1982).

Ein wichtiger Bestandteil des Kulturmediums für ES-Zellen ist LIF. Er hemmt die mesodermale Differenzierung, so daß die Stammzellen ihre totipotenten Eigenschaften behalten; ohne LIF differenzieren alle Zellen spontan (Williams *et al.*, 1988). Differenzierungsexperimente mit der pluripotenten Teratokarzinomazelllinie P19 (Pruitt & Natoli, 1992), die ähnliche Eigenschaften wie ES-Zellen aufweist, zeigten, daß LIF die Differenzierung in endodermale und mesodermale Zelltypen blockieren kann; die neuroektodermale Differenzierung in z.B. Neuronen und Astroglialzellen ist dagegen nicht inhibiert. Da Neuronen nicht mehr proliferieren, werden sie von den nicht differenzierten EC- bzw. ES-Zellen überwuchert und fallen unter normalen Bedingungen nicht mehr ins Gewicht (Robertson, 1987).

In vivo führt eine ektopische Überexpression von LIF (Conquet *et al.*, 1992) zum frühen Tod des Embryos, da der Gastrulationsprozeß in diesen Tieren stark gestört ist. Weder die mesodermalen Zellen noch die *Brachyury*-Expression sind in den Embryonen nachweisbar. Die beobachteten Veränderungen traten bei den Klonen, sowie bei den Massenkulturen stets in der Gegenwart von LIF auf. Dies ist um so erstaunlicher, da einerseits LIF ein potenter Inhibitor der mesodermalen Differenzierung *in vivo* wie *in vitro* ist und andererseits die *goosecoid*-Zellklone trotz LIF differenzieren. Dies deutet auf eine spezifische Wirkung von *goosecoid* hin.

goosecoid induziert *in vivo* und *in vitro* spezifisch anteriores Mesoderm und seine Expression markiert den Bereich des Spemann'schen Organisators (Blum *et al.*, 1992). Inwieweit die weiteren molekularbiologischen Charakteristika der Klone denen des Spemann'schen Organisators entsprechen, wird unter Punkt (3.) detailliert diskutiert.

2. *Vimentin* - ein Zielgen für *goosecoid*?

Vimentin ist ein zelluläres Strukturprotein und gehört zur Klasse der Intermediären Filamentproteine (IF). Es wird häufig als Markergen für mesenchymale Zellen genannt (Traub, 1995; Franke *et al.*, 1982). Ein wichtiger Zeitpunkt während der Embryogenese ist die Bildung mesenchymaler Zellen, die zur Bildung des dritten Keimblattes, dem Mesoderm beitragen (Hertwig, O. und Hertwig R., 1881). Die einzelnen, beweglichen Zellen, die aus dem embryonalen Epithelium delaminieren, sind schon früh als "primäre mesenchymale Zellen" definiert worden. Im vorherigen Jahrhundert beschrieben O. und R. Hertwig diese Zellen wie folgt: "Embryonale Zellen, welche einzeln aus dem epithelialen Verbands ausscheiden, halten wir

für etwas von den Keimblättern Verschiedenes und legen ihnen den besonderen Namen der *Mesenchymkeime* oder *Urzellen des Mesenchyms* bei."

Die Rolle der Intermediären Filamentproteine (IF) ist noch nicht vollständig geklärt. Auf der Basis von Immunfluoreszenz und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß IFs eine Rolle im Zytoskelett spielen. Sie stabilisieren die zelluläre Struktur und organisieren die Verteilung und Interaktionen intrazellulärer Organellen und Bestandteile. Die Expression vieler Proteine der IF-Familie ist zelltypspezifisch und während der Embryonalentwicklung präzise gesteuert. Die Zerstörung des Genlokus verschiedener IF-Systeme (z.B. Vimentin, Colucci-Guyon *et al.*, 1994; Desmin, Milner *et al.*, 1996; Cytokeratin, Fuchs und Weber 1994) im Embryo und in verschiedenen Zelltypen zeigten jedoch keinen drastischen Phänotyp, weder im Hinblick auf die Entwicklung der transgenen Mäuse, noch auf die Zellmorphologie und die Physiologie.

Erst detailliertere Analysen ergaben, daß das Fehlen (durch Gen-Knock-out) des normalen Desminnetzwerks in Muskelzellen zu einer erniedrigten Zellfestigkeit nach mechanischem Stress führt (Milner *et al.*, 1996). Dies ist jedoch bei *Vimentin*^{-/-}-Embryonen nicht zu beobachten. Inzwischen wird die Aussagekraft des *Vimentin*-Nullmutations-Experiments bezweifelt, da neue Funktionen dieses IF-Proteins *in vitro* identifiziert wurden (Evans 1998).

Vimentin kann mit einer Vielzahl von Proteinen assoziieren, wie z.B. Plectin, das IFs mit anderen Elementen des Zytoskeletts verbindet (Svitkina *et al.*, 1996), oder verschiedenen Kinasen (z.B. PKC: Murti *et al.*, 1992; cGMP-Kinase: Pryzwansky *et al.*, 1995). Goldman *et al.* (1996) konnten zeigen, daß kurze, Vimentin-ähnliche Peptide *in vitro* zu einem drastischen Abbau des Vimentin IF-Netzwerks und der Mikrotubuli führen. Die Fibroblasten verlieren dabei ihre normale Form, da die Organisation der Mikrofilamente drastisch gestört wird. Die Autoren anderer Arbeiten diskutieren eine Rolle von Vimentin bei der Zellantwort auf Hitzeschock (Lee und Lai, 1996) und eine unterstützende Transportfunktion für cholesterinesterreiche Fetttropfen für die Steroidsynthese in Leydig-Zellen (Almahbobi *et al.*, 1992).

Bereits vor 17 Jahren konnten Franke *et al.* (1982) zeigen, daß *Vimentin* in den ersten mesenchymalen Zellen, dem entstehenden Mesoderm exprimiert ist. Erste Hinweise auf einen genetischen Mechanismus zwischen Vimentin und *gooseoid*, das ebenfalls in diesen Zellen vorhanden ist, ergaben sich durch eine detaillierte Suche nach Homöobox-Bindesequenzen im *Vimentin*-Promotor:

In dem ca. 3 kB großen proximalen *Vimentin*-Promotorbereich befindet sich neben den acht TAAT- und vier ATTA-Elementen auch eine fast perfekte Konsensusbindesequenz für *gooseoid* (Watabe *et al.*, 1995). Nach einer statistischen Betrachtung müßten sich in einem

3,2 kb großen DNA-Fragment durchschnittlich 13 TAATs bzw. 13 ATTAs befinden. Mit insgesamt zwölf Elementen ist der *Vimentin*-Promotor statistisch normal repräsentiert.

Auffällig ist jedoch die Anordnung der TAAT/ATTA-Elemente. Vier dieser TAAT-Elemente befinden sich in einem DNA-Abschnitt von 181 bp Länge, die von drei möglichen Bindestellen für LEF-1 flankiert werden (-1880 bis -1430). In diesem Fragment allein treten die TAAT-Elemente viermal so häufig auf, wie statistisch erwartet. Da diese möglichen Bindestellen von drei LEF-1 Stellen innerhalb 450 bp eingerahmt sind, kann dies von Bedeutung für einen möglichen Interaktionsmechanismus mit *goosecoid* sein.

Die Bindung des LEF-1 Transkriptionsfaktors an DNA führt zu einem Abknicken der DNA vom Protein weg (Love *et al.*, 1995) und zu einem Aufdrehen der DNA-Doppelhelix (Giese *et al.* 1997). Die Bindungsaffinitäten und der Beugewinkel sind von der Bindesequenz abhängig. An Position -1759 befindet sich eine komplette, aber invertierte LEF-1 Konsensussequenz: **CTTCAAAG**. Nach den Untersuchungen von Giese *et al.* (1997) würde eine LEF-1-Bindung an dieser Sequenz zu einem Beugungswinkel von 130° führen. Die LEF-1 Bindestellen an den Positionen -1875 und -1393 sind normal orientiert, entsprechen aber der Form **CTTCAA•**.

Ein Vorschlag für einen möglichen Mechanismus der genetischen Wechselwirkung zwischen dem Goosecoid-Protein und dem *Vimentin*-Promotor ist in *Abbildung 5-1* schematisch skizziert.

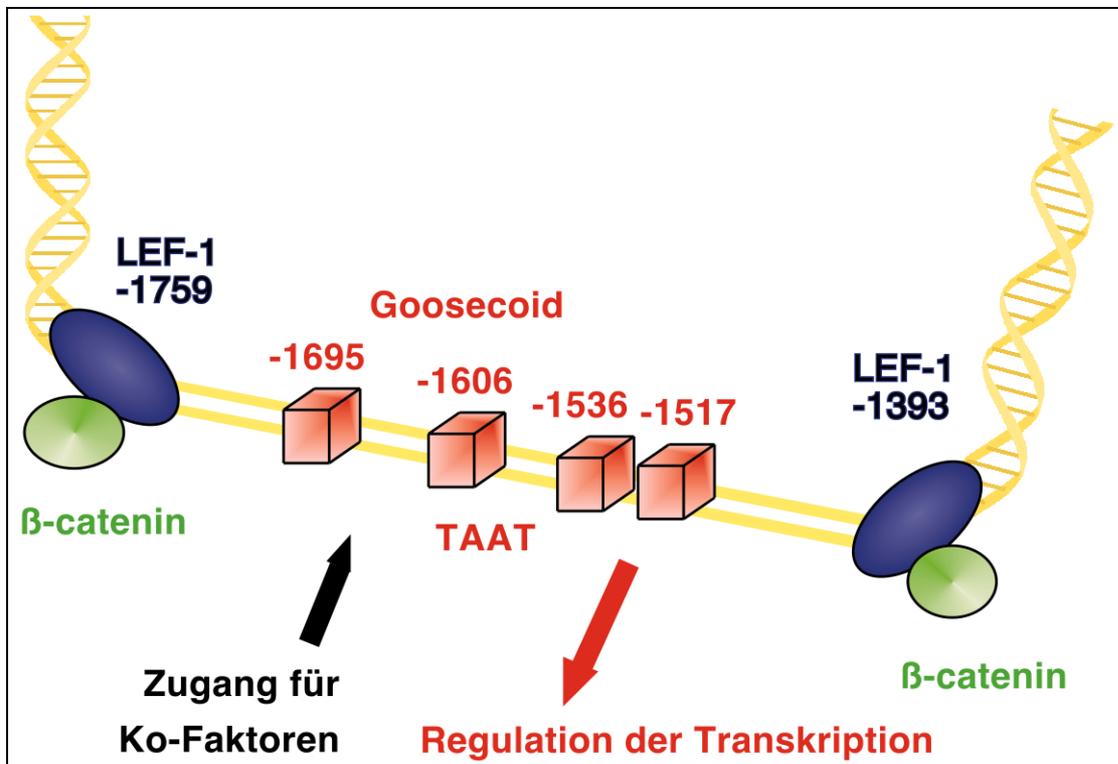


Abbildung 5-1: Modell eines möglichen Mechanismus der genetischen Wechselwirkung des *Goosecoid*-Proteins mit dem *Vimentin*-Promotor. Der Transkriptionsfaktor *LEF-1* knickt durch seine Bindung die DNA so ab, daß an den vier exponierten TAAT-Elementen *Goosecoid* und andere Kofaktoren binden können.

Demnach sollte eine Bindung von *LEF-1* an diese Sequenz zu einem Beugungswinkel von 85° führen. Binden *LEF-1* Proteine an diese Sequenzen im *Vimentin*-Promotor, so müßte dies zu einer Verformung und Aufdrehung des entsprechenden DNA-Bereichs führen, so daß das dazwischenliegende Fragment mit den vier TAAT-Elementen in dieser Konformation exponiert ist und so besonders gut für Homöoproteine zugänglich sein müßte.

In *goosecoid*-ES-Klon 4/10 konnte im Gegensatz zu Wildtyp ES-Zellen das *Vimentin* Protein durch Immunhistochemie nachgewiesen werden. Dies und die Hinweise auf potentielle *goosecoid*-Bindestellen in der Sequenz des *Vimentin*-Promotors deuten auf einen genetischen Zusammenhang zwischen *Goosecoid* und *Vimentin* hin.

Weiterführende Experimente könnten zeigen, ob der oben beschriebene mögliche Mechanismus zur Aktivierung oder Repression von *Vimentin* führt. Ein geeignetes Mittel dazu wäre die Transfektion eines *Vimentin*-Promotor Reporterkonstrukts zusammen mit einem *goosecoid*-Expressionsplasmid. Gelretardations- und *in vivo*-Footprint-Experimente könnten unterstützenden Daten liefern, durch welche Elemente im *Vimentin*-Promotor die Bindung und die transkriptionelle Aktivierung durch *goosecoid* erfolgt.

