

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6689

**Etablierung und Analyse AP-2 γ defizienter und
konditional defizienter Mauslinien**

Die Funktion von AP-2 γ während der Entwicklung der Maus

Uwe Werling

Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH) genehmigte Dissertation

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
2001**

Impressum der Print-Ausgabe:

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)**

ISSN 0947-8620

Etablierung und Analyse AP-2 γ defizienter und konditional defizienter Mauslinien

Die Funktion von AP-2 γ während der Entwicklung der Maus

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der

Universität Karlsruhe
genehmigte

DISSERTATION

von

Uwe Werling

Kandel

2001

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2001
Referent: Prof. Dr. P. Herrlich
Korreferent: Priv. Doz. Dr. C. Englert

Zusammenfassung

Die AP-2 α - und AP-2 β -Knockout-Studien deuten darauf hin, daß jedes AP-2-Protein eine individuelle Funktion in der Mausentwicklung besitzt. AP-2 γ wird während der frühen Entwicklung extraembryonal in den Trophoblastenzellen und während der späten Entwicklung in der Neuralleiste exprimiert. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Frage nach der Funktion von AP-2 γ während der Entwicklung der Maus. Nach der Restriktionskartierung und partiellen Sequenzierung des genomischen Lokus klonierte ich einen Gen-Targetingvektor und inaktivierte das AP-2 γ -Gen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen. Durch Injektion der ES-Zellen in Blastozysten, welche in die Uteri scheinsschwangerer Ammenmäuse transferiert wurden, konnte ich AP-2 γ -defiziente Mäuse erzeugen und analysieren. Ich konnte zeigen, daß AP-2 γ für die frühe Embryonalentwicklung essentiell ist, da die Nullmutanten ab Tag 7,5 der Embryonalentwicklung im Wachstum retardieren und bis Tag 9,5 dpc. resorbiert werden. Meine Ergebnisse belegen, daß der Verlust von AP-2 γ zu einer verminderten Proliferation der Zellen im extraembryonalen Ektoderm und im ekto-plazentalen Konus führt, und die Anzahl von Riesenzellen vermindert ist. Als Folge davon kann sich das aus Chorion und Allantois gebildete Labyrinth nicht entwickeln, der Embryo wird nicht genügend mit Nährstoffen versorgt und stirbt.

Experimente an kultivierten Blastozysten zeigen, daß die Expression von Adenosindeaminase (ADA) bei AP-2 γ -defizienten Blastozysten stark verringert ist. ADA katalysiert als zentrales Enzym des Purinstoffwechsels den Abbau des Zellgifts Desoxyadenosin. Wird zu wenig ADA exprimiert, dann akkumuliert Desoxyadenosin, und die Zellen sterben ab. Dies ist eine weitere mögliche Erklärung für den Tod der Nullmutante. Meine Ergebnisse zeigen, daß AP-2 γ eine essentielle Funktion bei der Entwicklung der extraembryonalen Gewebe besitzt. AP-2 γ scheint sowohl die Proliferation der Zellen im ekto-plazentalen Konus, als auch die Expression mindestens eines Zielgens, nämlich ADA, zu fördern. Um den früh letalen Defekt im Trophoblasten der AP-2 γ -defizienten Maus zu umgehen, erzeugte ich unter Verwendung des Cre/loxP-Rekombinasesystems eine konditional AP-2 γ -defiziente Mauslinie, die in eine Mox2Cre-Mauslinie eingekreuzt wurde. Der Mox2-Promotor vermittelt die strikt epiblastspezifische Inaktivierung des AP-2 γ -Gens, weshalb AP-2 γ im Trophoblasten aktiv bleibt und die Analyse der AP-2 γ -Funktion im Embryo selbst ermöglicht. Weiterhin wurde die konditionale AP-2 γ -Linie in eine Wnt1-Cre-Mauslinie eingekreuzt, um die Aufgabe von AP-2 γ bei der Bildung der Neuralleiste und die Funktion in den Neuralleistenderivaten zu studieren.

Establishment and Analyses of AP-2 γ Deficient and Conditionally Deficient Mice Lines - The role of AP-2 γ during mouse development

Abstract

Studies of AP-2 α and AP-2 β knockouts indicate that both proteins have distinct functional roles during murine development. AP-2 γ is expressed in trophoblast cells during early embryogenesis and in the neural crest during later developmental stages. In this work I addressed the question of the role of AP-2 γ using gene-knockout technologies. Therefore, after restriction mapping and partial sequencing of the genomic locus I generated a gene targeting vector to inactivate the AP-2 γ gene by homologous recombination in embryonic stem cells. The ES-cells were injected in blastocysts and the latter was transferred into the uteri of pseudopregnant foster mice. The germline transmitting offspring was bred in order to generate and analyze mice deficient for AP-2 γ .

I was able to demonstrate that AP-2 γ is essential for early embryogenesis, for the nullmutant displays a significant retardation in growth by day 7.5 dpc. and is resorbed by day 9.5 dpc.. The loss of AP-2 γ leads to a reduction in cell proliferation in the extraembryonic ectoderm and in the ectoplacental cone, as well to a reduced number of giant cells. As a consequence the labyrinthlayer, derived from chorion and allantois fails to form. The embryo suffers from deprivation of nutrients and, as a consequence, dies.

In addition, *in vitro* experiments with cultured blastocysts show that the expression of adenosine deaminase (ADA) is highly reduced. ADA is a purine catabolic enzyme that converts cytotoxic deoxyadenosine to deoxyinosine. The reduced ADA expression leads to the accumulation of the toxin, and thus to cell death. This could be a further explanation for the death of the nullmutant.

My results show, that AP-2 γ plays an essential role in the development of extra-embryonic tissues. AP-2 γ seems to regulate the proliferation of cells in the ectoplacental cone and the expression of at least one target gene, which is ADA.

By using the Cre/loxP recombination system I generated a conditional AP-2 γ -knockout-mouse to circumvent the early lethal defect in the trophoblast. This mouse has been crossed with a Mox2Cre-mouse, because the Mox2-promoter mediates a strict epiblast inactivation of the AP-2 γ -gene. Thus, AP-2 γ is still active in the trophoblast and allows the analysis of AP-2 γ function in the embryo proper. Furthermore, the conditional AP-2 γ -mouse has been crossed with a Wnt1-Cre-mouse to analyze the function of AP-2 γ in the development of the neural crest and its derivatives.

Inhaltsverzeichnis	
Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IIIX
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1 Die Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren	1
1.1.1 Die Entdeckung der AP-2-Transkriptionsfaktoren	1
1.1.2 Biochemische Eigenschaften der AP-2-Familie	1
1.1.3 AP-2: Ein Regulator der Expression	3
1.1.4 Expressionsmuster der AP-2-Gene	4
1.1.4.1 Die AP-2 γ -Expression während der frühen Embryonalentwicklung ...	4
1.1.5 Regulation der AP-2-Expression.....	6
1.1.6 AP-2 reguliert die Proliferation und Apoptose über die Interaktion mit c-myc.....	6
1.1.7 AP-2-defiziente Mäuse.....	8
1.2 Gen-Targeting: Zielgerichtete Mutagenese des Mausgenoms	12
1.2.1 Prinzipieller Aufbau eines Knockout-Targetingvektors	13
1.2.2 Grenzen des konventionellen Gen-Targetings	15
1.2.3 Das Cre/loxP-System: Aufrüstung des Gen-Targetings	15
1.2.4 Das konditionale Gen-Targeting: Neue Möglichkeiten mit dem Cre/loxP-System.....	17
1.3 Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Bezugsquellen von Materialien, Reagenzien und Chemikalien.....	21
2.1.2 Plasmide	25
2.1.3 Bakterien	25
2.1.4 Zellen.....	26

2.1.5 Cre-Mauslinien	26
2.1.6 Antikörper	26
2.1.7 Oligonukleotide	27
2.1.8 Lösungen für die <i>In situ</i> Hybridisierung	28
2.1.9 Radiochemikalien	29
2.1.10 Lösungen und Medien	29
2.1.11 Lösungen für Southern-Blot	29
2.1.12 Medien und Lösungen für ES- und Blastozystenkultur	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Analyse von Nukleinsäuren	31
2.2.2 DNS-Präparation	32
2.2.3 DNS/RNS-Gelelektrophorese	33
2.2.4 Klonierungstechniken	34
2.2.5 Herstellung radioaktiv markierter Sonden	36
2.2.6 Southern-Blot Analyse	37
2.2.7 Sequenzierung von Plasmid-DNS	37
2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
2.2.9 Histologie von Mausembryonen	39
2.2.10 Antikörperfärbungen auf Paraffinschnitten	41
2.2.11 Proliferationsnachweis auf Paraffinschnitten (PCNA-Färbung)	42
2.2.12 Isolierung von genomischer DNS	42
2.2.13 Präparation Digoxigenin-markierter Sonden mittels in vitro- Transkription	43
2.2.14 <i>In situ</i> Hybridisierung im Totalpräparat („Whole mount“ <i>in situ</i> Hybridisierung)	44
2.2.15 Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)	46
2.2.16 Kultivierung von Blastozysten	51
2.2.17 Blastozysteninjektion	52
3. Ergebnisse	55
3.1 Kartierung des genomischen AP-2 γ -Lokus	55
3.2 Klonierungsstrategie des konditionalen Targetingvektors	59