3. *gsc*-ES-Zellklone exprimieren anteriore, mesodermale Marker

3.1 Expression von *HNF3 β*

Beide Gene, *goosecoid* und *HNF3 β* , sind in verschiedenen Regionen im frühen Mausembryo, ausschließlich im anterioren Primitivstreifen, in der Prächordalplatte und im anterioren viszeralem Endoderm koexprimiert. Die beobachtete Induktion von *HNF3 β* in *goosecoid*-ES-Zellklonen ist im Einklang mit der Beobachtung, daß in 8,75 Tage alten Embryonen, denen homozygot *goosecoid* fehlte und die heterozygot für *HNF3 β* waren, *HNF3 β* -Expression nicht nachweisbar war. *goosecoid/HNF3 β* doppelt mutante Embryonen haben in den am stärksten ausgeprägten Fällen die *HNF3 β* -Expression im axialen Mesoderm verloren (Filosa *et al.*, 1997). In diesen Doppelmutanten trat ein neuer Phänotyp auf, in dem das Vorderhirn eine reduzierte Größe aufwies, sowie unkorrekte Kiemenbögenausbildung und der Bildung der

Herzschleife. Der Verlust der *HNF3 β* -Expression und der neue Phänotyp in *gooseoid/HNF3 β* doppelt mutanten Embryonen legt eine genetische Interaktion zwischen *gooseoid* und *HNF3 β* nahe (Filosa *et al.*, 1997).

Die Beobachtung, daß die untersuchten *gooseoid*-ES-Zellklone ebenfalls *HNF3 β* exprimieren, steht im Einklang mit der Hypothese von Filosa *et al.* (1997). Die Experimente lassen zwar keinen exakten Schluß auf den tatsächlichen Mechanismus zu, jedoch weisen beide Experimente auf eine Aktivierung von *HNF3 β* durch *gooseoid* hin.

3.2 Expression von *chordin* und *follistatin*

Im Gegensatz zu den Transkriptionsfaktoren Lim-1, HNF3 β , Otx2, Gooseoid und Brachyury sind Follistatin und Chordin dorsale Signalmoleküle des Organisators mit Potential zur neuralen Induktion. Diese Proteine können durch ektopische Expression im Animalpolgewebe von *Xenopus* (im sog. "animal cap assay") neurales Gewebe ohne die Anwesenheit von Mesoderm induzieren (Hemmati-Brivanlou *et al.*, 1994; Sasai *et al.*, 1994).

Das *bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)*, ein Mitglied der TGF β -Familie sekretierter Proteine, zeigt anti-neuralisierende Aktivität (Sasai *et al.*, 1995) und vermag Mesoderm zu ventralisieren (Köster *et al.*, 1991). BMP-4 weist daher die entgegengesetzten Merkmale von Follistatin und Chordin auf. Chordin und Follistatin können direkt an BMP-4 binden (Piccolo *et al.*, 1996; Iemura *et al.*, 1998) und verhindern so die Bindung von BMP-4 an den membranständigen BMP-Rezeptor Typ I. Die BMP-Signaltransduktionskette ist blockiert und BMP-4 kann nicht mehr ventralisieren und die neurale Induktion hemmen. Chordin und Follistatin können deswegen als neurale Induktoren funktionieren.

Van den Eijnden-van Raaij *et al.* (1992) zeigten, daß die Expression von *Follistatin* in ES-Zellen nach der Wegnahme von LIF hochreguliert wird. Im vorliegenden Fall war *Follistatin* trotz der Gegenwart von LIF nur in Klon 4/4 exprimiert. ES-Zellen, die *Follistatin* unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren, unterscheiden sich nicht in ihrer Morphologie von Wildtyp-Zellen. Sie geben dieses Protein jedoch an das Medium ab. Die Inkubation von P19-Zellen mit diesem Follistatin-konditionierten Medium führt nach ca. 14 Tagen zur Expression neuraler Marker wie N-CAM und Neurofilament-M (Schäffer, Deissler und Blum, unveröffentlichte Beobachtungen).

Von *chordin* weiß man, daß seine Expression durch *gooseoid* in *Xenopus* induziert wird (Sasai *et al.*, 1994). Daher ist zu erwarten, daß *gooseoid*-ES-Zellklone auch *chordin* exprimieren müßten. Wie aus den Ergebnissen der RT-PCR Analyse in *Abbildung 4-12* ersichtlich ist, konnten *chordin*-Transkripte in beiden Klonen nachgewiesen werden.

Neue Erkenntnisse (Iemura *et al.*, 1998) deuten auf einen leicht unterschiedlichen Mechanismus der BMP-4 Inaktivierung durch Chordin bzw. Follistatin hin. Chordin verhindert durch seine kompetitive Bindung an BMP-4 das Andocken an den BMP-Rezeptor. Auch Follistatin bindet extrazellulär an BMP-4, verhindert aber nicht die Bindung an den BMP-Rezeptor, so daß die drei Proteine einen trimeren Komplex bilden. Welche Konsequenzen diese unterschiedlichen Mechanismen haben könnten, ist jedoch noch unbekannt.

Der *goosecoid*-ES-Klon 4/4 exprimiert im Gegensatz zu 4/10 beide neurale Signalmoleküle des Organisators. Aufgrund dieser Ergebnisse müßte dieser Klon in der Lage sein, unter entsprechenden Kulturbedingungen, terminal in Neuronen zu differenzieren. Ob Klon 4/10, der nur *chordin* exprimiert, ebenfalls die Fähigkeit zu neuraler Induktion besitzt, könnte in weiteren Experimenten geklärt werden.

3.3 Expression von *Otx2*

Das Homöoboxgen *Otx2* und sein *Drosophila*-Homolog *orthodenticle* spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Kopfes, bei den Vertebraten insbesondere bei der Bildung des Gehirns. Das Genprodukt *Otx2* besitzt, wie *Goosecoid*, eine Homöodomäne der *bicoid*-Klasse (Simeone *et al.*, 1993) und ist bereits ab E5,5 im Epiblasten exprimiert. Ab E7 ist *Otx2* nur noch in Regionen des Mausembryos zu finden, die dem anterioren Neuroektoderm entsprechen. Aus diesen Zellen entwickelt sich das Vorder- und Mittelhirn.

Otx2-"Knock-out"-Mäuse (Acampora *et al.*, 1995) sterben am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung durch fehlende Kopfanlagen des Embryos. Während der Gastrulation waren *goosecoid*- und *lim-1*-Expression nicht nachweisbar und die anteriore Struktur des Knotens nicht zu finden. In den *Otx2*^{-/-} Embryonen findet daher die Spezifizierung des anterioren Neuroektoderms nicht statt.

In *Xenopus*-Embryonen gleichen sich die räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster von *Xotx2* und *goosecoid* im anterioren Mesoderm. Die Injektion von *goosecoid*-mRNA in ein ventrales Blastomer in einem *Xenopus*-32-Zell-Embryo führt zur ektopischen Expression von *Xotx2*. Manipulationen an *Xenopus*-Embryonen, die die *goosecoid*-Expression verändern (LiCl, UV, all-trans-Retinsäure, Aktivin und *Xwnt8*) betreffen auch die Expression von *Xotx2*. Blitz und Cho (1995) folgern daraus, daß *Xotx2* ein Zielgen von *goosecoid* sein könnte.

Daher lag es nahe, die *gsc*-Klone auf *Otx2*-Expression hin zu untersuchen. *Otx2* war nur in Klon 4/4 exprimiert und konnte weder in *goosecoid*-Klon 4/10 noch in *Wildtyp*-HM-1 Zellen nachgewiesen werden. *goosecoid*-Expression allein scheint daher nicht ausreichend für die Aktivierung der *Otx2*-Expression zu sein. Es wäre denkbar, daß die Zelle zunächst eine

gewisse Konzentrationsschwelle an Goosecoid-Proteinen überschreiten muß, um die *Otx2*-Expression induzieren zu können. Ein anderer gedanklicher Ansatz setzt voraus, daß Goosecoid einen weiteren "Kofaktor" benötigt, um *Otx2* zu aktivieren. Von den untersuchten Markergenen ist auch Follistatin nur in Klon 4/4 exprimiert. Die Klärung der Frage, ob *goosecoid* *Otx2* induzieren kann und welche Wechselwirkungen dabei stattfinden, bedarf weiterführender Experimente.

3.4 Expression von *Brachyury*

Das *Brachyury* Gen ist wichtig für die normale Ausbildung von Mesoderm und der antero-posterioren Achse (Herrmann *et al.*, 1990). Es ist in Mausembryonen ab Tag 6,5 in mesodermalen Zellen des Primitivstreifens exprimiert. Mausembryonen, die homozygot für eine Deletion im *T*-Lokus sind, produzieren nur ein ungenügend ausgebildetes Primitivstreifen-mesoderm (Glücksohn-Schönheimer, 1944). Die Ausbildung des Notochord ist gestört bevor die anterioposteriore Achse ausgebildet ist. *Brachyury*, das Markergen für Primitivstreifen-mesoderm, war weder in Proben für die Klone noch in den *Wildtyp* ES-Zellen nachweisbar. Aus Untersuchungen in *Xenopus* (Artinger *et al.*, 1997; Latinkic *et al.*, 1997) ist bekannt, daß die *Brachyury*-Expression direkt durch *goosecoid* erfolgt. Die Ergebnisse der Klon-Analyse lassen vermuten, daß in der Maus der gleiche Mechanismus vorliegen könnte, da in den *goosecoid*-Klonen keine *Brachyury*-Transkripte nachweisbar waren. ES-Zellen, die fünf Tage ohne LIF kultiviert wurden, exprimierten *Brachyury*, *goosecoid*-ES-Klone hingegen nicht (Schäffer, unveröffentlichte Beobachtung).

Über einen möglichen Mechanismus der *Brachyury*-Repression wird im nachfolgenden Punkt 4. detailliert diskutiert werden.

3.5 Zusammenfassung der Expressionsanalysen

Die Klone exprimieren anteriore, mesodermale Markergene als Folge von *goosecoid*-induzierter Differenzierung. Beide Klone weisen jedoch kein identisches Expressionsmuster auf. Dies könnte mit unterschiedlichen *goosecoid*-Expressionsniveaus zu erklären sein. Dabei müßten bestimmte Schwellenwerte überschritten werden, um die Expression bestimmter Gene anzuschalten. Diese Hypothese wird neben den eigenen Experimenten auch durch die Versuche von Niehrs *et al.* (1994) gestützt, die eine dosisabhängige Induzierung von mesodermalem Gewebe durch *goosecoid* zeigen konnten. Da Klon 4/4 zusätzlich die anterioren, neuro-ektodermalen Markergene *Otx2* und *Follistatin* exprimiert, entspricht er

einer mehr anterior gelegenen Zellpopulation. Aufgrund der exprimierten Markergene, stellen die Klone artifizielle Organisatorzelllinien unterschiedlicher Qualität dar. Die Zellklone entsprechen jedoch nicht den Zellen des Primitivstreifenmesoderms, da der Marker *Brachyury* nicht exprimiert ist.

4. *Brachyury* und *goosecoid* - eine inverse Korrelation

4.1 Repression von *Brachyury* durch *goosecoid*

In den Proben der *gsc*-ES-Zellklone 4/4 und 4/10 konnten keine *Brachyury*-Transkripte nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise durch den Ubiquitin-Promotor bedingt, der ein hohes Expressionsniveau von *goosecoid* in diesen Zellen hervorruft, was zur vollständigen Repression der *Brachyury*-Expression führt. Transiente Transfektionen von Ubi- und CMV-*Luziferase*-Reporterkonstrukten in P19 Zellen ergaben, daß der Ubiquitin Promotor zwei- bis dreifach höhere Expressionsniveaus bewirkte. Transiente Kotransfektion von einem CMV-*Luziferase*-Reporterkonstrukt mit einem *goosecoid*-Expressionsplasmid führte zu einer reduzierten Reporteraktivität. In der Sequenz des verwendeten CMV-Promotors (654 bp) konnte neben acht TAAT- bzw. ATTA- Stellen auch eine vollständige *goosecoid*-Konsensusbindesequenz gefunden werden. Dies kann möglicherweise einen Effekt auf die Höhe des *goosecoid*-Expressionsniveau haben (M. Schäffer, unveröffentlichte Beobachtungen).

In Zusammenarbeit mit Diane Boucher (UCSF, San Francisco, USA) wurden *goosecoid*-exprimierende ES-Zelllinien hergestellt, um die Rolle des Homöoboxgens *goosecoid* in der Mausentwicklung zu untersuchen. Die *gsc*-ES-Zellklone g185, g191 und g202 und die Kontrollzelllinie c1 wurden identifiziert und in Hinblick auf ihre *Brachyury*- und *goosecoid*-Expression charakterisiert. Klon g202, der das höchste *goosecoid*-Expressionsniveau aufwies, reprimierte die *Brachyury*-Expression vollständig. Da diese Klone *goosecoid* unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren, deutet das vorliegende Ergebnis auch auf verschiedene niedrigere Expressionsniveaus in den Klonen hin. Die vorhandene Menge an *Goosecoid*-Proteinen in der Zelle ist möglicherweise entscheidend für die Stärke der *Brachyury*-Repression.

Die Untersuchungen von Genen, die möglicherweise mit *goosecoid* interagieren, zeigten, daß *gsc*-ES-Zellen *Brachyury* reprimieren und *HNF3 β* -Expression induzieren. Die Beobachtung, daß die *Brachyury*-Repression in der ES-Zelllinie mit der höchsten *goosecoid*-Expression zu beobachten war, steht im Einklang mit den Untersuchungen in *Xenopus* (Artinger *et al.*, 1997; Latinkic *et al.*, 1997). Diese Publikationen zeigten, daß *goosecoid* *Brachyury* reprimiert und diese Interaktion direkt durch Bindung des Homöoboxproteins an die Konsensusbindestellen im *Brachyury*-Promotor vermittelt wird.

Zum Start der Gastrulation sind beide Gene in derselben Zellpopulation im Mausembryo exprimiert. Im weiteren Verlauf befindet sich die *gooseoid*-Expression an der anteriorsten Stelle des Primitivstreifens (Blum *et al.*, 1992) und ist später in der Prächordalplatte und in den Abkömmlingen der Neuralleistenzellen im Kopf lokalisiert. *Brachyury*-Expression besteht während der Gastrulation im gesamten Primitivstreifen und befindet sich nachfolgend auch im Notochord und im Schwanz.

gooseoid spielt eine Rolle bei der Gastrulation und der Körperachsenbildung in *Xenopus*, wenn es mit *Brachyury* im Primitivknoten und im Primitivstreifen koexprimiert wird. *gooseoid* spielt eine weitere wichtige Rolle in der kraniofazialen Entwicklung, bei der seine Expression im anterioren viszeralen Endoderm, der Prächordalplatte und in Abkömmlingen der kranialen Neuralleistenzellen zu finden ist. In diesen Geweben ist *Brachyury* nicht exprimiert, möglicherweise als eine Folge der Repression durch *gooseoid*. Die Menge an vorhandenem Goosecoid-Protein spielt wahrscheinlich eine wesentliche Rolle bei der Fähigkeit, die *Brachyury*-Expression zu reprimieren. Nur der Klon g202, der das höchste *gooseoid*-Expressionsniveau aufwies, reprimierte die *Brachyury*-Expression vollständig.

4.2 Analyse des *Brachyury*-Promotors

Um die genetischen Interaktionen zwischen *gooseoid* und *Brachyury* zu untersuchen, wurden die Maus- und *Xenopus Brachyury* -Promotorsequenzen miteinander verglichen.

Überraschenderweise war der Grad der Konservierung niedrig und auf fünf kleine Regionen im 500 bp (Frosch) und 650 bp (Maus) Bereich 5' vom Startkodon beschränkt. Die Bindestelle, die die *gooseoid*-Repression von *Brachyury* in *Xenopus* vermittelt (Artinger *et al.*, 1997) ist nicht konserviert. Dieses Element aus Region V des Promotors fehlt in der entsprechenden Maus-Sequenz, obwohl die flankierenden Sequenzen konserviert sind.

Ein *Brachyury* Promotor Reporterkonstrukt, das den Primitivstreifen-"Enhancer" enthält (Clements *et al.*, 1996), ließ sich nach transienter Kotransfektion mit einem *gooseoid*-Effektorplasmid in P19 Zellen reprimieren. Dies ist in Übereinstimmung mit der beobachteten inversen Korrelation der Expression dieser zwei Gene in ES-Zellklonen. Allerdings verschwand dieser Effekt nicht nach der Mutation der einzigen kanonischen Homöobox-bindesequenz im *Brachyury* Promotor der Maus.

Detailliertere Analysen sind nötig, um den Mechanismus und die Bindestelle, die die *gooseoid*-Repression vermittelt, zu ergründen. Neuere Untersuchungen, denen ein anderer experimenteller Ansatz zu grunde liegt, deuten möglicherweise doch auf die Wichtigkeit dieser einzigen Homöoboxbindesequenz für die *Brachyury*-Repression durch Goosecoid hin. Dieser Ansatz geht von ES-Massenkulturen aus, die die jeweiligen Reporterkonstrukte stabil in ihr

Genom integriert haben. Nach Transfektion mit einem *gooseoid*-Expressionsplasmid und 120 stündiger Differenzierung durch DMSO konnte die Luziferase-Aktivität der *Brachyury*-Promotormutanten im Gegensatz zum Wildtyp-Promotor nicht mehr durch *Gooseoid* reprimiert werden (Deissler, Schäffer, Blum; unveröffentlichte Beobachtungen).

Konservierte Sequenzelemente zwischen Maus und Frosch im *Brachyury*-Promotor enthalten mögliche Bindestellen für zwei andere Transkriptionsfaktoren, die wichtige Regulatoren der frühen Vertebratenentwicklung sind.

LEF-1-Bindestellen sind sowohl im Maus- als auch im *Xenopus*-Promotor vertreten (Love *et al.*, 1995; Giese *et al.*, 1997), von denen eine in der konservierten Region I zu finden ist. Die Gegenwart dieser Bindestellen deutet auf *Brachyury* als ein direktes Zielgen des "Wnt-Signaling-Pathways" hin. Dieser Reaktionsweg resultiert in der Aktivierung des LEF-1/ β -Catenin-Transkriptionskomplexes und führt zu epithelial-mesenchymalen Übergängen, die mit der Entstehung des Primitivstreifens einher gehen (Huber *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1996).

Die konservierte Region III enthält eine perfekte Bindestelle für den Homöoboxtranskriptionsfaktor *caudal* (Margalit *et al.*, 1993). Da die Expression der *caudal*-Gene mit *Brachyury* in Maus, Hühnchen und Frosch überlappen (Meyer und Gruss, 1993; Epstein *et al.*, 1997; Pillemer *et al.*, 1998), sind sie möglicherweise positive Regulatoren der *Brachyury*-Expression im sich ausbildenden Mesoderm.

Um zu bestimmen, welche andere Bindestellen bzw. welche anderen Kofaktoren bei der Repression von *Brachyury* durch *gooseoid* beteiligt sein könnten, wurde untersucht in welchem Ausmaß um jeweils ca. 100 bp-kürzere Reporterkonstrukte (535, 441, 334, 238 und 144 bp) reprimiert werden konnten.

Zwischen dem längsten Reporterkonstrukt T634 und dem um 99 bp kleineren T535 nimmt die Reporteraktivität bei der Kotransfektion mit *gooseoid* von 65% auf 47% ab. Von allen Reporterkonstrukten wies nur T441 keine Repression (100%) durch *gooseoid* auf. Der um 107 bp kleinere Promotorreporter (T334) konnte am stärksten durch *gooseoid* reprimiert werden; seine Reporteraktivität betrug nur noch 35% im Vergleich zur Transfektion ohne *gooseoid*. Weitere Deletionen um 107 bp und 94 bp resultierten nicht in einem weiteren Verlust, sondern führten zu einem Anstieg der normierten Reporteraktivität (T238: 43%; T144: 66%).

Nach den vorliegenden Ergebnissen befinden sich Promotorbereiche, die offenbar für die Repression durch *gooseoid* verantwortlich sind, zwischen den Positionen -401 bis -308 sowie -200 bis -105, bezogen auf die Transkriptionsstartstelle. Der Promotorbereich von -307 bis -200 enthält eine CAAT-Box und ist deswegen wahrscheinlich für die Aktivierung des

Promotors verantwortlich. Da dieser Bereich stark GC-reich ist, wäre auch eine Aktivierung durch *Sp1* theoretisch möglich.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es denkbar, daß die folgenden Bereiche im *Brachyury*-Promotor als Vermittler der Repression durch *gooseoid* fungieren:

Der Bereich -401 bis -308 enthält in den Maus- und *Xenopus*-Sequenzen *LEF-1*- und *HNF3*-Bindestellen. Die Transkriptionsfaktoren *LEF-1* und *HNF3 β* , die möglicherweise an diese Konsensussequenzen binden können, sind zum Zeitpunkt der Gastrulation *in vivo* exprimiert (Huber *et al.*, 1996; Ang *et al.*, 1993). Die Ergebnisse der RT-PCR Analysen und die Arbeit von Filosa *et al.* (1996) deuten auf einen möglichen Synergismus zwischen *gooseoid* und *HNF3 β* hin, der auch die *Brachyury*-Repression einschließen könnte.

Der Promotorbereich -200 bis -105 enthält sowohl in der Maus als auch in *Xenopus* eine *caudal*- Bindestellen im Gegensatz zu einer *LEF-1*-Stelle, die nur in der Maus-Promotorsequenz zu finden ist. Da die Expression der *caudal*-Gene mit *Brachyury* in Maus, Hühnchen und Frosch überlappen, und die Expressionsmuster von *LEF-1* und *Brachyury* miteinander korrelieren (Huber *et al.*, 1996; Larue *et al.*, 1996), sind sie vermutlich positive Regulatoren der *Brachyury*-Expression im sich ausbildenden Mesoderm.

Möglicherweise werden an dieser Stelle die Effekte von *LEF-1* und *caudal* moduliert, indem Gooseoid - einem Kofaktor gleich - mit jeweils einem der beiden Transkriptionsfaktoren ein Heterodimer bildet und durch seine N-terminale Repressionsdomäne schließlich die *Brachyury*-Repression vermitteln kann. Eine Bindung von Gooseoid an eine andere als der bekannten Konsensussequenz erscheint denkbar, da die Arbeiten von Simeone *et al.* (1998) zeigten, daß Homöoboxgene auch an alternative, definierte Sequenzen binden können.

Zum Zeitpunkt der Gastrulation sind *gooseoid* und *Brachyury* in denselben Zellen des entstehenden Mesoderms exprimiert. *gooseoid* ist ein potenter Induktor von Organisationsgewebe und deshalb muß seine Expression strikt reguliert werden. Dies geschieht durch Autorepression, indem das Protein an seinen eigenen Promotor bindet (Danilov *et al.*, 1998).

Weiterführende Experimente könnten Erkenntnisse darüber liefern, welche Faktoren an welche Promotorsequenzen in den oben genannten Bereichen binden können und welche Kofaktoren hierfür notwendig sind. Zu diesem Zweck wären Methoden wie Gelretardationsversuche und *In-vivo*-Footprintanalysen zur Identifikation der Bindesequenzen geeignet. Transiente Promotorreporteranalysen in P19-Zellkultur könnten dies durch geeignete, d.h. durch gezielt mutierte Konstrukte verifizieren.

Brachyury ist kein Organisationsorgan und seine Expression muß deswegen anterior reprimiert werden. Dies geschieht dann, wenn *gooseoid* vorhanden ist. In den posterior gelegenen Regionen des Primitivstreifens ist *Brachyury* essentiell für die Ausbildung axialen Mesoderms. Als Folge der Autorepression bleibt *gooseoid* auf den anterioren Teil begrenzt

und kann durch die Repression von *Brachyury* eine scharfe Abgrenzung zu posterioren Bereichen des Mesoderms bilden.

Der vorliegende Fall ist ein Beispiel für die evolutionäre Konservierung von entwicklungsbiologisch wichtigen Prinzipien. Die Sequenzhomologien der beteiligten Gene zwischen Maus und *Xenopus* sind zwar z.T. sehr hoch, sie erstrecken sich jedoch nicht auf die Promotorregionen. Der Mechanismus der Repression von *Brachyury* durch *gooseoid* ist folglich auf molekularer Ebene nicht erhalten. Es erscheint möglich, daß dieser spezielle Vorgang in der Maus nach einem unterschiedlichen Prozeß abläuft, der aber zum gleichen Ergebnis führt - der Repression von *Brachyury* durch *gooseoid* in der Region des Organisators.

5. Zusammenfassende Betrachtung

Das Homöoboxgen *gooseoid*, das zuerst in *Xenopus* identifiziert wurde, ist im Organisator bzw. seinem Äquivalent während der Gastrulation in Frosch, Hühnchen, Zebrafisch und Maus exprimiert. Um die Rolle von *gooseoid* in der frühen Mausentwicklung zu untersuchen, wurden embryonale Stammzellklone isoliert, die das Maushomolog stabil unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors überexprimierten.

Diese Klone zeigten bereits ohne weitere Induzierung von Differenzierungsvorgängen eine von den Wildtyp-ES-Zellen unterschiedliche Morphologie, die von fibroblastenähnlichem, mesenchymalem Aussehen geprägt war. Ein Marker gen für mesenchymale Zelltypen ist *Vimentin*, ein intermediäres Filamentprotein, das während der Embryonalentwicklung, wie *gooseoid*, in den ersten mesodermalen Zellen exprimiert ist. In den Zellen eines der *gooseoid*-ES-Klone konnte das *Vimentin*-Protein nachgewiesen werden. Die Analyse der *Vimentin*-Promotorsequenz zeigte, daß die Aktivierung der *Vimentin*-Expression direkt durch die Bindung von *Gooseoid* an spezielle, möglicherweise relevante Bindesequenzen erfolgen könnte. Weiterführende, geeignete Experimente könnten zeigen, daß *gooseoid* nach einem epithelial-mesenchymalen Übergang, wie der Gastrulation, neben Organisatorgenen auch die Expression von Genen induzieren kann, die für die strukturelle Umgestaltung der Zellen verantwortlich sind.