3.2.1 Sequenzierung des modifizierten Oligonukleotids im Targetingvektor	63
3.3 Homologe Rekombination des Targetingvektors in embryonalen Stammzellen	65
3.3.1 Nachweis der homologen Rekombination mittels Southern Blot	65
3.3.2 Statistik der homologen Rekombination	69
3.4 Die Cre-vermittelte Exzisionsreaktion erzeugt das Knockout- und das konditionale Knockoutallel	70
3.4.1 Southern Blot-Strategie zum Nachweis des konditionalen Allels und des Knockout-Allels	70
3.4.2 Nachweis des konditionalen Allels und des Knockoutallels	72
3.4.3 Statistik der Cre-vermittelten Exzisionsreaktion	74
3.4.5 Überprüfung der Funktionsfähigkeit des konditionalen Allels	76
3.5 Erzeugung einer AP-2 γ -Knockout-Mauslinie und einer konditionalen AP-2 γ -Knockout-Mauslinie	78
3.6 Analyse der AP-2 γ -Knockout-Maus	81
3.6.1 Erhöhte Letalität der heterozygoten Knockout-Tiere am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung	81
3.6.2 Resorption der homozygoten Nullmutante am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung	82
3.6.3 Retardiertes Wachstum und Gastrulationsdefekt der AP-2 γ -Nullmutante am Tag 8,0 der Embryonalentwicklung	83
3.6.4 AP-2-Expression im Wildtyp während der frühen Embryonalentwicklung	84
3.7 Etablierung eines Blastozysten Kultursystems	90
3.7.1 Nachweis der AP-2 –Expression im Kultursystem	91
3.7.2 Die Trophektodermzellen der Nullmutante verlieren ihren epithelialen Charakter, der Keimknoten seine kompakte Struktur	91
3.7.3 Analyse von AP-2 γ -Zielgenen	92
3.8 Gewebespezifische AP-2 γ -Defektmutanten	95
3.8.1 Wahl der Cre-Mauslinien	95

3.8.2 Etablierung der gewebespezifischen Defektmutanten	95
4. Diskussion.....	98
4.1 Die Plazenta – Funktion und evolutive Aspekte der Plazentaentwicklung	98
4.1.1 Aufbau der Plazenta – Die Trophoblastensubpopulationen.....	99
4.1.2 Funktion der Riesenzellen.....	99
4.1.3 Die Entstehung des Labyrinths	100
4.1.4 Initiation der Morphogenese der Chorioallantois	101
4.1.5 Oberflächenvergrößerung der Chorioallantois.....	101
4.1.6 Vaskularisierung des Labyrinths.....	102
4.1.7 Aufgabe des Labyrinths beim Nährstofftransport.....	102
4.2 Defekte der AP-2 γ -defizienten Maus	103
4.2.1 Proliferationsdefizienz im ektoplazentalen Konus.....	103
4.2.1.1 AP-2 γ -defiziente Tiere zeigen eine verminderte Riesenzellenbildung	104
4.2.2 Die Nullmutante bildet kein Labyrinth	105
4.2.2.1 Bedeutung der Proliferationsdefizienz im extraembryonalen Ektoderm für die Entwicklung des Labyrinth.....	105
4.2.3 Potentielle Vermittler der Defekte: AP-2 γ -Zielgene.....	106
4.2.3.1 Keine Fehlregulation der E-Cadherin-Expression in der Blastozystenkultur	107
4.2.3.2 Stark verringerte Expression von Adenosindeaminase.....	107
4.2.3.3 Modell des Wirkmechanismus von Desoxyadenosin bei reduzierter ADA-Aktivität.....	108
4.2.4 <i>In vivo</i> -Modell	110
4.2.5 Entwicklung eines Modells für die Wirkmechanismen von AP-2 γ	111
4.3 Ausblick.....	113
5. Literaturverzeichnis	115
6. Anhang.....	127
6.1 Humanes AP-2 β -Gen	127
6.2 Sequenzvergleich der murinen AP-2 β -cDNS mit der murinen AP-2 γ -cDNS.....	136
6.3 Restriktionskartierung der PCR-Fragmente des murinen AP-2 γ -Gens	139

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Schematische Darstellung des dimeren AP-2-Proteinkomplexes	2
Abbildung 1.2	Selektion von homolog rekombinierten ES-Klonen ..	14
Abbildung 1.3	Schematische Darstellung der loxP-Sequenz	16
Abbildung 1.4	Cre vermittelte Rekombination zweier loxP-Sequenzen in Abhängigkeit von deren relativen Orientierung zueinander	16
Abbildung 1.5	Schematische Darstellung des konditionalen Gen-Targetings	18
Abbildung 3.1	Graphische Darstellung der Laufwerte der Marker-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe	56
Abbildung 3.2	Schematische Darstellung des genomischen AP-2 γ Locus der Maus	58
Abbildung 3.3	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des Targetingvektors	60
Abbildung 3.4	Schematische Darstellung des modifizierten Oligonukleotids mit loxP-Sequenz und Asp718-Schnittstelle	62
Abbildung 3.5	Autoradiographie des modifizierten Oligonukleotids	64
Abbildung 3.6	Nachweis der homologen Rekombination im Southern Blot	66
Abbildung 3.7	Nachweis der homologen Rekombination des Targetingvektors bei den ES-Klonen hr#59 und hr#184 mittels Southern Blot	68
Abbildung 3.8	Nachweis der Exzisionsprodukte im Southern Blot ..	71

Abbildung 3.9	Die Cre vermittelte Exzisionsreaktion generierte aus dem homolog rekombinierten Allel der Klone hr#59 und hr#184 das Knockout-Allel und das konditionale Knockout-Allel	73
Abbildung 3.10	Die Cre vermittelte Exzisionsreaktion erzeugt zu 44% das Knockoutallel und zu 6% das konditionale Knockoutallel	74
Abbildung 3.11	Schematische Darstellung der „Drei-Primer-PCR“ ...	75
Abbildung 3.12	Die transiente Cre-Expression erzeugt <i>in vitro</i> aus dem konditionalen Knockoutallel das Nullallel	77
Abbildung 3.13	AP-2 γ -Chimären	80
Abbildung 3.14	Der AP-2 γ -Knockout ist im Wachstum retardiert und gastruliert nur unvollständig	83
Abbildung 3.15	AP-2-Expression im Trophoblasten von Wildtyp-Embryonen	85
Abbildung 3.16	Proliferationsverlust im ekto-plazentalen Konus und extraembryonalen Ektoderm der Nullmutante am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung	87
Abbildung 3.17	AP-2 γ -Mutante entwickelt kein Labyrinth und bildet weniger Riesenzellen	89
Abbildung 3.18	AP-2-Expression der Trophoblastenzellen im Kultursystem	91
Abbildung 3.19	Primäre AP-2 γ -defiziente Trophektodermzellen verlieren ihren epithelialen Charakter und der Keimknoten seine kompakte Struktur	92
Abbildung 3.20	Keine Fehlregulation von E-Cadherin in der Nullmutante	93
Abbildung 3.21	Die Expression von Adenosindeaminase ist in der Nullmutante stark reduziert	94
Abbildung 4.1	Schematische Darstellung der Labyrinthbildung	100

Abbildung 4.2	Der Aufbau des Chorions	105
Abbildung 4.3	Diffusionsmodell des Wirkmechanismus von Deoxyadenosin durch reduzierte ADA-Aktivität in der AP-2 γ -defizienten Blastozystenkultur	109
Abbildung 4.4	Modell der Wirkmechanismen von AP-2 γ	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Beispiele für durch AP-2 regulierte Gene	3
Tabelle 3.1	Ermittelte Laufwerte der Marker-Fragmente bei der Elektrophorese	56
Tabelle 3.2	Berechnete Introngrößen	57
Tabelle 3.3	Rekombinationsstatistik	69
Tabelle 3.4	Erzeugung männlicher Chimären aus den ES-Klonen cKO#644 und KO#637	79
Tabelle 3.5	Mauslinien, die für die Erzeugung der konditionalen Defektmutanten benötigt werden	81
Tabelle 3.6	Kreuzungsschema zur Erzeugung der gewebespezifischen Defektmutanten	82
Tabelle 3.7	Genotypen von AP-2 $\gamma^{wt/KO}$ X AP-2 $\gamma^{wt/wt}$ Verpaarungen	96
Tabelle 3.8	Genotypen einer AP-2 $\gamma^{wt/KO}$ X AP-2 $\gamma^{wt/KO}$ Verpaarung an Tag 9,5 der Embryonalentwicklung	96