Die *gooseoid*-ES-Klone exprimieren einige wichtige Markergene des Organisators, wie die neuronalen Induktoren *Chordin* und *Follistatin*, sowie Transkriptionsfaktoren, wie das Homöoboxgen *Otx2* und dem "Forkhead"-Gen *HNF3 β* . Interessanterweise waren mRNA-Transkripte für das Organisatorgen *lim-1* in den Proben der Klone nicht nachweisbar.

Ebenfalls negativ verlief der Nachweis des Markers für Primitivstreifenmesoderm, *Brachyury*. In Zusammenarbeit mit Dr. Diane Boucher (UCSF, USA) konnte mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR *gooseoid*-ES-Zellklone untersucht werden, die unterschiedliche Expressionsniveaus von *gooseoid* besaßen. Nur in Klon g202, indem die größte Menge an *gooseoid*-Transkripten enthalten war, konnte kein *Brachyury* nachgewiesen werden. Diese Experimente deuten auf eine inverse Korrelation von *gooseoid*- und *Brachyury*-Expression hin.

Die *Brachyury*-Repression erfolgt in *Xenopus* über zwei definierte Homöobox-Bindestellen, von denen nur eine auch im Mauspromotor zu finden ist. Die gezielte Mutagenese dieser potentiellen Bindestelle führte jedoch nicht zu einem Verlust der Repression durch *gooseoid* in transienten Promotorreporter-Experimenten in P19 Zellen.

Die schrittweise Verkürzung um jeweils ca. 100 bp des *Brachyury*-Promotors führte zu einem interessanten "Promotorprofil". Der 535 bp-, sowie der 334 bp- Promotor konnten in seiner Aktivität durch *gooseoid* am stärksten reprimiert werden. Der Bereich dazwischen, den der 441 bp-lange Promotor enthält, konnte nicht durch *gooseoid* reprimiert werden.

Diese Bereiche enthalten potentielle Bindestellen für entwicklungsbiologisch relevante Transkriptionsfaktoren, die als Reaktionspartner für *goosecoid* denkbar wären.

Abbildung 5-2 faßt die erarbeiteten Ergebnisse zusammen (rote Pfeile), ergänzt durch bereits bekannte Tatsachen (schwarze Pfeile), sowie denkbare Zwischenschritte (blaue Pfeile). *goosecoid* steht demnach im Zusammenhang mit dem epithelial-mesenchymalen Übergang während der Gastrulation und beeinflusst durch die Aktivierung anderer Organistorgene entscheidend das Zellschicksal der Zellen, die dieses Gen exprimieren.

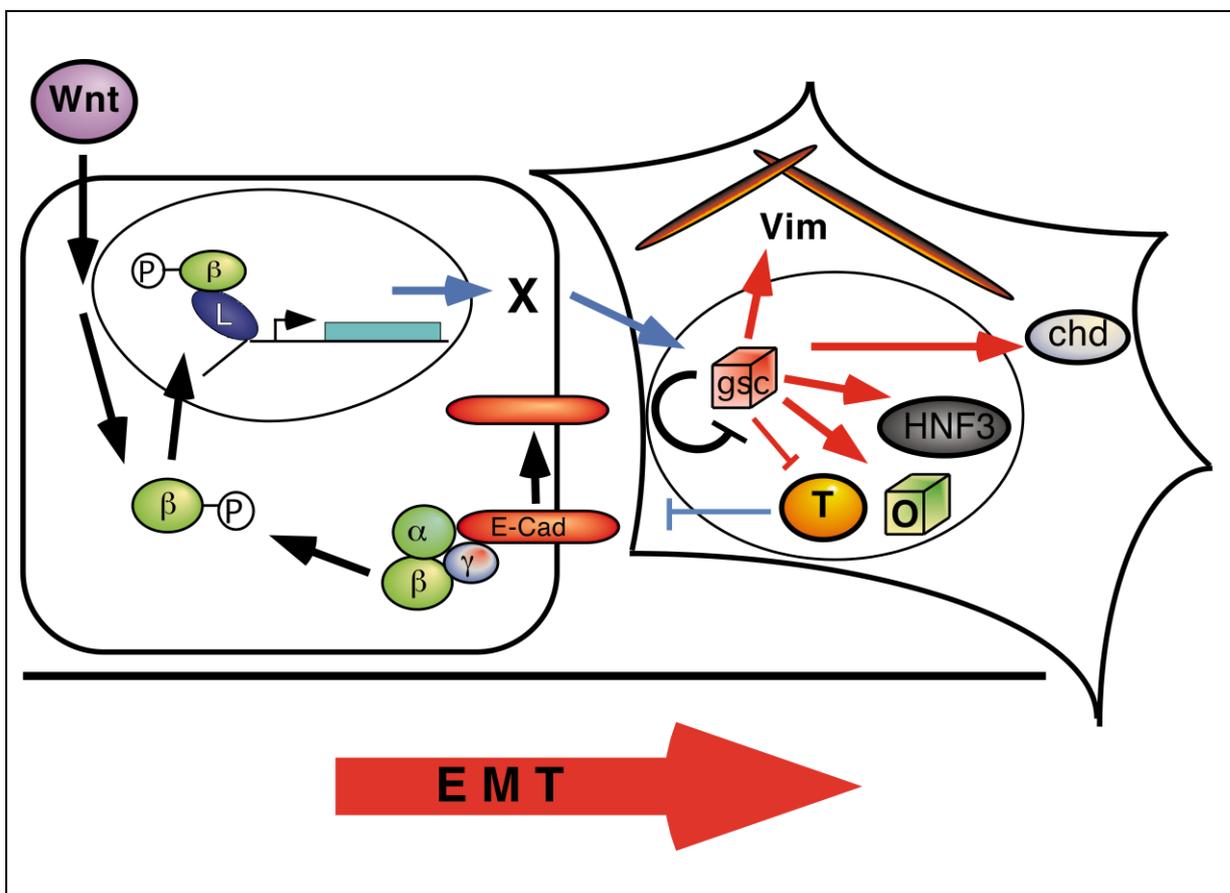


Abbildung 5-2: Die Rolle von *goosecoid* und dem epithelial-mesenchymalen Übergang bei der Gastrulation.

α -, β - und γ -Catenin, *chd*: Chordin, *E-Cad*: E-Cadherin, *EMT*: epithelial-mesenchymale Übergang, *gsc*: *goosecoid*, *HNF3*: *HNF3 β* , *L*: *LEF-1*, *O*: *Otx2*, *T*: *Brachyury*, *vim*: *Vimentin*, *X*: unbekannter Faktor (in *Xenopus*: *Twin* bzw. *Siamois*; in der *Maus* noch nicht identifiziert).

Literaturverzeichnis

VI. Literaturverzeichnis

Acampora D, Mazan S., Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A, Brûlet P. (1995)

Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuro-ectoderm specification during gastrulation.

Development, **121**, 3279.

Affolter M, Percival-Smith A., Müller M, Leupin W, Gehring WJ. (1990)

DNA binding properties of the purified Antennapedia homeodomain.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 4093.

Albano R, Smith JC. (1994)

Follistatin expression in ES and F9 cells and in preimplantation mouse embryos.

Int. J. Dev. Biol., **38**, 543.

Almahbobi G, Williams LJ, Hall PF. (1992)

Attachment of steroidogenic lipid droplets in intermediate filaments in adrenal cells.

J Cell Sci, **101**, 383.

Ang SL, Rossant J. (1994)

HNF3β is essential for node and notochord formation in mouse development.

Cell, **78**, 561.

Ang SL, Wierda A, Wong D, Stevens KA, Cascio S, Rossant J, Zaret KS. (1993)

The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of *HNF3/forkhead* proteins.

Development, **119**(4), 1301-1315.

Artinger M, Blitz I, Inoue K, Tran U, Cho KWY. (1997)

Interaction of *gooseoid* and *brachyury* in *Xenopus* mesoderm patterning.

Mechanisms of Development, **65**, 187.

Ausubel F, Brent R, Kingston R. (1991)

Current Protocols in Molecular Biology.

J. Wiley and Sons, New York.

Becker K, Wobus AM, Conrad U, Schöneich J. (1984)

Injection of murine embryonal carcinoma cells and embryo-derived pluripotential cells into mouse blastocysts.

Cell Differ, **15(2-4)**, 195.

Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. (1996)

Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1.

Nature, **382**, 638.

Belo JA, Leyns L, Yamada G, De Robertis EM. (1998)

The prechordal midline of the chondrocranium is defective in Goosecoid-1 mouse mutants.

Mech Dev, **72**, 15.

Blitz IL, Cho KWY. (1995)

Anterior neurectoderm is progressively induced during gastrulation: the role of the *Xenopus* homeobox gene *orthodenticle*.

Development, **121**, 993.

Blum M, De Robertis EM, Kojis T, Heinzmann C, Klisak I, Geissert D, Sparkes RS. (1994)

Molecular cloning of the human homeobox gene goosecoid (GSC) and mapping of the gene to human chromosome 14q32.1.

Genomics, **21**, 388.

Blum M, Gaunt S., Cho KWY, Steinbeisser H, Blumberg B, Bittner D, De Robertis EM. (1992)

Gastrulation in the mouse: the role of the homeobox gene *goosecoid*.

Cell, **69**, 1097.

Bodnar, AG. (1998)

Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells.

Science, **279**, 349.

Capetanaki Y, Kuisk I, Rothblum K, Starnes S. (1990)

Mouse vimentin: structural relationship to *fos*, *jun*, CREB and *tpr*.
Oncogene, **5**, 645.

Carrasco AE, McGinnis W, Gehring WJ, De Robertis EM. (1984)

Cloning of a *Xenopus laevis* gene expressed during early embryogenesis that codes for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes.
Cell, **37**, 409.

Cheng L, Kain S. (1995)

Analysis of GFP and RSGFP Expression in Mammalian Cells by Flow Cytometry.
CLONTECHniques, **10/95**.

Cho KWY, Blumberg B, Steinbeisser H, De Robertis EM. (1991)

Molecular nature of Spemann's Organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene *gooseoid*.
Cell, **67**, 1111.

Chromczynski P, Sacchi N. (1987)

Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem, **161**, 156.

Clements D, Taylor HC, Herrmann BG, Stott D. (1996)

Distinct regulatory control of the Brachyury gene in axial and non-axial mesoderm suggests separation of mesoderm lineages early in mouse gastrulation.
Mechanisms of Development, **56**, 139.

Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pourin S, Babinet C. (1994)

Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype.
Cell, **79**, 679.

Conquet F, Peyri ras N, Tiret L, Br let P. (1992)

Inhibited gastrulation in mouse embryos overexpressing the leukemia inhibitory factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 8195.

Damjanov I, Solter D. (1974)

Experimental teratoma.
Curr. Topics Pathol., **59**, 69.

Danilov V, Blum M, Schweickert A, Campione M, Steinbeisser H. (1998)

Negative autoregulation of the organizer-specific homeobox gene *gooseoid*.
Journal of Biological Chemistry, **273**, 627.

De Robertis, EM. (1995)

Dismantling the organizer.
Nature, **374**, 407.

De Robertis EM, Blum M, Niehrs C, Steinbeisser H. (1992)

gooseoid and the organizer.
Development, 1992 Supplement, 167.

de Wet JR, Wood KV, Helinski DR, DeLuca M. (1985)

Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci USA, **82**, 7870.

de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subrami S. (1987)

Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells.
Mol Cell Biol, **7**, 725.

Dobrovolskaia-Zavadskaia, N. (1927)

Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouveau-née et sur l'existence d'un caractère (facteur) héréditaire "non viable".
CR Seanc. Soc Biol, **97**, 114.

Doetschmann TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. (1985)

The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium.
J. Embryol. exp. Morph, **87**, 27.

Dufort D, Schwartz L, Harpal K, Rossant J. (1998)

The transcription factor HNF3 β is required in visceral endoderm for normal primitive streak morphogenesis.
Development, **125**, 3015.

Evans MJ, Kaufman MH. (1981)

Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.
Nature, **292**, 154.

Evans, R. (1998)

Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family.
Bioessays, **20**, 79.

Ferreiro B, Artinger M, Cho KWY, Niehrs C. (1998)

Antimorphic goosecoids.
Development, **125**, 1347.

Fett JW, Strydom DJ, Lubb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, Vallee BL. (1985)

Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*, **24**, 5480.

Filosa S, Rivera-Perez JA, Gomez AP, Gansmuller A, Sasaki H, Behringer RR, Ang SL. (1997)

gooseoid and *HNF-3 β* genetically interact to regulate neural tube patterning during mouse embryogenesis.
Development, **124**, 2843.

Fort P, Marty L, Piechaczyk M, elSabrouty S, Dani C, Jeanteur P, Blanchard JM. (1985)

Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family.
Nucleic Acids Research, **13**, 1431.

Franke WW, Grund C, Kuhn C, Jackson BW, Illmensee K. (1982)

Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis
III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments.
Differentiation, **23**, 43.

Fuchs E, Weber K. (1994)

Intermediate filaments: structure, dynamics function and disease.
Annu. Rev. Biochem., **63**, 345.