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
ARPKD	Autosomale rezessive polyzystische Nierenkrankheit
AS	Aminosäuren
as-mRNS	Boten-RNS mit Gegensinn-Orientierung
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BM	Boehringer Mannheim
bp	Basenpaare/Basen
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
ca.	circa
cDNS	Copy-DNS
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propanesulfonate
cKO	Konditionaler Knockout („conditional knock out“)
°C	Grad Celsius
d	Tag(e)
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

dpc.	Tage post coitum
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f.c.	Endkonzentration
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GA	Glutaraldehyd
Glu	Glutamin
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
het oder +/-	heterozygote Mutante
HR	Homologe Rekombination
kb	Kilobasen
KO oder -/-	homozygot negative Mutante (knock out)
LiCl	Lithiumchlorid
Lsg.	Lösung
M	molar
mA	Milliampère
mg	Milligramm
Mg₂Cl	Magnesiumchlorid
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNS	Boten-RNS
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
N-	Amino-
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaAC	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat

NaOH	Natron lauge/Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau Tetrazoliumsalsz
Neo	Neomycin
ng	Nanogramm
NH₄Ac	Ammoniumacetat
nM	nanomolar
nmol	Nanomol
OD	optische Dichte
p	Plasmid
p.c.	post coitum
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pBS	p Bluescript
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pH	potentium hydrogenium
pmol	Pikomol
RA	Retinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
s-mRNS	Boten-RNS mit Sinn-Orientierung
SSC	Standart saline citrat
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle(n)

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TgVektor	Targetingvektor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNS	transfer RNA
U	Enzymeinheiten (Units)
u.a.	Unter anderem
U/min.	Umdrehungen pro min.
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
wt oder +/+	Wildtyp, homozygot positiv
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Die Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren

1.1.1 Die Entdeckung der AP-2-Transkriptionsfaktoren

1987 wurde in der Fachpresse über einen neuen Transkriptionsfaktor berichtet, der im humanen Metallothionein II-Gen und im SV40-Virus an spezifische Enhancersequenzen bindet (Imagawa et al., 1987; Mitchell et al. 1987). Williams gelang 1988 die Isolierung des AP-2-(Aktivator Protein 2) Transkriptionsfaktors mit einem Molekulargewicht von 52 kDa aus Kernextrakten von HeLa-Zellen (Williams et al., 1988). Drei Jahre später wurde das humane AP-2-Gen auf dem Chromosom 6p22.3-pter kartiert (Gaynor et al., 1991). Es umfaßt einen genomischen Bereich von ca. 18 kb (Bauer et al., 1994). In den folgenden Jahren gelang der Nachweis von AP-2-Homologen auch in anderen Spezies: 1991 in *Xenopus*, 1993 in der Maus, 1997 im Huhn und 1998 in *Drosophila* (Snape et al., 1991; Moser et al., 1993; Shen et al., 1997; Bauer et al., 1998).

Bis 1995 wurde angenommen, daß es sich bei dem AP-2-Transkriptionsfaktor um ein einzelnes Gen handelt. Mit der Entdeckung des verwandten AP-2 β -Gens (Moser et al., 1995) auf dem humanen Chromosom 6p12-21-1 (Williamson et al., 1996) wurde die AP-2-Genfamilie gegründet. Bereits ein Jahr später kam ein weiteres Mitglied hinzu, das als AP-2 γ oder AP-2.2 (Oulad-Abdelghani et al., 1996) auf dem humanen Chromosom 20q13.2 kartiert wurde (Williamson et al., 1996).

1.1.2 Biochemische Eigenschaften der AP-2-Familie

Der AP-2 Transkriptionsfaktor besteht aus 437 Aminosäuren und gliedert sich in drei funktionelle Domänen, in eine N-terminale prolinreiche Transaktivierungsdomäne, eine C-terminale Dimerisierungsdomäne und in eine DNS-Bindungsdomäne.

Die Dimerisierungsdomäne im C-Terminus besteht aus einem für alle Proteine der AP-2-Genfamilie charakteristischen „Helix-Span-Helix“ (HSH)-Motiv. Diese Struktur umfaßt einen 80 AS großen Proteinbereich, der durch zwei amphiphatische Helices flankiert wird, welche die Dimerisierung der AP-2-Proteine vermitteln. Die AP-2-Proteine können sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden. Zusammen mit einer N-terminal benachbarten basischen Region vermittelt die HSH-Domäne die DNS-Bindung des Proteinkomplexes (Williams & Tjian, 1991).

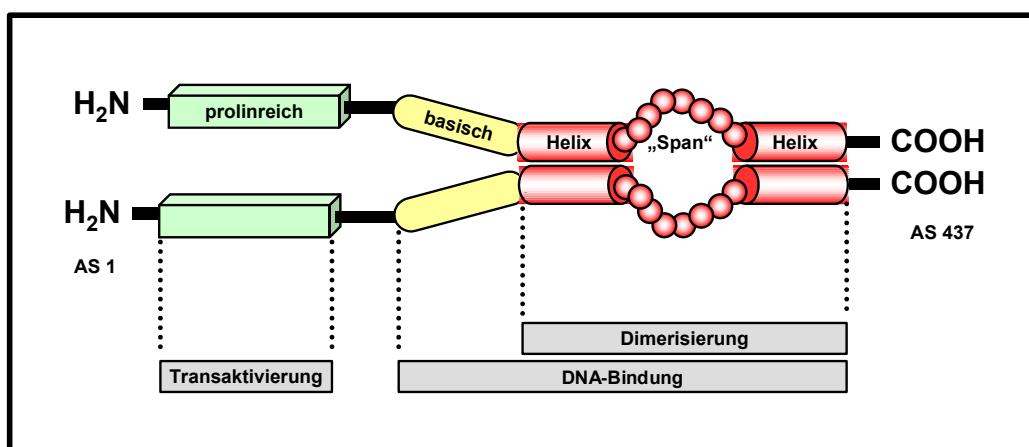


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines dimeren AP-2-Proteinkomplexes am Beispiel von AP-2 α (verändert nach Williams und Tjian, 1991).

Das AP-2 α -Protein besteht aus 437 Aminosäuren (AS) und gliedert sich in drei funktionelle Domänen: 1. eine N-terminale prolinreiche Transaktivierungsdomäne (grün). 2. eine C-terminale Dimerisierungsdomäne (rot), die aus einem charakteristischen „Helix-Span-Helix“- Motiv besteht und 3. eine DNS-Bindungsdomäne, die sich aus der Dimerisierungsdomäne und einer zentralen basischen Region (gelb) zusammensetzt.

Die Aktivierung der Transkription erfolgt durch die prolinreiche Transaktivierungsdomäne am N-Terminus. Mutationsstudien der 165 AS großen Domäne zeigten, daß weniger als 36 AS für die Funktion essentiell sind (Wankhade et al., 2000). Während dieser sehr kleine Proteinabschnitt der Transaktivierungsdomäne dem Drosophilahomolog DAP-2 fehlt, ist die DNS-Bindungsdomäne in allen beschriebenen Spezies hoch konserviert. Über sie bindet der dimere AP-2-Komplex an die palindromische Konsensussequenz 5'-GCCNGGC-3', welche in vielen zellulären und viralen Promotoren nachgewiesen wurden. Mohibullah et al. (1999) konnten durch *in vitro* Analysen zeigen, daß AP-2 mit gleicher Affinität an die Motive 5'-GCCN₃GGC-3', 5'-

GCCN₄GGC-3' und GCCN_{3/4}GGG bindet. Man geht mittlerweile aber davon aus, daß AP-2-Proteine ganz allgemein GC-reiche Sequenzmotive erkennen und mit unterschiedlicher Affinität an diese binden. So weicht, z.B. die AP-2-Bindungsstelle, im SV40 Enhancer mit dem Sequenzmotiv 5'-CCCAGGC-3' deutlich von der allgemeinen Konsensussequenz ab.

1.1.3 AP-2: Ein Regulator der Expression

In vitro-Studien haben gezeigt, daß AP-2 nicht nur die Expression anderer Gene aktivieren, sondern auch reprimieren kann. Die AP-2-Zielgene lassen sich demnach in zwei Klassen einteilen und sind in Tab. 1.1 auszugsweise aufgelistet.

Tabelle 1.1: Beispiele für durch AP-2 regulierte Gene

Durch AP-2 reprimierte Gene	
c-myc	(Gaubatz et al., 1995)
c/EBP-a	(Jiang et al., 1998)
MCAM/Muc18	(Jean et al., 1998)
Durch AP-2 aktivierte Gene	
Adenosin Deaminase (ADA)	(Shi & Kellems, 1998)
E-Cadherin	(Hennig et al., 1996)
Humanes Metallothionein IIa Gen	(Mitchell et al., 1987)
Typ IV Kollagenase	(Frisch & Morisaki, 1990)
Keratin Gene	(Leask et al., 1991)
HIV-Typ I	(Perkins et al., 1994)
Humanes Insulin-ähnliches-Wachstumsfaktor-bindendes-Protein-5	(Duan & Clemmons, 1995)
Dopamin Betahydroxylase Gen	(Greco et al., 1995)
HER-2/neu	(Bosher et al., 1996)
P21 WAF/CIP	(Zeng et al., 1997)
Transformierender Wachstumsfaktor- α	(Wang et al., 1997)
Östrogenrezeptor	(McPherson et al., 1997)
c-Kit (Tyrosinkinase Rezeptor)	(Huang et al., 1998)

1.1.4 Expressionsmuster der AP-2-Gene

Am Tag 5,5 der murinen Embryonalentwicklung wird AP-2 primär extraembryonal im Trophoblasten exprimiert, wobei die AP-2 γ -Form dominiert (Shi & Kellems, 1998; Sapin et al., 2000). Die Expression in den Trophoblastenzellen persistiert während der gesamten Embryonalentwicklung. Ab Tag 7,5 ist AP-2 erstmals im embryonalen Gewebe der apikalen Neuralfalte nachweisbar (Mitchell et al., 1991). In der weiteren Entwicklung wird AP-2 in den prämitotischen Neuralleistenzellen exprimiert und später in den Neuralleistenderivaten. Hauptexpressionsorte sind der frontonasale Gesichtsbereich, die Spinal- und Kranialganglien und die Pigmentzellen (Mitchell et al., 1991; Chazaud et al., 1996; Moser et al., 1997b). Weitere Expressionsorte sind die proliferierenden mesenchymalen Zellen der Extremitätenknospen, die Epidermis, sowie deren Derivate, die meisten Strukturen des zentralen und peripheren Nervensystems, der Urogenitaltrakt insbesondere die Niere. Die AP-2-Expressionsmuster in Gesichtsstrukturen, im zentralen Nervensystem, in der Epidermis und der Neuralleiste sind bei Amphibien (Snape et al., 1991; Epperlein et al., 2000) sowie bei Vögeln (Shen et al., 1997) identisch und unterstreichen die konservierte Bedeutung von AP-2 bei der Entstehung dieser Strukturen.

1.1.4.1 Die AP-2 γ -Expression während der frühen Embryonalentwicklung

AP-2 γ -Transkripte sind nach der Implantation zuerst in den primären Riesenzellen und in den diploiden Zellen des polaren Trophektoderms nachweisbar. Mit fortschreitender Proliferation der Trophoblastenzellen findet man AP-2 γ im ekto-plazentalen Konus und im extraembryonalen Ektoderm. Die extraembryonale Expression von AP-2 γ beschränkt sich auf die Trophoblastenlinie. Das primitive Endoderm und das extraembryonale Mesoderm exprimiert kein AP-2 γ . Zum Zeitpunkt der Fusion von Allantois und Chorion wird AP-2 γ in allen Derivaten des Trophoblasten verstärkt exprimiert,

einschließlich der sekundären Riesenzellen, der Zellen des Spongiotrophoblasten und der Labyrinthzone (Shi & Kellems, 1998). Somit ist AP-2 γ der erste bekannte Transkriptionsfaktor, der in allen Trophoblastenzellen während der gesamten Plazentaentwicklung exprimiert wird. Dadurch unterscheidet sich AP-2 γ von den übrigen Transkriptionsfaktoren, die bei der Plazentaentwicklung eine Rolle spielen. Mash-2, ein für die Entwicklung des Spongiotrophoblasten essentieller Transkriptionsfaktor, wird z.B. während der Plazentaentwicklung transient im ektoplazentalen Konus und im extraembryonalen Ektoderm exprimiert (Guillemot et al., 1994; Nakayama et al., 1997; Tanaka et al., 1997). Hand1 (auch als eHand oder Hxt bezeichnet) ist für die Entwicklung der sekundären Riesenzellen essentiell und wird im ektoplazentalen Konus sowie in terminal differenzierten Trophoblastenzellen exprimiert (Cross et al., 1995; Firulli et al., 1998; Riley et al., 1998). Der „orphan-receptor“ EER- β , der für die Entwicklung der diploiden Trophoblastenzellen wichtig ist, wird transient im extraembryonalen Ektoderm und im Chorion exprimiert (Luo et al., 1997). GATA-2 und GATA-3 werden in den Riesenzellen des Trophoblasten exprimiert und regulieren die Expression des murinen plazentalen Laktogen I (Ng et al., 1994; Ma et al., 1997). Adenosin Deaminase (ADA), ein Enzym des Purinkatabolismus, wurde in einer Subpopulation von Trophoblastenzellen im ektoplazentalen Konus und in den Riesenzellen nachgewiesen (Shi & Kellems, 1998).

Die starke AP-2 γ -Expression in allen Derivaten der Trophoblastenlinie läßt vermuten, daß AP-2 γ einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Genexpression im Trophoblasten ist. Tatsächlich wurden in der Promotorsequenz vieler für die Plazentaentwicklung wichtiger Gene AP-2-Bindestellen nachgewiesen. Beispiele dafür sind: TGF- α (Berkowitz et al., 1997; Wang et al., 1997), VPF/VEGF („vascular permeability factor“ / „vascular endothelial growth factor“) (Garrido et al., 1993; Gille et al., 1997; Silins et al., 1997), verschiedene Metalloproteinasen (Fini et al., 1994; Aho et al., 1997) und der Östrogen-Rezeptor (McPherson et al., 1997).

1.1.5 Regulation der AP-2-Expression

Die Expression von AP-2 wird über mindestens zwei verschiedene Signalwege reguliert. Die AP-2-Aktivität kann sowohl durch Aktivatoren der Proteinkinase C (z.B. Phorbol ester) als auch durch Induktoren des „Second Messengers“ cAMP gesteigert werden, ohne die mRNA- oder Protein-Konzentration zu variieren (Imagawa et al., 1987; Luscher et al., 1989). Diese posttranslationale Regulation der AP-2-Aktivität könnte über Phosphorylierungsprozesse oder durch Interaktion mit Kofaktoren gesteuert werden (Garcia et al., 1999).

Das Morphogen Retinsäure nimmt bei der Organogenese vieler Vertebratengewebe eine zentrale Stellung ein (Thaller & Eichele, 1987). Mitchell et al. (1991) konnten zeigen, daß AP-2 hauptsächlich in Retinsäure-sensitiven Geweben wie z.B. in der Haut und im Nervensystem exprimiert. Tatsächlich erhöht Retinsäure transient die AP-2 γ -mRNA-Synthese und steigert die Aktivität von AP-2 γ bereits nach einer halben Stunde (Oulad-Abdelghani et al., 1996). Allerdings wurden im AP-2 γ -Promotor keine Retinsäure responsive Elemente nachgewiesen, so daß der Induktionsmechanismus noch nicht aufgeklärt werden konnte (Bauer et al., 1994).

1.1.6 AP-2 reguliert die Proliferation und Apoptose über die Interaktion mit c-myc

Das Protoonkogen c-myc ist ein nukleäres Phosphoprotein der Helix-Loop-Helix Proteinfamilie. C-myc kann sowohl Proliferation als auch Apoptose induzieren (Evan et al., 1992, Evan & Littlewood, 1993). Hinweise auf eine Funktion von AP-2 als negativer Regulator von c-myc lieferten die Promotorstudien von Prothymosin- α und Ornithindecaboxylase von Gaubatz et al. (1995). Das c-Myc-Protein bindet und transaktiviert die Expression von Genen über E-Box-Elemente, welche eine zentrale CAC(G/A)TG Sequenz enthalten (Blackwell et al., 1990). Das E-Box-Element im 3'-Bereich der Promotoren beider Gene überlappt mit einer AP-2-Bindungsstelle, um die AP-2 aufgrund sterischer Behinderung mit myc/max Heterodimeren oder max/max Homodimeren

kompetiert. Ein weiterer Mechanismus, der die Bindung des myc/max-Dimers inhibiert, ist eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den DNS Bindungsdomänen von AP-2 und c-myc (Gaubatz et al., 1995).