Galili N, Baldwin HS, Lund J, Reeves R, Gong W, Wang Z, Roe BA, Emanule BS, Nayak S, Mickanin C, Budarf ML, Buck CA. (1997)

A region of mouse chromosome 16 is syntenic to the DiGeorge, velocardiofacial syndrome minimal critical region.

Genome Research, **7**, 17.

Gaunt SJ, Blum M, De Robertis EM. (1993)

Expression of the mouse *gooseoid* gene during mid-embryogenesis may mark mesenchymal cell lineages in the developing head, limbs and body wall.

Development, **117**, 769.

Gehring, WJ. (1992)

Die molekulare Grundlage der Entwicklung. In: Gehring, W. (ed.), *Entwicklung und Gene*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Georges-Labouesse EN, George EL, Rayburn H, Hynes RO. (1996)

Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin.

Developmental Dynamics, **207**, 145.

Giese K, Cox J, Grosschedl R. (1992)

The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures.

Cell, **69**, 185.

Giese K, Pagel J, Grosschedl R. (1997)

Functional analysis of DNA bending and unwinding by the high mobility group domain of LEF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **94**, 12845.

Gilbert, SF. (1994)

Developmental Biology. 4. Auflage. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. USA.

Glozak MA, Rogers MB. (1996)

Specific induction of apoptosis in P19 embryonal carcinoma cells by retinoic acid and BMP2 or BMP4.

Developmental Biology, **179**, 458.

Glücksohn-Schönheimer, S. (1944)

The development of normal and homozygous *brachy* (*T/T*) mouse embryos in the extraembryonic coelom of the chick.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **30**, 134.

Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM. (1996)

The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity.

J Cell Biol, **134**, 971.

Graham FL, van der Eb AJ. (1973)

A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.

Virology, **52**, 456.

Gumbiner BM, Yamada KM. (1995)

Cell-to-cell contact and extracellular matrix.

Current Opinion in Cell Biology, **7**, 615.

Hartig R, Huang Y, Janetzko A, Shoeman R, Grüb S, Traub P. (1997)

Binding of fluorescence- and gold-labeled oligodesoxyribonucleotides to cytoplasmic intermediate filaments in epithelial and fibroblast cells.

Experimental Cell Research, **233**, 169.

Heinemeyer T, Chen X, Karas H, Kel AE, Kel OV, Liebich I, Meinhardt T, Reuter I, Schacherer F, Wingender E. (1999)

Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms.

Nucleic Acids Res., **27**, 318.

Hemmati-Brivanlou A, Kelly OG, Melton DA. (1994)

Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann Organizer and displays direct neuralizing activity.

Cell, **77**, 283.

Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Trevor KT. (1997)

Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior.

Am J Pathol **150**(2):483-495.

Herrmann BG, Labbeit S, Poustka A, King TR, Lehrbach H. (1990)

Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse.
Nature, **343**, 617.

Hertwig, O. und R. (1881)

Die Coelomtheorie. Versuch einer Erklärung des mittleren Keimblattes.
Fischer Verlag, Jena, S. 122.

Hsu SC, Galceran J, Grosschedl R. (1998)

Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with β -catenin.
Mol. Cell. Biol., **18**, 4807.

Huber O, Korn R, McLaughlin, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. (1996)

Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1.
Mech. Dev., **59**, 3.

Iemura Si, Yamamoto T, Takagi C, Uchiyama H, Natsume T, Shimasaki S, Sugino H, Ueno N. (1998)

Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 9337.

Ip NY, Nye SH, Boulton TG, Davis S, Taga T, Li Y, Birren SJ, Yasukawa K, Kishimoto T, Anderson DJ, Stahl N, Yancopoulos GD. (1992)

CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130.
Cell, **69**, 1121.

Izpisúa-Belmonte JC, De Robertis EM, Storey K, Stern CD. (1993)

The homeobox gene *gooseoid* and the origin of organizer cells in the early chick blastoderm.
Cell, **74**, 645.

Kaufmann E, Knöchel W. (1996)

Five years on the wing of fork head.
Mechanisms of Development, **57**, 3.

Kaufman TC, Seeger MA, Olsen G. (1990).

Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*.

Adv Genet ; **27**, 309-362.

Kavka A, Green J (1997)

Tales of tails: *Brachyury* and the T-box genes.

Biochimica et Biophysica Acta, **1333**, F73.

Keller, GM. (1995)

In vitro differentiation of embryonic stem cells.

Current Opinions in Cell Biology, **7**, 862.

Keller GM, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV. (1993)

Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture.

Molecular und cellular Biology, **13**, 473.

Kispert A, Herrmann BG. (1994)

Immunohistochemical analysis of the *Brachyury* protein in wild-type and mutant mouse embryos. *Dev. Biol.*, **161**, 179.

Kispert A, Koschorz B, Herrmann BG. (1995)

The T protein encoded by *Brachyury* is a tissue-specific transcription factor.

EMBO J, **14**, 4763.

Kissinger CR, Liu BS, Martin-Bianco E, Kornberg TB, Pabo CO. (1990)

Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA-complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions.

Cell, **63**, 579.

Knippers, R. (1995)

Molekulare Genetik., 5. Auflage, Georg ThiemeVerlag, Stuttgart.

Konigsberg IR, Buckley PR. (1974)

Regulation of the cell cycle and myogenesis by cell-medium interactions.

Sinauer Associates, Stamford, Connecticut.

Köster M, Plessow S, Clement JH, Lorenz A, Tiedemann H, Knöchel W. (1991)

Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4), a member of the TGF-beta family, in early embryos of *Xenopus laevis*: analysis of mesoderm inducing activity.
Mech Dev, **33**, 191.

Kozak, M. (1987)

An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs.
Nucleic Acids Research, **15**, 8125.

Laemmli, UK. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, **227**, 680.

Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M, Kemler R. (1996)

A role for cadherins in tissue formation.
Development, **122**, 3185.

Latinkic BV, Umbhauer M, Neal KA, Lerchner W, Smith JC. (1997)

The *Xenopus Brachyury* promoter is activated by FGF and low concentrations of activin and suppressed by high concentrations of activin and by paired-type homeodomain proteins.
Genes & Development, **11**, 3265.

Lee YC, Lai YK. (1995)

Integrity of intermediate filaments is associated with the development of acquired thermotolerance in 9l rat brain tumor cells.
J Cell Biochem, **57**, 150.

Lemaire L, Roeser T, Izpisua-Belmonte JC, Kessel M. (1997)

Segregating expression domains of two goosecoid genes during transition from gastrulation to neurulation in chick embryos.
Development, **124**, 1443.

Lewis, EB. (1978)

A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*.
Nature, **276**, 565.

Love JJ, Lee X, Case DA, Giese K, Grosschedl R, Wright PE. (1995)

Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1.
Nature, **376**, 791.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951)

Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., **193**, 265.

Maggin TM, McWhir J, Melton DW. (1992)

A new mouse embryonic stem cell with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Research*, **20**, 3795.

Mailhos C, Andre S, Molleraeu B, Goriely A, Hemmati-Brivanlou A, Desplan C. (1998)

Drosophila Goosecoid requires a conserved heptapeptide for repression of paired-class homeoprotein activators.
Development, **125**, 937.

Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. (1993)

Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types.
Mechanism of Development, **44**, 41.

Margalit Y, Yarus S, Shapira E, Gruenbaum Y, Fainsod A. (1993)

Isolation and characterization of target sequences of the chicken CdxA homeobox gene.
Nucl. Acids Res., **21**, 4915.

Martin, GR. (1975)

Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia.
Cell, **5**, 229.

Martin GR. (1981)

Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 7634.

Martin GR, Evans MJ. (1975a)

Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: Formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1441.

Martin GR, Evans MJ. (1975b)

Multiple differentiation of clonal teratocarcinoma stem cells following embryoid body formation in vitro. *Cell*, **6**, 467.

Martin JF, Bradley A, Olsen EN. (1995)

The paired-like homeo box gene MHox is required for early events of skeletogenesis in multiple lineages. *Genes & Development*, **9**, 1237.

McBurney, MW. (1993)

P19 embryonal carcinoma cells. *Int. J. Dev Biol.*, **37**, 135.

McBurney, MW. (1976)

Clonal lines of teratocarcinoma cells in vitro: differentiation and cytogenetic characteristics. *J. Cell. Physiol.*, **89**, 441.

McBurney MW, Jones-Villeneuve EMV, Edwards MKS, Anderson PJ. (1982a)

Control of muscle and neuronal differentiation in cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature*, **299**, 165.

McBurney MW, Rogers BJ. (1982b)

Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev. Biol.*, **89**, 503.

Metcalf D, Moore AS. (1973)

Regulation of growth and differentiation of haemopoietic colonies growing in agar. In 13, C.F.S. *Haemopoietic Stem Cells*, Amsterdam NL.

Miller JR, Moon RT. (1996)

Signal transduction through β -catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes & Development*, **10**, 2527.

Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y. (1996)

Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J. Cell Biol.*, **134**, 1255.

Müller CW, Hermann BG. (1997)

Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. *Nature*, **389**, 884.

Murti KG, Kaur K, Goorha RM. (1992)

Protein kinase-c associates with intermediate filaments and stress fibers. *Exp Cell Res*, **202**, 36.

Nakamura N, Shida M, Hirayoshi K, Nagata K. (1995)

Transcriptional regulation of the vimentin-encoding gene in mouse myeloid leukemia M1 cells. *Gene*, **166**, 281.

Needleman SB, Wunsch CD (1970)

A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.*, **48**, 443.

Niehrs C, Keller R, Cho KWY, De Robertis EM. (1993)

The homeobox gene *gooseoid* controls cell migration in *Xenopus* embryos. *Cell*, **72**, 491.

Niehrs C, Steinbeisser H, De Robertis EM. (1994)

Mesodermal patterning by a gradient of the vertebrate homeobox gene *gooseoid*. *Nature*, **263**, 817.

Nordeen, S. (1988)

Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques*, **6**, 454.

Novak A, Hsu SC, Leung-Hagestein C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R, Dedhar S. (1998)

Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and β -catenin signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4374.

Papaiouannou VE, Silver LM. (1998)

The T-box gene family.
BioEssays, **20**, 9.

Pearson CE, Ruiz MT, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M. (1994)

Cruciform DNA binding protein in HeLa Cell Extracts.
Biochemistry, **33**, 14185.

Pearson WR. (1990)

Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. in:
Methods in Enzymology, **183**, 63,
Academic Press, San Diego, California, USA, 1990.

Pearson WR, Lipman DJ. (1988)

Improved tools for biological sequence comparison.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 2444.

Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. (1996)

Dorsoventral patterning in *Xenopus*: Inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4.
Cell, **86**, 599.

Prasad, RN. (1975)

Differentiation of neuroblastoma cells in culture.
Biol. Rev., **50**, 129.

Pruitt SC, Natoli TA. (1992)

Inhibition of differentiation by leukemia inhibitory factor distinguishes two induction pathways in P19 embryonal carcinoma cells.
Differentiation, **50**, 57.

Pruitt, SC. (1994)

Primitive streak mesoderm-like cell lines expressing Pax-3 and Hox gene autoinducing activities.
Development, **120**, 37.

Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. (1995)

Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase is targeted to intermediate filaments and phosphorylates vimentin in A23187-stimulated human neutrophils.

Blood, **85**, 222.

Rashbass P, Wilson V, Rossen B, Beddington RSP. (1994)

Alterations in gene expression during mesoderm formation and axial patterning in Brachyury (T) embryos.

Int. J. Dev. Biol., **38**, 35.

Reichmann E, Schwarz H, Deiner EM, Leitner I, Eilers M, Berger J, Busslinger M, Beug H. (1992)

Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion.

Cell, **71**, 1103.

Rennebeck GM, Lader E, Chen Q, Bohm RA, Cai ZS, Faust C, Magnuson T, Pease LR, Artzt K. (1995)

Is there a Brachyury the Second? Analysis of a transgenic mutation involved in notochord maintenance in mice.

Dev Biol., **172**, 206.

Robertson, EJ. (1987)

Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach. IRL Press, Oxford und Washington D.C.

Röhme D, Fox H, Herrmann BG. (1994)

Molecular clones of the mouse t complex derived from microdissected metaphase chromosomes.

Cell, **36**, 783.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989)

Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert D, Gont LK, De Robertis EM. (1994)

Xenopus chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes.

Cell, **79**, 779.

Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, De Robertis EM. (1995)

Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*.

Nature, **376**, 333.

Schmidt C, Wilson V, Stott D, Beddington RSP. (1997)

T Promotor activity in the absence of functional T protein during axis formation and elongation in the mouse.

Developmental Biology, **189**, 161.

Schneider S, Steinbeisser H, Warga RM, Hausen P. (1996)

β -catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mechanisms of Development*, **57**, 191.

Schorpp M, Jäger R, Schellander K, Schenkel J, Wagner EF, Weiher H, Angel P. (1996)

The human ubiquitin C promotor direct high ubiquitous expression of transgenes in mice.

Nucleic Acids Research, **24**, 1787.

Shawlot W, Behringer RR. (1995)

Requirement for *Lim1* in head-organizer function.