C-myc ist ein Regulator der Zellproliferation und kann auch ohne Wachstumsfaktoren den Eintritt in die G1 Phase des Zellzyklus induzieren (Eilers et al., 1991). Mitotische Signale stimulieren den Übergang einer Zelle in die G1 Phase und induzieren die Expression von D-Cyclinen (Matsushime et al., 1991). Die Expression von Cyclin D2 wird ebenfalls durch ein kombiniertes E-Box/AP-2 cis-regulatorisches Promotorelement gesteuert, das unter der Kontrolle von c-myc steht. So hemmt AP-2 α in PA-1 Zellen die Cyclin D2-Expression. Neuere Untersuchungen mittels Genarrays zeigen, daß in AP-2 β -defizienten Mäusen myc-Zielgene, darunter auch Cyclin D2, auf transkriptionaler Ebene signifikant hochreguliert sind (Hilger-Eversheim et al., 2000).

Neuere Untersuchungen belegen, daß AP-2 den Zellzyklus über einen zweiten Regelmechanismus inhibiert. Eine verstärkte Expression des Zellzyklusinhibitors p21 WAF/CIP-1 wurde in wachstumsarretierten, terminal differenzierten Zellen nachgewiesen (Michieli et al., 1994). Zeng et al. (1997) untersuchten die Phorbolster (TPA) induzierte Zelldifferenzierung und zeigten, daß AP-2 das Wachstum von Krebszellen durch die Aktivierung der p21-Expression inhibiert. Bereits aus früheren Studien war bekannt, daß die AP-2-Aktivität nach Phorbolsterbehandlung posttranskriptional stimuliert wird (Imagawa et al., 1987; Luscher et al., 1989). Transfektionsexperimente mit AP-2-Expressionsvektoren induzierten die p21-Expression und inhibierten die DNS-Synthese. Durch Deletionsmutanten des p21-Promotors und Bandshiftanalysen wurde ein 27 bp Element identifiziert, das eine AP-2-Bindungsstelle enthält. Die Mutagenese der AP-2-Bindungsstelle inhibiert die Aktivierung von p21 nach TPA-Stimulation oder AP-2-Transfektion.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß AP-2 die Zellzyklusprogression nicht nur durch die Interaktion mit c-myc, sondern auch durch die transkriptionale Aktivierung der p21-Expression inhibiert.

1.1.7 AP-2-defiziente Mäuse

1.1.7.1 Die AP-2 α -Knockout-Maus

Die Erzeugung AP-2 α -defizienter Mauslinien gelang 1996 zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander durch gezielte Mutagenese des Exons 5 bzw. 6 (Schorle et al., 1996; Zang et al., 1996). Beide Exons sind für die Dimerisierung des AP-2-Proteinkomplexes essentiell. Der früheste Phänotyp der Nullmutante zeigt sich am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung. Die Neuralwülste werden zwar gebildet und wachsen auch aus, fusionieren aber zwischen dem anterioren Neuroporus und der Region kaudal zum Gehörbläschen nicht. Als Konsequenz entsteht eine craniofaziale Spalte (Cranioschisis). Schließlich überwachsen die Neuralwülste den frontonasalen Bereich. Die weitere Entwicklung des Gehirns führt zu einer Expansion des Vorderhirns, welches faziale Strukturen wie Nase, Maxillen und Mandibeln, die eigentlich in der Mittellinie des Körpers angelegt werden, lateral verschiebt. Die mediale Fusion des ersten und zweiten Kiemenbogens bleibt aus, statt dessen wuchern diese Strukturen seitlich am Kopf. Die Augenbecher sind ebenfalls fehlplaziert, und es kommt zu Fehlentwicklungen der Kornea und Retina (West-Mays et al., 1999). West-Mays et al. postulieren eine Kontrollfunktion von AP-2 α bei der Invagination und Separation des Linsenvesikels, der sich bei der Nullmutante nicht vom Oberflächenektoderm ablöst. Es wird spekuliert, daß die AP-2-regulierten Gene E-Cadherin und Gelatinase B für diesen Defekt verantwortlich sein könnten (Batsche et al., 1998). Neben der Exenzephalie tritt bei der AP-2 α -Nullmutante ein zusätzlicher ventraler Schlußdefekt des Rumpfes auf. Das laterale Ektoderm des Thorax und des Abdomens umschließen die inneren Organe nur unvollständig, was zur Folge hat, daß sich die inneren Organe außerhalb des Körpers entwickeln (Abdominoschisis) (Schorle et al., 1996).

Durch TUNEL-Analysen konnte gezeigt werden, daß die kranialen Neuralleistenzellen, die im Wildtyp AP-2 α stark exprimieren, zwar in ihre Zielgewebe einwandern, aber ab Tag 9,5 der Embryonalentwicklung aufgrund

von Apoptose absterben (Schorle et al., 1996). Die signifikant erhöhte Zahl apoptotischer Neuralleistenzellen könnte die Ursache für die kranialen Mißbildungen sein. Gemäß eines Modells von Smith und Schoenwolf (1997) ist der kraniale Neuralrohrschluß von der konzertierten Aktion zwischen Neuroepithel, Oberflächenektoderm und Kopfmesenchym abhängig. Der apoptotische Zelltod stört diese komplexen morphogenen Differenzierungsprozesse und verursacht so den Schlußdefekt. Nottoli et al. (1998) injizierten AP-2 α -defiziente embryonale Stammzellen in Wildtypblastozysten und erzeugten so chimäre Tiere, in denen sie die Vielzahl der morphogenetischen Defekte, die man im Knockout vorgefunden hatte, unabhängig von einander beobachten konnten. Nottoli et al. (1998) folgerten daraus, daß AP-2 α für die Entwicklung aller betroffenen Strukturen wichtig ist. Die Erzeugung eines konditionalen AP-2 α -Knockouts, wäre für das Verständnis der komplexen AP-2 α -Funktionen *in vivo* sehr hilfreich.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Mißbildungen weist die Nullmutante Defekte des axialen, sowie des Kopfskelettes auf. Die Defekte im Gesichtsmesenchym und der vorderen Gliedmaßen legen den Schluß nahe, daß AP-2 α in Retinsäure-abhängige Entwicklungsprozesse involviert ist (Schorle et al., 1996; Nottoli et al., 1998), da die Nullmutanten der α - und γ -Retinsäurerezeptoren (RAR α , RAR γ) und Vitamin A-defiziente Mäuse vergleichbare Gliedmaßen- und Gesichtsdefekte zeigen (Lohnes et al., 1994). AP-2 α wird im Oberflächenektoderm ab Tag 9,5 der Embryonalentwicklung exprimiert und im adulten Tier in der Basalschicht der Haut. In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, daß AP-2 α die Expression der basalen Keratine K14 und K5 auf Transkriptionsebene aktiviert. Untersuchungen zeigten, daß es sich bei AP-2 α und dem Keratin Transkriptionsfaktor (KTF-1) um identische Moleküle handelt. Folgerichtig postulierten Byrne et al. (1994), daß AP-2 α in der adulten Haut die Expression von Intermediärfilamenten reguliert und während der embryonalen Hautentwicklung die Differenzierung epidermaler Strukturen steuert. In AP-2 α -defizienten Mäusen konnte allerdings keine

veränderte Expression der Intermediärfilamente nachgewiesen werden (Talbot et al., 1999). Zudem ist die Gesamtstruktur der Haut bei AP-2 α -defizienten Mäusen unverändert. Möglicherweise kompensieren die beiden andern AP-2-Familienmitglieder die Abwesenheit der α -Form.

1.1.7.2 Der AP-2 β -Knockout

Obwohl das frühe embryonale Expressionsmuster von AP-2 α und AP-2 β überlappt, wurde keiner der in den AP-2 α -defizienten Mäusen beschriebenen Defekte in der AP-2 β -Nullmutante nachgewiesen (Moser et al., 1997b). Alle Neuralleistenderivate, die kranialen Strukturen, sowie die neuronalen Gewebe entwickeln sich beim AP-2 β -Knockout völlig normal. Die Tiere zeigen lediglich einen renalen Defekt und sterben perinatal. Die Nieren entwickeln sich zunächst ohne anatomische Auffälligkeiten. Am Tag 16,5 der Embryogenese treten zystische Veränderungen der Nierentubuli und der Sammelrohre auf. AP-2 β und AP-2 α werden bereits sehr früh in der Nierenentwicklung im einwachsenden und sich verzweigenden Uterusepithel koexprimiert. Trotzdem treten die Defekte erst sehr spät in der Entwicklung auf. Die Erklärung dafür könnte eine gegenseitige Kompensation der Gene aufgrund der überlappenden Expressionsmuster in der frühen Entwicklung sein. In der weiteren Entwicklung geht die Überlappung der Expressionsmuster verloren. Während AP-2 α verstärkt in der Nierenrinde und in der peripheren nephrogenen Zone exprimiert wird, ist AP-2 β verstärkt im Nierenmark, im Sammelrohrepithel und in den tubulären Strukturen nachweisbar. Eine Kompensation der Defekte ist nicht mehr möglich, und der Phänotyp manifestiert sich. Analysen von Markergenen in AP-2 β -defizienten Mäusen stützen diese Theorie. Die Expression der Markergene *wt-1*, *Wnt-4*, *Pax-2* und *Pax-8* belegen, daß alle frühen Induktions- und Konversionsprozesse in der AP-2 β -defizienten Niere normal ablaufen.

Genauere Untersuchungen der polyzystischen Niereninsuffizienz zeigten im Nierenepithel eine verstärkte Apoptoserate in Verbindung mit einer verminderten Expressionsrate des anti-apoptotisch wirkenden *bcl-2*-Gens. Moser et al. (1997a)

konnten zeigen, daß die Apoptose die Folge einer mißregulierten *c-myc*-Funktion war. Diese Aussage wurde durch Trudel et al. (1991) gestützt, die in *c-myc* überexprimierenden transgenen Mäusen renale Zystenbildung beobachteten. Ebenso entwickeln *bcl-2*-Knockout-Mäuse zystische Nieren (Veis et al., 1993). Die Zystenentstehung scheint somit die Folge einer Fehlregulation von Genen zu sein, die den kontrollierten Zelltod im Nierenepithel steuern (Moser et al., 1997a). Die transkriptionelle Kontrolle von *c-myc*-Zielgenen durch die direkte Interaktion von AP-2-Genen mit *c-myc* stützen dieses Modell (Gaubatz et al., 1995). Obwohl die AP-2 α - im Gegensatz zur AP-2 β -Defektmutante keine pathophysiologischen Veränderungen der Niere zeigt, wurde bei beiden Mutanten gesteigerte Apoptose als ein zentraler Defekt beobachtet (Schorle et al., 1996; Zhang et al., 1996; Moser et al., 1997a).

1.1.7.2.1 AP-2-Mutationen in der humanen Keimbahn

Der polyzystische Nierenphänotyp der AP-2 β -defizienten Mäuse zeigt starke Ähnlichkeiten mit der humanen autosomalen rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD, autosomal recessive polycystic kidney disease). Obwohl das ARPKD-Gen auf demselben Genlocus (6p12-21.1) wie AP-2 β kartiert wurde (Zerres et al., 1994), schlossen Analysen mit polymorphen Markern AP-2 β als potentiell ARPKD Gen aus (Mucher et al., 1998). Außerdem manifestieren sich im humanen ARPKD Krankheitsbild Leberfibrosen, die im murinen Model nicht auftreten (Hilger-Eversheim et al., 2000).

Im humanen AP-2 β -Lokus wurden bei Patienten mit dem Char-Syndrom Keimbahnmutationen nachgewiesen (Satoda et al., 2000). Das Char-Syndrom wurde 1978 zum erstenmal beschrieben (Char et al., 1978). Es handelt sich dabei um eine autosomal-dominante Krankheit, bei der häufig ein offener Duktus arteriosus, unterschiedlich stark ausgeprägte faziale Dismorphismen, sowie Anomalien der Hände auftreten (Sletten & Pierpont, 1995). Das Char-Syndrom wird durch Missense-Mutationen im 5. Exon hervorgerufen. Diese ermöglichen

weiterhin die Dimerisierung des AP-2 β -Proteins, verhindern aber die Bindung des Proteinkomplexes an die DNS (Satoda et al., 2000). Alle Mitglieder der AP-2-Familie sind in der Lage Heterodimere auszubilden, und so beeinträchtigen die Mutationen im AP-2 β -Lokus auch die Funktion der beiden anderen Gene (Bosher et al., 1996). Genau darin sehen Hilger-Eversheim et al. (2000) die Ursache für die Unterschiede in der Ausprägung des Char-Syndroms beim Menschen und der Defekte im murinen Knockout-Modell. Die niedrige Konzentration funktioneller AP-2 β -Homodimere, die durch das zweite intakte Allel gebildet werden, reicht offensichtlich für eine normale Nierenentwicklung aus. Die Identifizierung von AP-2 β -Mutationen im Char-Syndrom wirft die Frage auf, ob andere erblich mutierte AP-2-Allele oder Veränderungen im embryonalen AP-2-Expressionsmuster die Ursache für manche angeborene Gesichts-, Gliedmaßen- oder Nierendefekte sind.

1.2 Gen-Targeting: Zielgerichtete Mutagenese des Mausgenoms

Der Begriff des Gen-Targetings wurde 1988 durch Capecchi eingeführt und beschreibt die ortsspezifische Modifikation eines Genoms durch intermolekulare homologe Rekombination (Mansour et al., 1988). Während sich die klassische Genetik bei der Funktionsanalyse von Genen *in vivo* auf die Untersuchung unspezifisch erzeugter Mutationen beschränken mußte, bietet die Methode des modernen Gen-Targetings erstmals die Möglichkeit, ganz gezielt Gene zu manipulieren und deren Funktion im Mausmodell zu studieren. Durch den Abschluß des humanen Genomprojekts wird es in Zukunft noch schneller möglich sein, homologe Gene zwischen Maus und Mensch zu identifizieren und mit Hilfe des Gen-Targetings in der Maus Modelle für humane Gendefekte zu entwickeln.

1981 ebneten Martin, Evans und Kaufman mit der Isolierung muriner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) den Weg für die Entwicklung des Gen-Targetings. Sie isolierten embryonale Stammzellen aus der inneren Zellmasse

von Blastozysten und zeigten, daß diese Zellen in Kultur pluripotent bleiben (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Wie aber läßt sich ein bestimmtes Gen gezielt mutieren? 1985 zeigten Smithies et al., die Aufnahme von Fremd-DNS durch homologe Rekombination in das Genom von Säugetierfibroblasten. Wenige Jahre später gelang Cappecchi der Nachweis der homologen Rekombination von Fremd-DNS in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) (Capecchi, 1989). Die *in vivo* modifizierten ES-Zellen werden in eine Ammenblastozyste injiziert und entwickeln sich zusammen mit den Zellen der inneren Zellmasse zu einem chimären Embryo, welcher von einer Ammenmaus ausgetragen wird. Der Grad der Chimärität, d.h. der Anteil der injizierten embryonalen Stammzellen an einem chimären Tier, läßt sich anhand der Fellfarbe abschätzen, weil die Empfängerblastozyste und die ES-Zellen von verschiedenen Mausstämmen abstammen. In der Regel besitzen die ES-Zellen das dominante Agouti-Gen, welches für die Entwicklung einer braunen Fellfarbe kodiert und die Blastozysten das rezessive Gen für schwarze Fellfarbe. Durch die Verpaarung der Chimäre mit einer schwarzen Maus können schwarze und braune Nachkommen entstehen. Nur braune Tiere stammen von den injizierten ES-Zellen ab und sind zu 50% heterozygot für das mutierte Allel. Diese heterozygoten Tiere werden miteinander verpaart und produzieren zu 25% homozygot mutierte Nachkommen.

1.2.1 Prinzipieller Aufbau eines Knockout-Targetingvektors

Eine sogenannte Knockout-Maus entsteht durch Deletion einer funktionell essentiellen DNS-Sequenz eines definierten Gens durch homologe Rekombination. Die Erzeugung einer Knockout-Maus beginnt mit der Klonierung eines geeigneten Targetingvektors. Ein typischer Vektor zur gezielten Mutagenese besteht aus zwei zum genomischen Locus homologen DNS-Sequenzen und einem positiven Selektionsmarker. Typischerweise ersetzt der Marker einen funktionell essentiellen Bereich des Gens, was einen Funktionsverlust verursacht. Das bakterielle *aminoglycosid phosphotransferase* (*neo*)-Gen ist die am häufigsten eingesetzte positive Selektionskassette.

Der Targetingvektor wird linearisiert, durch Elektroporation in embryonale Stammzellen eingeschleust und zerstört durch homologe Rekombination die funktionell essentielle Gensequenz. Das bakterielle *aminoglycosid phosphotransferase*-Gen ermöglicht die Selektion stabil transfizierter Klone mit G418. Durch die G418-Selektion ist es nicht möglich, zwischen der sehr häufigen unspezifischen Integration des Targetingvektors in eine beliebige Stelle des Genoms und dem seltenen homologen Rekombinations-Ereignis zu unterscheiden. Dazu benötigt man einen weiteren negativen Selektionsmarker. Das Thymidin Kinase (*tk*) Gen kann optional als zusätzlicher negativer Selektionsmarker an ein Ende des Targetingvektors angehängt werden und geht als nicht homologe Sequenz entweder bei der homologen Rekombination verloren (vgl. Abb. 1.2 A) oder wird durch eine unspezifische Integration des Targetingvektors in das Genom der Zelle eingebaut (vgl. Abb. 1.2 B).