Nature, **374**, 425.

Simeone A, Acamora D, Mallamaci A, Stornaiuolo, D'Apice MR, Nigro V, Boncinelli E. (1993)

The vertebrate gene related to *orthodenticle* contains a homeodomain of the *bicoid* class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo.

EMBO J, **12**, 2735.

Simons K, Fuller DF. (1985)

Cell surface polarity in epithelia.

Annu. Rev. Cell Biol., **1**, 243.

Smith JL, Gesteland KM, Schoenwolf GC. (1994)

Prospective fate map of the mouse primitive streak at 7.5 days of gestation.

Developmental Dynamics, **201**, 279.

Smith TF, Waterman MS. (1981)

Adv. Appl. Math., **2**, 482.

Smith TF, Waterman MS. (1981)

Overlapping genes and information theory.

J. Theor. Biol., **91**, 379.

Smolich BD, Papkoff J. (1994)

Regulated expression of Wnt family members during neuroectodermal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells: Overexpression of Wnt-1 perturbs normal differentiation-specific properties.

Developmental Biology, **166**, 300.

Solter, D. (1998)

Dolly is a clone--and no longer alone.

Nature, **394**, 315.

Spemann H, Mangold H. (1924)

Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organismen.

Roux' Arch. Entw. Mech., **100**, 599.

Stott D, Kispert A, Herrmann BG. (1993)

Rescue of the tail defect of Brachyury mice.

Genes Dev, **7**, 197.

Svitkina TM, Verkhovsky AB, Borisy GB. (1996)

Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton.

J Cell Biol, **135**, 991.

Takeichi, M. (1995)

Morphogenic roles of classic cadherins.

Current Opinion in Cell Biology, **7**, 619.

Tam PPL, Behringer RR. (1997)

Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan.

Mechanisms of Development, **68**, 3.

Tatsuka M, Orita S, Yagi T, Kakunaga T. (1988)

An improved method of electroporation for introducing biologically active foreign genes into cultured mammalian cells.

Experimental Cell Research, **178**, 154.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS. (1998)

Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.

Science, **282**, 1145.

Traub, P. (1995)

Intermediate filaments and gene regulation.

Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR, **27**, 377.

Van den Eijnden-van Raaij AJM, Feijen A, Lawson KA, Mummery CL. (1992)

Differential expression of inhibin subunits and follistatin, but not activin receptor type II, during early murine embryonic development.

Dev Biol, **154**, 356.

Vidricaire G, Jardine K, McBurney MW. (1994)

Expression of the Brachyury gene during mesoderm development in differentiating embryonal carcinoma cell cultures.

Development, **120**, 115.

Vogt, W. (1929)

Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung. II. Teil Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren.

Roux' Arch. Entw. Mech., **120**, 384.

von Baer, KE. (1828)

Entwicklungsgeschichte der Thiere: Beobachtung und Reflexion. Bornträger, Königsberg.

Watabe T, Kim S, Candia A, Rotbacher U, Hashimoto C, Inoue K,**Cho KWY. (1995)**

Molecular mechanisms of Spemann's organizer formation: conserved growth factor synergy between *Xenopus* and mouse.

Genes Dev., **9**, 3038.

Wobus AM, Holzhauser H, Jäkel P, Schöneich J. (1984)

Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo.

Exp. Cell Res., **152**, 212.

Wong TK, Neumann E. (1982)

Electric field mediated gene transfer.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **107**, 584.

Zimmerman LB, De Jesús-Escobar, Harland RM. (1996)

The Spemann Organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4.

Cell, **86**, 599.

Anhang

VII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

(häufig verwendete Abkürzungen)

| | |
|---------|---|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| Amp | Ampicilin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AS | Aminosäure(n) |
| ATP | Adenosin-5'-Triphosphat |
| bidest. | zweifach destilliert |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | bovine serum albumin, engl. für Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | ungefähr |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat Dihydrat |
| cM | centi Morgan |
| CMV | Cytomegalovirus |
| cpm | counts per minute; Zähleinheiten pro Minute |
| Da | Dalton (1 Da = 1,6605 x 10 ⁻²⁴ g) |
| dATP | Desoxyadenosin-5'-Triphosphat |
| DBD | DNA-Bindungsdomäne |
| dCTP | Desoxycytidin-5'-Triphosphat |
| ddNTP | Didesoxynukleosid-5'-Triphosphat |
| DGS | DiGeorge-Syndrom |
| dGTP | Desoxyguanosin-5'-Triphosphat |
| d.h. | das heißt |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |

| | |
|----------------|---|
| DMS | Dimethylsulfat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleosid-5'-Triphosphat |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| DTT | Dithiotreitol |
| dTTP | Desoxythymidin-5'-Triphosphat |
| E | Tag der Embryonalentwicklung |
| EB | embryoid bodies, embryoide Körperchen |
| EC | embryonal carcinoma, Tertaokarzinom |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| engl. | englisch |
| ES | embryonale Stammzellen |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | fluorescence activated cell sorting |
| g | Gramm, Fallbeschleunigung |
| GAPDH | Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase |
| <i>gsc</i> | <i>gooseoid</i> |
| h | Stunde |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2 Ethansulfonsäure |
| hGFP | "humanized" Green Fluorescent Protein |
| ICM | inner cell mass, innere Zellmasse einer Blastozyste |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid |
| Kap. | Kapitel |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| K-MES | K-Morpholin-Ethansulfonsäure |
| K.O. | knock-out |
| l | Liter |
| lat. | lateinisch |
| LB | Luria-broth |

| | |
|-------|---|
| LIF | Leukemia Inhibitory Factor |
| Lsg. | Lösung |
| M | molar, mol/l |
| m | milli, 10^{-3} |
| μ | mikro, 10^{-6} |
| mA | milli-Ampère |
| Mb | Megabasen |
| MeOH | Methanol |
| MG | Molekulargewicht |
| min | Minute(n) |
| mRNA | messenger-RNA |
| NaOAc | Natriumacetat |
| NP-40 | Nonidet P-40 |
| n | nano, 10^{-9} |
| OD | optische Dichte |
| p.a. | pro analysi; analysenrein |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglycol |
| p | piko, 10^{-12} |
| pH | negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration |
| PS | Petrischale |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde(n) |
| s. | siehe |
| ssDNA | einzelsträngige DNA |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sog. | sogenannt(e) |
| t_a | Annealingtemperatur in °C |
| TBE | Tris/Borsäure/EDTA |

| | |
|--------|--------------------------------------|
| TE | Tris/EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| Tris | Tri-(hydroxymethyl-)aminomethan |
| tRNA | transfer-RNA |
| T4 | <i>E. coli</i> -Phage T4 |
| U | Unit(s) (Einheit der Enzymaktivität) |
| Ubi | Ubiquitin |
| ÜN | über Nacht |
| ÜNK | Übernachtskultur |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| v/v | Volumen/Volumen |
| vergl. | vergleiche |
| wt | Wildtyp |
| w/v | Gewicht/Volumen |
| z.T. | zum Teil |

2. Buchstabencode der Aminosäuren

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

3. Plasmidkarten

3.1 Verwandte Plasmide

3.1.1 pcUBI1.1+

Der Vektor pcUBI 1.1+ leitet sich von dem käuflich erhältlichen pcDNA 3.1+ ab, in dem der CMV-Promotor durch 1265 bp des Ubiquitin-Promotors nach *Bgl* II/ *Hin*D III-Verdau ersetzt wurde. Als Quelle für den Ubiquitin-Promotor diente der Vektor pUbiJunB, der freundlicherweise von Dr. Peter Angel, Heidelberg zur Verfügung gestellt wurde.

Der Promotor erlaubt die Expression auf hohem Niveau von Genen in fast allen Geweben in Mausembryonen (M. Schorpp *et al.*, 1996). Invitrogen verwendet diesen Promotor in dem Vektor pUB6/V5-His und veröffentlichte die komplette Sequenz im Internet (<http://www.invitrogen.com>).

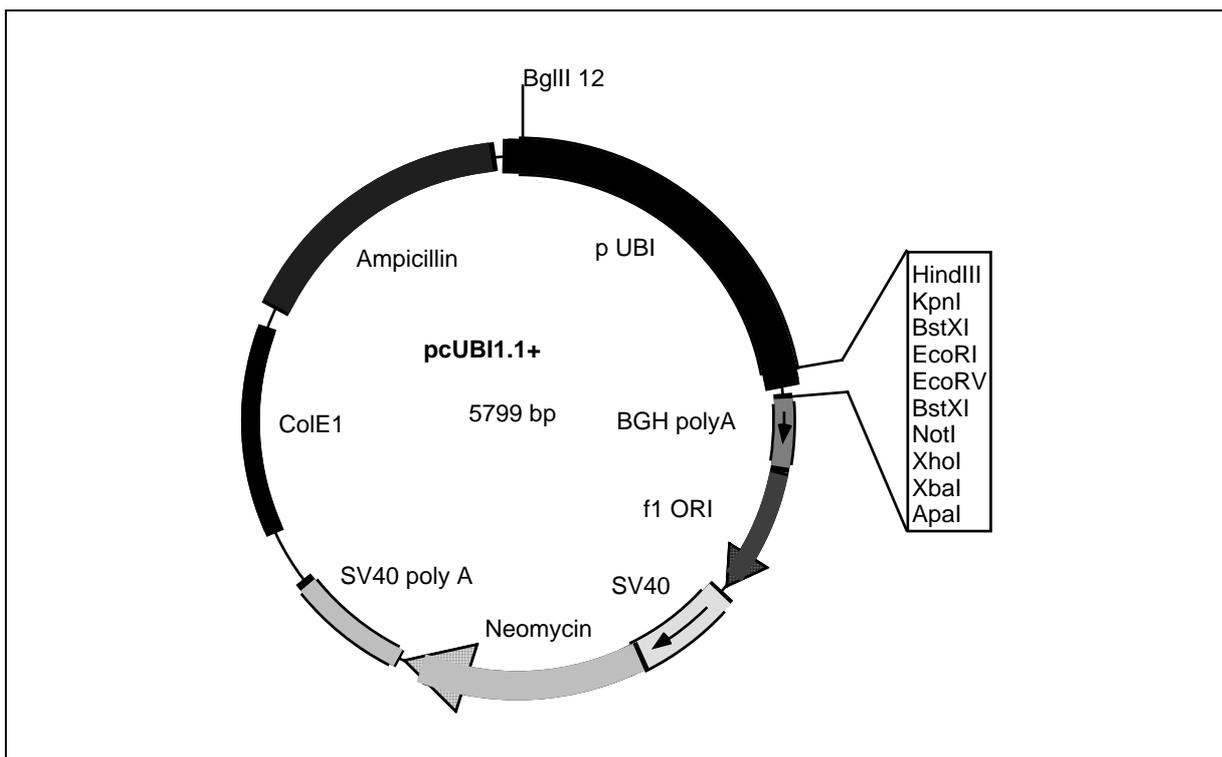


Abbildung 7-1: Vektor pcUBI 1.1+

Die mit diesem Vektor verwendeten cDNA-Fragmente sind in der Tabelle 7-1 beschrieben.

3.1.2 pT81luc

Der Vektor pT81luc⁴³ ist von Nordeen (1988) entwickelt worden, um die Luziferase-Aktivität (deWet *et al.*, 1985) unter der Kontrolle verschiedener Promotoren zu bestimmen. Eine große Auswahl an Restriktionsschnittstellen 5' vor dem *Luciferase*-Gen bietet vielfältige Klonierungs-möglichkeiten.

Der 6,6 kb große Vektor, der sich vom Plasmid p232AL-AΔ5' (de Wet *et al.*, 1987) ableitet, enthält zwischen den *Xho* I- und *Bgl* II-Schnittstellen den minimalen *Herpes simplex* Thymidinkinase (tk) Promotor aus dem Bereich -81 bis +52, bei dem die distale GC- und die CCAAT-Box entfernt wurden. Die vollständige Sequenz von pT81luc ist unbekannt.