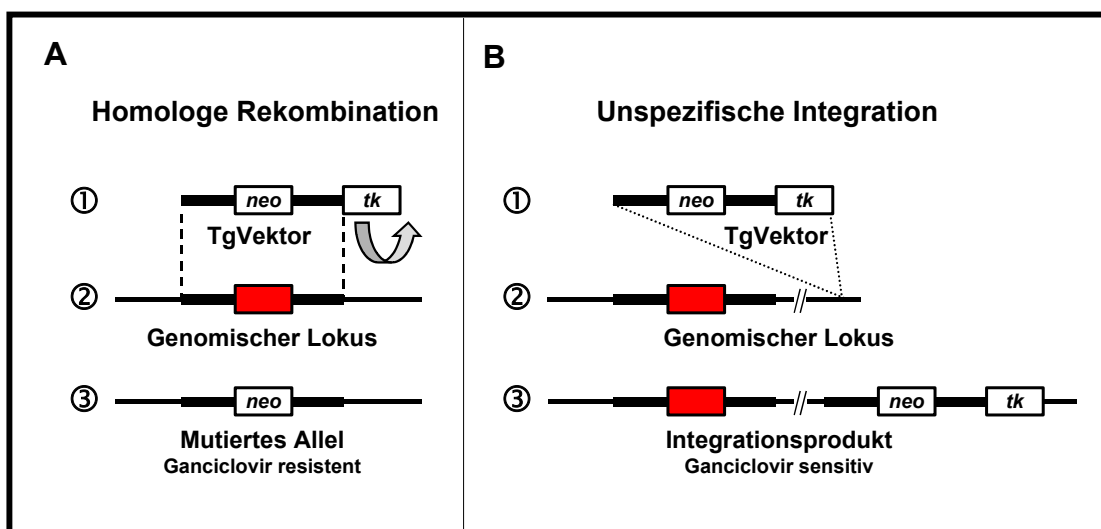


Abbildung 1.2 : Selektion von homolog rekombinierten ES-Klonen.

A: Der Targetingvektor ① besitzt am Ende eines homologen Armes einen zusätzlichen negativen Selektionsmarker (*tk*), der bei der homologen Rekombination verloren geht (angedeutet durch Pfeil). Zellen, die das mutierte Allel ③ besitzen, sind Ganciclovir resistent.

B: Bei der unspezifischen Integration des Targetingvektors ① in eine beliebige Stelle des Genoms ②, bleibt der *tk*-Selektionsmarker erhalten. ES-Zellen mit dem Integrationsprodukt ③ sind Ganciclovir sensitiv.

ES-Klone, bei denen homologe Rekombination stattgefunden hat, können so angereichert werden.

Neo = Aminoglycosid Phosphotransferase Gen (Neomycin-Resistenz Gen), *tk* = Thyrosinkinasegen, TgVektor = Targetingvektor

Ganciclovir selektiert gegen dieses unspezifische Integrationsereignis, indem es Zellen, welche das *tk*-Gen nicht verloren haben, abtötet. Auf diese Weise können homolog rekombinierte ES-Klone durch Doppelselektion mit G418 und Ganciclovir angereichert werden.

1.2.2 Grenzen des konventionellen Gen-Targetings

Die Knockout-Strategie gerät sehr schnell in eine Sackgasse, wenn das ausgeschaltete Gen essentielle Funktionen in der sehr frühen Embryonalentwicklung besitzt, und damit die Nullmutante letal ist. Weitere Probleme ergeben sich, wenn das Gen gleichzeitig in verschiedenen Geweben exprimiert wird. In diesem Fall ist der beobachtete Phänotyp immer die Summe unterschiedlicher Defekte, welche sich gegenseitig beeinflussen können. Deshalb wurde nach Möglichkeiten gesucht, ein Gen konditional, d.h. zu einem bestimmten Zeitpunkt und/oder nur in bestimmten Geweben auszuschalten.

1.2.3 Das Cre/loxP-System: Aufrüstung des Gen-Targetings

Die konditionale Inaktivierung eines Gens kann durch räumlich oder zeitlich begrenzte Deletion essentieller Gensequenzen erzielt werden. Natürliche Enzymsysteme, die Deletions- und Integrationsprozesse von Gensequenzen vermitteln, findet man bei Phagen. Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, daß die konventionelle Gen-Targeting-Technik durch den Einsatz viraler Rekombinasesysteme, wie des Cre/loxP-Systems des P1-Phagen, verbessert werden konnte (Kilby et al., 1993).

Die Cre-Rekombinase (causes recombination) des Bakteriophagen P1 ist ein Mitglied aus der λ -Integrase Superfamilie der ortsspezifischen Rekombinasen (Argos et al., 1986; Sadowsky, 1993). Das 38 kD Enzym gehört zu den wenigen Mitgliedern dieser Familie, die weder Kofaktoren noch akzessorische Proteine für die Rekombination benötigen (Abremski & Hoess, 1984; Stark et al., 1992; Kilby et al., 1993).

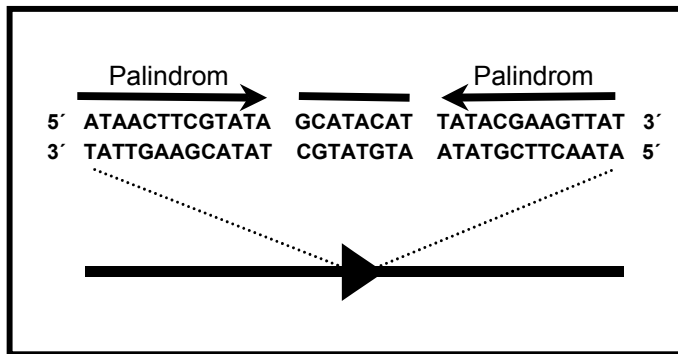


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der loxP-Sequenz.

A: Die loxP besitzt eine Länge von 34 bp. Sie besteht aus zwei palindromischen Sequenzen (Pfeile) von jeweils 13 bp, die durch eine nicht palindromische Sequenz von 8 bp (Linie) getrennt sind. Sie bestimmt die Orientierung der Gesamtstruktur (schwarzes Dreieck).

Die Cre-Rekombinase bindet an eine sogenannte loxP-Sequenz (locus of crossover (x) in P1). Die 34 bp große loxP-Sequenz besteht aus zwei 13 bp großen palindromischen Abschnitten, die von einem 8 bp großen, nicht palindromischen Bereich unterbrochen werden (vgl. Abb. 1.3), welcher die Orientierung der Gesamtstruktur bestimmt (Hoess et al., 1982; Hoess et al., 1984). Die Cre-Rekombinase vermittelt die ortsspezifische Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen. Das Produkt der katalytischen Reaktion ist von der relativen Orientierung der loxP-Sequenzen zueinander abhängig.

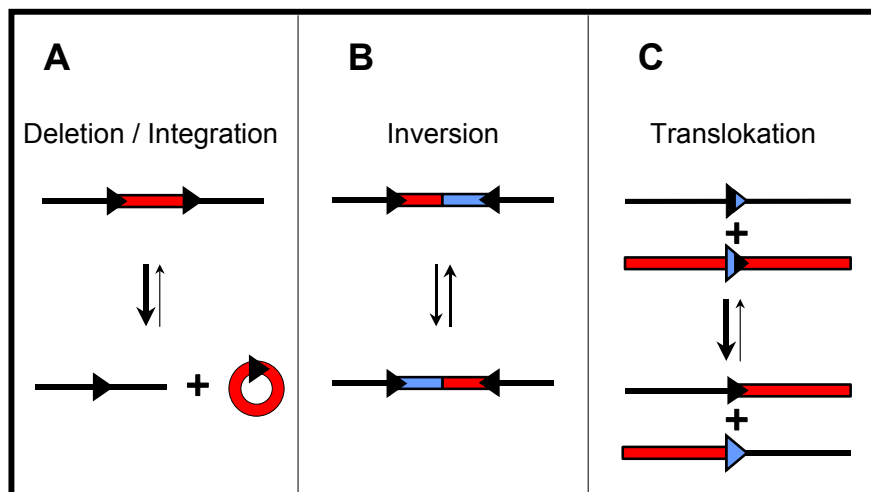


Abbildung 1.4: Cre-vermittelten Rekombination zweier loxP-Sequenzen in Abhängigkeit von deren relativer Orientierung zueinander. (Verändert nach Torres & Kühn, 1997)

In A und B sind intramolekulare Reaktionen dargestellt. C zeigt eine inter-molekulare Rekombination. Die Erklärung erfolgt im Text.