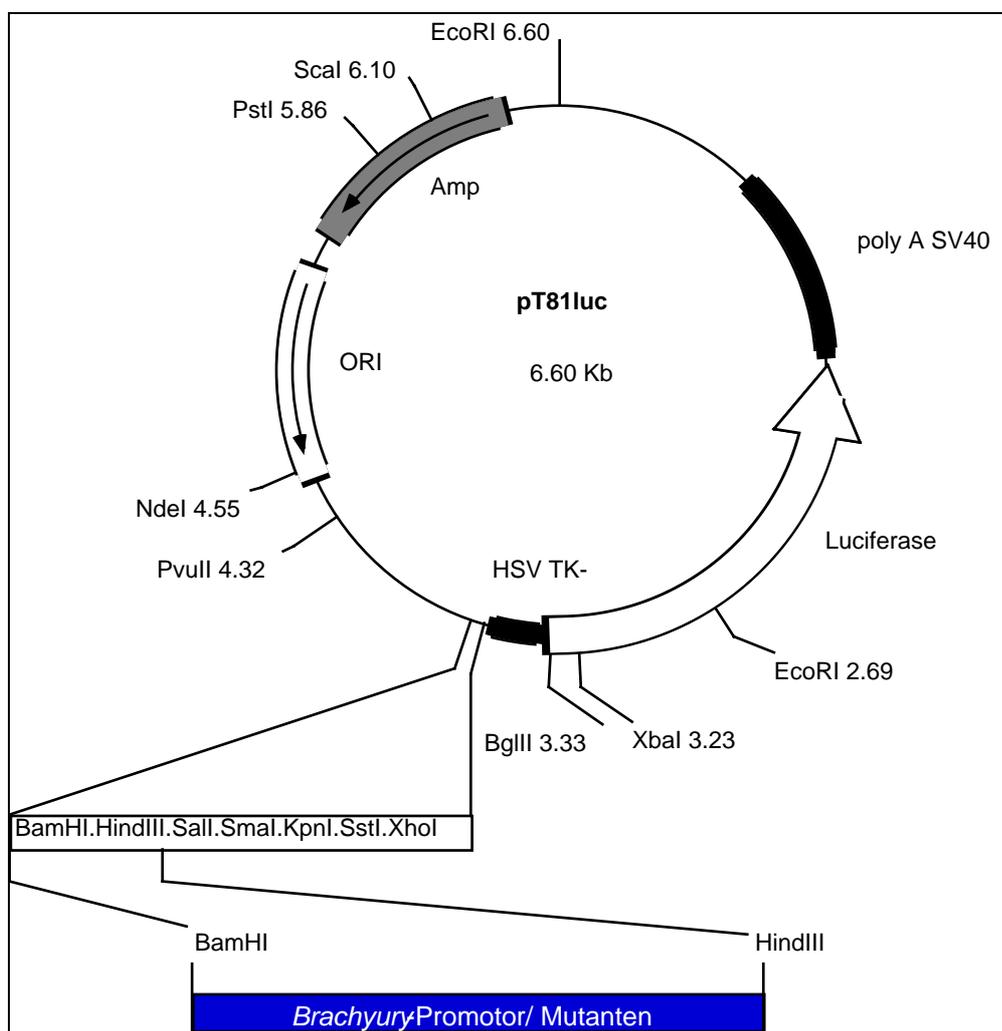


Abbildung 7-2: Plasmidkarte für pT81luc und der verwendeten T-Promotor Reporterkonstrukte.

3.2 Verwendete Expressionskonstrukte

⁴³ ATCC Nr.: 37574-37584

| Name | Beschreibung |
|---------------|--|
| CMV-gsc | <i>gsc</i> -cDNA in pRc/CMV Vektor als <i>HinD</i> III/ <i>Xba</i> I-Fragment |
| CMV+-gsc | <i>gsc</i> -cDNA in pcDNA3.1+ Vektor als <i>EcoR</i> I/ <i>Not</i> I-Fragment |
| CMV-gfpgsc | <i>gfpgsc</i> -cDNA in pRc/CMV Vektor als <i>HinD</i> III/ <i>Xba</i> I-Fragment |
| CMV-hgfpgsc | <i>hgfp</i> <i>gsc</i> -cDNA in pcDNA3.1+ Vektor als <i>EcoR</i> I-Fragment |
| CMV-Mycgsc | <i>Mycgsc</i> -cDNA in pcDNA3.1+ Vektor als <i>BamH</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment |
| ubineo-gsc | <i>gsc</i> -cDNA in Ubi-junB-Vektor als <i>Xba</i> I/ <i>Xho</i> I-Fragment; Vektor enthält pgk-neo Gen |
| pcUBI 1.1+ | pcDNA3.1+, enthält statt CMV-Promotor, Ubi-Promotor (aus Ubi-junB entnommen) als <i>Bgl</i> II/ <i>HinD</i> III-Fragment |
| pcUBI-gsc | <i>gsc</i> -cDNA in pcUBI1.1+ Vektor als <i>EcoR</i> I/ <i>Not</i> I-Fragment |
| pcUBI-hGFP | <i>hGFP</i> -cDNA in pcUBI1.1+ Vektor als <i>HinD</i> III/ <i>Xba</i> I-Fragment |
| pcUBI-hgfpgsc | <i>hgfp</i> <i>gsc</i> -cDNA in pcUBI1.1+ Vektor als <i>EcoR</i> I-Fragment |

Tabelle 7-1: Tabellarische Übersicht über die klonierten und verwandten Konstrukte:

4. Wichtige DNA-Sequenzen

4.1 DNA-Sequenz und Restriktionskarte des *hgfp**gsc*-Fusionskonstrukts

Die Sequenzen für *hGFP* und *gooseoid* (Maus) wurden aus der Genbank entnommen (*hGFP*: Accession-Nr.: U43284; *gsc*: Accession-Nr. M85271). Die Sequenz des *hgfp**gsc*-Fusionskonstrukts beinhaltet Restriktionsschnittstellen u.a. für die Enzyme: *Apa* I, *BstE* II, *EcoR* I, *Nco* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Sph* I; folgende Enzyme schneiden nicht: *EcoR* V, *Nde* I, *Sac* I, *Sal* I, *Sca* I, *Sma* I, *Xba* I, *Xho* I.

```

EcoR I           BstE II           Nco I
|               |               |
1 GAATTCNGCTTAACGGTGACCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGG
  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
  CTTAAGNCGAATTGCCACTGGCGGTGGTACCACTCGTTCCCGCTCCTCGACAAGTGGCCC

                                     M V S K G E E L F T G -
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
                                     | <- hGFP-Sequenz...

```

GTGGTGCCCATCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTGAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC

```

61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
   CACCACGGGTAGGACCAGCTCGACCTGCCGCTGCACTTGCCGGTGTTC AAGTCGCACAGG
   V V P I L V E L D G D V N G H K F S V S -
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120

   GCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
   CCGCTCCCGCTCCCGCTACGGTGGATGCCGTTGACTGGGACTTCAAGTAGACGTGGTGG
   G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T -
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180

   GGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAAGTGC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
   CCGTTCGACGGGCACGGGACCGGGTGGGAGCACTGGTGGAAAGTGGATGCCGCACGTCACG
   G K L P V P W P T L V T T F T Y G V Q C -
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240

   TTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
   AAGTCGGCGATGGGGCTGGTGTACTTCGTCGTGCTGAAGAAGTTCAGGCGGTACGGGCTT
   F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E -
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300

   GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
   CCGATGCAGGTCCCTCGCGTGGTAGAAGAAGTTCCTGCTGCCGTTGATGTTCTGGGCGCGG
   G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A -
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360

   GAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
   CTCCACTTCAAGCTCCCGCTGTGGGACCACTTGGCGTAGCTCGACTTCCCGTAGCTGAAG
   E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F -
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420

   AAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
   TTCTCCTGCCGTTGTAGGACCCCGTTCGACCTCATGTTGATGTTGTCGGTGTTCGACG
   K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V -
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480

   TATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC TCAAGATCCGCCACAAC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
   ATATAGTACCGGCTGTTGCTCTTCTTGCCGTAGTTCCACTTGAAGTTC TAGGCGGTGTTG
   Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N -
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540

```

```

ATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TAGCTCCTGCCGTCGCACGTCGAGCGGCTGGTGATGGTCGTCTTGTGGGGGTAGCCGCTG

I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D -
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600

GGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CCGGGGCACGACGACGGGCTGTTGGTGATGGACTCGTGGGTGAGGCGGGACTCGTTTCTG

G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K D -
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660

CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACT
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
GGGTTGCTCTTCGCGCTAGTGTACCAGGACGACCTCAAGCACTGGCGGCGGCCCTAGTGA

P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T -
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720

                                     Sph I
                                     |
CACGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCATGCCCGCCAGCATGTTTCAGCATCGACAACATC
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
GTGCCGTACCTGCTCGACATGTTCCCGTACGGGCGGTTCGTACAAGTCGTAGCTGTTGTAG

H G M D E L Y K G M P A S M F S I D N I -
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
...hGFP-Sequenz ->| |<- goosecoïd-Sequenz...

CTGGCCGCCCCGGCCGCGCTGCAAAGACGCGGTGCTCCCGGTGGCGCCAGCGCCGCGGCT
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
GACCGGCGGGCCGGCGCGACGTTTCTGCGCCACGAGGGCCACCGCGGGTCGCGGCGCCGA

L A A R P R C K D A V L P V A P S A A A -
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840

CCGGTGGTCTTCCCGGCTCTACACGGGGACTCGCTCTACGGCGCCGGCGGCGGCACCTCC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
GGCCACCAGAAGGGCCGAGATGTGCCCCTGAGCGAGATGCCGCGGCCGCCCGCTGGAGG

P V V F P A L H G D S L Y G A G G G T S -
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900

TCGGA CTACGGCGCCTTCTACCCGCGCCCTGTGGCCCCCGGAGGCGGGCCTCCCGGCC
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
AGCCTGATGCCGCGGAAGATGGGCGCGGGACACCGGGGCCTCCGCGCCCGGAGGGCCGG

S D Y G A F Y P R P V A P G G A G L P A -
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960

```

```

                                     Pvu II
                                     |
961 GCGGTCGGCACCTCCCGCCTGGGCTACAACAGCTACTTCTACGGGCAGCTGCACGTGCAG 1020
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGCCAGCCGTGGAGGGCGGACCCGATGTTGTTCGATGAAGATGCCCCGTCGACGTGCACGTC

A V G T S R L G Y N S Y F Y G Q L H V Q -
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020

                                     Apa I
                                     |
1021 GCGGCGCCCGTGGGCCCCGGCTTGCTGCGGGGCTGTGCCCGCGCTGGGCGCCCAGCAGTGC 1080
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGCCGCGGGCACCCGGGCCGAACGACGCCCCGACACGGCGGGCACC CGCGGGTTCGTACAG

A A P V G P A C C G A V P P L G A Q Q C -
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080

                                     Apa I
                                     |
1081 TCCTGCGTCCCGACGCCCCCAGGCTACGAGGGCCCCGGTTCGTACTGGTGTCTCCGGTG 1140
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGACGCAGGGCTGCGGGGGTCCGATGCTCCCGGGGCCAAGACATGACCACAGAGGCCAC

S C V P T P P G Y E G P G S V L V S P V -
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140

                                     Pvu II
                                     Pst I
                                     |
1141 CCGCACCAGATGCTGCCCTACATGAACGTGGGCACGCTGTTCGCGCACTGAGCTGCAGCTG 1200
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCGTGGTCTACGACGGGATGTACTTGCACCCGTGCGACAGCGCGTGACTCGACGTCGAC

P H Q M L P Y M N V G T L S R T E L Q L -
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200

                                     Pvu II
                                     |
1201 CTCAACCAGCTGCACTGTCGGCGGAAGCGGGCGGCACCGCACCATCTTCACCGATGAGCAG 1260
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGTTGGTTCGACGTGACAGCCGCTTCGCCGCCGTGGCGTGGTAGAAGTGGCTACTCGTC

L N Q L H C R R K R R H R T I F T D E Q -
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
1261 CTCGAAGCCCTGGAGAACCTCTTCCAGGAGACGAAGTACCCAGACGTGGGCACCTCGGGAG 1320
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGCTTCGGGACCTCTTGGAGAAGTCTCTGCTTCATGGGTCTGCACCCGTGAGCCCTC

L E A L E N L F Q E T K Y P D V G T R E -
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320

                                     Pvu II
                                     |
1321 CAGCTGGCCAGGAAGGTGCACCTTCGGGAGGAGAAGGTGGAGGTCTGGTTTAAGAACCGC 1380
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGACCGGTCCCTTCCACGTGGAAGCCCTCTCTTCCACCTCCAGACCAAATTCTTGGCG

Q L A R K V H L R E E K V E V W F K N R -
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380

```

```

CGAGCCAAGTGGAGACGACAGAAGCGATCCTCCTCGGAGGAGTCAGAAAACGCCGAGAAG
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GCTCGGTTACCTCTGCTGTCTTCGCTAGGAGGAGCCTCCTCAGTCTTTTGC GGCTCTTC

R A K W R R Q K R S S S E E S E N A E K -
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440

TGGAACAAGACGTCTCAAAGCCTCGCCGGAGAAGAGGGAAGGAAGGTAAAAGCGAT
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
ACCTTGTTCTGCAGGAGTTTTTCGGAGCGGCCTCTTCTCCCTTCTCCTTCCATTTTCGCTA

W N K T S S K A S P E K R E E E G K S D -
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500

          Pvu II              EcoR I
          |                   |
TTGGACTCGGACAGCTGAAGTTAACCCAAGCCGAATTCGATA
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1542
AACCTGAGCCTGTCGACTTCAATTGGGTTTCGGCTTAAGCTAT

L D S D S * -
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1542

```

4.2 Sequenz des *Brachyury*-Promotors der Maus

Neben dem verwendeten 650 bp Promotor Fragment (Genbank-Auszug: ACCESSION-Nr. U61531) sind die Hybridisierungssequenzen der Oligonukleotide eingezeichnet, die zur Herstellung der Längenmutanten verwendet wurden. In dieser Sequenz sind die genauen Bereiche, die die jeweiligen *Brachyury*-Promotor Längenmutanten (siehe Kapitel IV Ergebnisse, *Abbildung 4-14* und *Tabelle 4-4*) einschließen, markiert. Die Bereiche, an der die verwendeten Primer (Kapitel Materialien und Methoden) binden, sind unterstrichen; die Positionen sind in Bezug auf die Transkriptionsstartstelle nummeriert, bzw. nach ihrer Stelle in dieser Auflistung in Klammern angegeben.

T650 ab Position -499 (= 1), T530 ab Position -401 (= 99); T441 ab Position -307 (= 194); T333 ab Position -200 (= 301); T230 ab Position -104 (= 397); T114 ab Position -10 (= 491).

```

LOCUS      MMU61531      658 bp      DNA      ROD      31-AUG-
1996
DEFINITION Mus musculus Brachyury gene, partial cds.
ACCESSION U61531
SOURCE     house mouse.
ORGANISM   Mus musculus
            Eukaryotae; mitochondrial eukaryotes; Metazoa;
            Chordata; Vertebrata; Eutheria; Rodentia;
            Sciurognathi; Myomorpha; Muridae; Murinae; Mus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 658)
AUTHORS    Clements,D., Taylor,H.C., Herrmann,B.G.and Stott,D.
TITLE      Distinct regulatory control of the Brachyury gene in
            axial and non-axial mesoderm suggests separation of

```

```

mesoderm lineages early in mouse gastrulation
JOURNAL   Mech. Dev. (1996) 56, 139-149
FEATURES  Location/Qualifiers
  source   1. .658
           /organism="Mus musculus"
           /chromosome="17"
           /map="t complex, proximal to qk"
  5'UTR    500. .651
  gene     652. .658
           /gene="Brachyury"

BASE COUNT      99 a      211 c      220 g      128 t

```

U61531 Length: 658 March 5, 1998 14:30

```

1  CCGCGGGGCA AAGTCGCAGG CGCCGGTGTG CGCTTGGACA GCGCGTGGGA
51  GTGGAGAGTT TAGCAGTGGC TCTAGGAGCC AGGGTCCTGG GTGGCTCCAG
101 CCCGGCTTCT CGCCCTCCCT CCCCCAGGGT CCGCCCCGCC GCTTTGATGG
151 AGGTGCAAAC ATTTGGGGGA GGGCGGGGGT GTCGGGACTG CGCCCGACGC
201 TTTCCTTACA GGAAGCGCGC GCTGGAGCCC ATTGTTGGCC CCCAGCCTCC
251 GGGCCCCGCC GGCCAGTCTG ACACGGCCGC GCACCGCCAA TGGGCAGCTG
301 CTCGGTACTT CAAAGGGTGT CCCGCCCAAT CCGCCGCACC CCCTGCCGAG
351 GCCACCACGG CTGTATTTAT GGGGAGGGGA CCCATTTTTC TCTTCCCCAG
401 AGACTTACTC TTGTGCCGCC TTGCGGGAGT TCAAGTGGAG CCACGGCTCC
+1
451 CCAGGCCCTC TCCCCCATCC CCGCCCCCTT CCCCCCTCAT CCCGATCTCG
501 GTGCTCCTTT GGCGAATGTG CAGGGACCCA GGTGTAATCT TTGGGCTCCG
551 CAGAGTGACC CTTTTTCTTG GAAAAGCGGT GCGGAGAGAA GTGAAGGTGG
601 CTGTTGGGTA GGGAGTCAAG ACTCCTGGAA GGTGGAGAGG GTGGCGGGAG
651 G ATG AGC T

```

4.3 Vimentin-Promotor der Maus

Modifizierter Genbank Auszug (ACCESSION Z22526) für den *Vimentin*-Promotor. Die in der Sequenz vorkommenden potentiellen *gooseoid*-Bindestellen, sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

LOCUS MMVMTINA 3397 bp DNA ROD 07-OCT-1996
 DEFINITION M.musculus vimentin.
 ACCESSION Z22526
 KEYWORDS vimentin.
 SOURCE house mouse.
 ORGANISM Mus musculus
 Eukaryotae; mitochondrial eukaryotes; Metazoa;
 Chordata; Vertebrata; Eutheria; Rodentia;
 Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
 REFERENCE (bases 1 to 3397)
 AUTHORS Hennekes,H., Kuehn,S. and Traub,P.
 TITLE Coding sequence and flanking regions of the mouse
 vimentin gene
 JOURNAL Mol. Gen. Genet. 221, 33-36 (1990)
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1. .3397
 /organism="Mus musculus"
 /chromosome="2"
 /product="vimentin"
 /db_xref="SWISS-PROT:P20152"
 /translation="MSTRSVSSSSYRRMFGGSGT"
 BASE COUNT 897 a 883 c 733 g 884 t

Z22526 Length: 3397 January 30, 1998 13:15

```

1 GGATCCTTGG CTGTCCTTGA AATAGCTATG TAGAAAAAAT TGGCCTCAAA
51 CTTCTGATCT TCCTGGCTCC AGTTTCCAAG TAGTAGGATT ACAGGTTTGC
101 ATCACGTTGT CTGTTTTACC CACCATCTCA GTTCTAATAT TCAAGCAGAA
151 GGGTCTGCTA CCTGCAGTAC TCTTGACATG ACTTCCTGTA GGCAGCTCTT
201 CCAAACTCG ATAGGCCACT AAGCTCCTGT CCACACGGCT GGCTGCCCTG
251 TCAGCTCAAG TCACCATGTT AACTGACAT GGCCAGAGCT TGCAAATTCC
301 AAAATCACTC TGTTAAGTAC TCTGATAGTA TTTGTGCCTG ACCTACAAAT
351 CATATGACCA TTCACTTACT TATATACAAA CTTGCATCAC AAATAAGTCC
401 AGATTTAAAA ATACTTCTGA GATAGGTTTT CATTGCAATC AAAAATAAAT
451 ATGAAAATA AGAAAGCTAT GCTCATAGAC TGTTTTTTTT TCTTCAAAAA
501 TAAGCACACA GTGAATGATC GCAAGAATAC ACACTCCAAT ATACTGATTT
551 CTCTTTTCTG TGAATATCAT ATAGTAGAGA AAGCGTGCTG TGAGAGAGAG
601 AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAA AGAGAGAGAG
651 AGAGAGGAGT GTGTGTGGTA TAAGTATGTG TGTGCAAGTG TACATGTGTG
701 CATGTATGTA GGCATGTGTG CATATGTGTG TGATGAAGCA AACTTTTTTTC
751 CAAGTCTAAT GACTTCTCCT CTTCTCCATG AATGACTAAA AATATTTTTG

```

801 TAGCAGTTTT TACGTCTCTA CCCTCTAAAA ACTTTTTTAAA AGGAAGAATA
851 ACGTGAAGAT AAACAAACCG GTTCATCCAT TACCATATCA GCAATAAAAG
901 GAGAATATTC ATCAATGTCC CTGAAGCTAA AAAAAAAAAA AAAAAGGCCA
951 GGAAGGGACC CCCTTCAGGT GATGAAGAGG AGCAGAGCCT ACTGAAGAAG
1001 TCATCACAAC CTGAGGAATT TGCTGTGGTG CCCACATGGC ATACTGCCAC
1051 ACCGTACCAC AACCCATTCC TCTTTTTCCA CAGTGACTION TTAAGCAAGA
1101 GTTCCCTGAC AAAGCCACTG CACTGCCCTG GGATCTACAA ACTATGTAGG
1151 AGGAAGGCTA GCCTCCCTCC TCCCCACAGG AAATCACTTT CCTCATCCTG
1201 AGCCATTCCG AGCAATCTCA CAATGGTGAC ATTTGCTGAA CCATGGCTTG
1251 AATAAAAGGC TCTCAGTGTG CAGAATGGTA ACGTGAGGCA CAGGCTAACC
1301 CTGGCAGTGC TCTCTGGAAA GGACCCACAG CCTCTCTTTG AAAGGAGAAT
1351 AAAGAAAGGC ACAGCAGGAG AGCTGGGTCC CAGAGAGTCC TGCAGGCAAC
1401 CTTGACCGCA GCATTCCCAG AACTGACTGA GATGAGGTGC ACAAAGGGTT
1451 GCTTCAAAGA GTCTTGTACA AAAAAGCTAG CATAAATCCT GCACGTGTCT
1501 CTAAACGGCC TTTCTTAAT GCCAGGTAAG CTGGGAACAC TCTGTGCTCC
1551 AAAGAAAAAC AAAAGCAAAA ACAAATAACA AGCTCCTTTT CCTTCCCTAT
1601 TCACTAATGG ACCCATCTCC CAGTTTGTTT GTTTTTGTTT CAGTACTCCA
1651 CAAATCCCAA ACCAAAAGAA ACTGTAATTT TTCTATCCGT GCTTAATCAC
1701 AAAGGGCCTA ACTTCCCTTT CTTGAAAAGT CCTTTTCCCT TGGAGAACGG
1751 AGACCCCTTA GTCTTGCCTA GAAGCAAACG TGAAGCAATA GCCTTGAGCT
1801 GGTCATTTTC CCTTTGAAAA GGTGACAGTC GCTGCATCTC AACACTCTGA
1851 ACCTTTTGTT TTGTGGACAG TTGTCGCCAT TTCAAGTTAG ATTTCATGAT
1901 TTTTCTTTGT GGAAAATAGG ATCTGTGCGT TGCCAGACA AGTCACTAGA
1951 ATCTTCTCCC CTGCATCGCT GCTCTAAAAT CTACAGAAAT CTGTTTCTTC
2001 AGTTTATCAC TTGAGCTACA TAACTGCCTT TCTTCCGAAC TCATTACCCG
2051 AATTGGATTT TTTAGCAAAA CCAATGGTT TCTTGTCGGA CTTGCTTATC
2101 TTCATAATGCA GTCCACTTTC AGAAAGGCCG AGATCACTGG GCTTGCTTTT
2151 GAAATTAACCA AAGTAGTTTC CTCTTTCACC CAGAACTTAG GGTGTGGTTT
2201 CATGCAGGAA AGAGAGAGAG AGAAAGAAAG AGAGAAAGGG GGAGGGAGGG
2251 AAGGAGGGAG GGAGGGAGCT TTTGTCTCA GGGGTGGGGA TGGGGGTAGG

2301 GGTGTGTGGA TGTGTTTTGT GGCTCTCCCG GGTCTGCAAG AGTTTCTTTC
 2351 TAAGGAGAAC TCTCCACACT TCCCAACAA TCACAAGAAC GGTATTCTC
 2401 AAAGTTGGTT TAAAACTTCG GACAATGAAT GAGCTTAGCG CTCTTGGAGT
 2451 CTGGAGTCAA TCTCAACTAA CGGTTTTCTT GAACCGCTAG ACGATCTCAC
 2501 CCTCAGGGCT CCATGAGTCA TATCCACTGA CTCAGCGACC CCACCCCGTC
 2551 CCCTGGGCTT TACTCCAGAG GCAGTGGCTC **CTAAT**CCTCT CTAGTTGAAC
 2601 TGAGTCCGTT AGATCAGGGG ATATGACCAC GTCAAACAAG CCCTCTGCAA
 2651 AGGTCTTGAG CCAGATATCT TGGGCTGTGT GCTTCTCCAC CCCCAATCTC
 2701 GGGCCCTCTT TGTTTTCTCTC TCCCCGGCTT CCGATCTGCA GGACTGCTTT
 2751 TGCAGGCTCT TCCTGCTCCT CCGCTCTCGG ATCTCCCCAC CCACCCAGTC
 2801 CCAGAAGACC GCAGATCTGC GACTGCGACC ACGCCCCTCC TACCAGCGCG
 2851 CCTAGTCCCA CGCCCCTTTG GCCCAGTGCC AGGGATCGCT TTA CTCAACT
 2901 TTCCAGAGCC CCCCTTCCTT CCCCATGAA TCCTTCCCGC GATCCCTTCT
 2951 TTCTCAGCAC CCAAGGGTGA GTAGAGAGTT CGGGTGATCA CCAGGAAAGC
 3001 CCCTGAAAGG CCTAGCACTT **CCAATA**GTA ACAGGACTGT GCTTGATAACC
 3051 CTACAGCCCT GGAGGAAGGC TCGAGGGGAG CTCCCTCCCC CACCCCTTCT
 3101 CCTCACTTCT TTCCGGGTCC CCATTGGCTG GCTCGCTCGG CGGCTAGGAT
 3151 GGCAGTGGGA GGGGACCCTC TTTCCTAACA GTGTTATAAA AGCAGCGCCC
 3201 TTGGCGTTGT CCAGTCCCTCT GCCACTCTTG CTCCGGGACC CCAGAGACCC
 3251 CAGCGCTCCT ACGATTCA CA GCCACCGCGC CCTCATTTCC TTGTTGCAGT
 3301 TTTTCCAGCC GCAGCAAGCC AGCCACCTT CGAAGCC**ATG** TCTACCAGGT
M S T R . . .