Befinden sich zwei loxP-Sequenzen mit gleicher Orientierung auf demselben DNS-Strang, so erfolgt eine Exzisionsreaktion des „geflochten“ (flankiert von loxP) Bereichs in Form einer zirkulären Struktur (Lakso et al., 1992; Sauer, 1993; Sauer, 1998). In jedem Reaktionsprodukt bleibt eine loxP-Sequenz zurück (vgl.: Abb. 1.4 A). Das Gleichgewicht der Exzisionsreaktion liegt auf der Seite der Produkte, da die zyklische Komponente frei diffundiert und für die Rückreaktion nicht mehr zu Verfügung steht. Die Cre-Rekombinase vermittelt eine Inversionsreaktion des geflochtenen Bereiches, wenn die loxP-Sequenzen gegenläufige Orientierung besitzen (vgl. Abb. 1.4 B). Hin- und Rückreaktion befinden sich im Gleichgewicht (Abremski et al., 1983; Hamilton & Abremski, 1984; Sauer & Henderson, 1990). Wenn die loxP-Sequenzen trans, also auf verschiedenen Chromosomen liegen (vgl.: Abb. 1.4 C), erfolgt eine intermolekulare Translokation (Smith et al., 1995). Das Reaktionsgleichgewicht läßt sich in Richtung der Produkte bzw. des Produktes verschieben, wenn verschiedene Hälften eines loxP-Paares unterschiedliche Punktmutationen tragen (vgl. Abb. 1.4 C). Dann erzeugt die Cre-Reaktion eine doppelt mutierte und eine Wildtyp-loxP-Sequenz, die weniger effizient miteinander rekombiniert werden, als die ursprünglichen einfach mutierten loxP-Sequenzen (Albert et al., 1995).

1.2.4 Das konditionale Gen-Targeting: Neue Möglichkeiten mit dem Cre/loxP-System.

Im Gegensatz zum klassischen Gen-Targeting wird das konditionale Gen-Targeting definiert als Genmodifikation, die auf bestimmte Zelltypen oder Entwicklungsstadien der Maus begrenzt ist. Während bei der Knockout-Maus das Gen durch Deletion oder Insertion eines Selektionsmarkers zerstört wird, verwendet man bei der Erzeugung einer konditionalen Knockout-Maus eine Selektionsmarkerkassette, welche von zwei gleich orientierten loxP-Sequenzen flankiert wird und inseriert sie in eine nicht kodierende Gensequenz. Eine dritte loxP-Sequenz mit identischer Orientierung wird so in einen nicht kodierenden Genabschnitt eingefügt, daß sie mit einer der beiden ersten loxP-Sequenzen einen

kodierenden, funktionell essentiellen Genabschnitt einrahmt (Abb. 1.5 A). Die Selektionskassette wird nach der Selektion durch transiente Transfektion eines Cre-Expressionsplasmid aus dem Genom entfernt (Abb. 1.5 B). Dabei entsteht zum einen das konditionale Allel mit einem „gefloxten“, kodierenden Genabschnitt (Abb. 1.5 C) und zum anderen ein Knockout-Allel, bei dem der „gefloxt“ Bereich deletiert wurde (Abb. 1.5 D). Wie beim klassischen Gen-Targeting werden die ES-Zellen in Spenderblastozysten injiziert und in scheinsschwangere Ammenmäuse transferiert. Durch Kreuzung werden homozygote Tiere erzeugt. Das konditionale Allel ist so lange funktionsfähig, bis diese Tiere mit sogenannten Cre-Mäusen verpaart werden, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle gewebespezifischer Promotoren exprimieren.

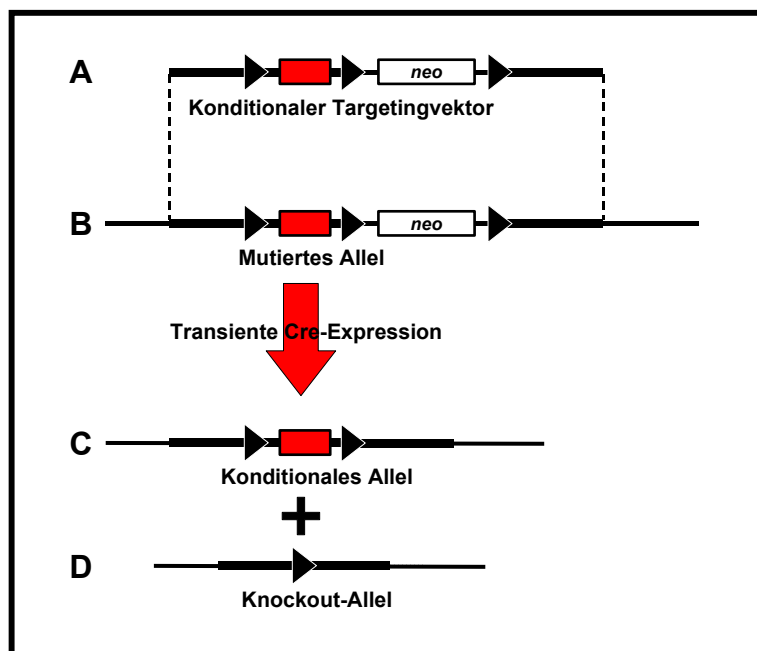


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des konditionalen Gen-Targetings.

Ein konditionaler Knockout Targetingvektor (A) besteht aus zwei zum genomischen Ziellokus homologen Sequenzen (dicke Linien) mit drei loxP Sequenzen gleicher Orientierung, sowie einer Selektionskassette (neo). Die drei loxP Sequenzen sind so angeordnet, daß sie paarweise einen funktionell essentiellen Genabschnitt (rotes Rechteck), sowie den Selektionsmarker flankieren. Nach homologer Rekombination entsteht das

mutierte Allel B, aus dem die Selektionskassette durch transiente Cre-Expression wieder entfernt wird. Dadurch wird das konditionale Allel C und das Knockoutallel D erzeugt.

In den entsprechenden Geweben wird schließlich der „gefloxt“ Bereich deletiert und das Gen inaktiviert. Mittlerweile sind eine ganze Reihe von Cre-Mäusen kommerziell erhältlich, darunter auch die von Tallquist und Soriano publizierte Mox2Cre-Maus, welche einen „gefloxt“ Bereich ausschließlich im Embryo inaktiviert, während die Genaktivität im Trophoblasten erhalten bleibt (Tallquist

& Soriano, 2000). So läßt sich ein potentiell letaler Gendefekt im extraembryonalen Gewebe umgehen, und der Funktionsverlust des Gens im Embryo selbst kann analysiert werden.

1.2.4.1 Induzierbare Cre/loxP-Systeme

Während der letzten Jahre wurden induzierbare Cre/loxP-Systeme entwickelt. Eines der bekanntesten ist das Tetrazyklin-Operon-System. Dazu werden zwei transgene Mauslinien in die konditionale Knockout-Linie eingekreuzt. Ein transgenes Tier besitzt den reversen Tet-Repressor unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors. Die zweite transgene Maus trägt eine Cre-Expressions-kassette, die durch ein Tetrazyklin-responsives-Element (TRE) gesteuert wird. Tetrazyklin, welches den Tieren z.B. über das Trinkwasser verabreicht werden kann, bindet an den reversen Tet-Repressor, der nun seinerseits an das Tetrazyklin-responsive-Element bindet und auf diese Weise die Cre-Synthese induziert (Gossen et al., 1995).

1.3 Zielsetzung

Die Expressionsmuster der drei AP-2 Familienmitglieder sind unterschiedlich und überlappen während der Entwicklung der Maus nur teilweise (Mitchell, 1991; Moser 1991). Obwohl die Transkripte aller AP-2-Gene in den extraembryonalen Trophoblastenzellen nachgewiesen wurden, war bislang unklar, ob sie in der Plazenta redundante Funktionen bei der Genregulation übernehmen. Die AP-2 α - und AP-2 β -Knockout-Studien deuten darauf hin, daß jedes AP-2-Protein eine individuelle Funktion in der Entwicklung besitzt. Während AP-2 α hauptsächlich für die kraniofaziale Entwicklung essentiell ist (Schorle, 1996; Zhang 1996), spielt AP-2 β eine wichtige Rolle bei der Nierenentwicklung (Moser, 1997). Beide, AP-2 α und AP-2 β -defiziente Mauslinien besitzen offensichtlich normal entwickelte Plazenten. Übernimmt also AP-2 γ die Schlüsselfunktion bei der Plazentaentwicklung? Tatsächlich konnte im Northern Blot gezeigt werden, daß im Plazentagewebe die

Konzentration von AP-2 γ -mRNS um ein Vielfaches höher ist als die von AP-2 α oder AP-2 β (Shi, 1998). Das Ziel dieser Arbeit war die Erzeugung und Analyse einer AP-2 γ -defizienten Mauslinie durch gezielte Mutagenese des AP-2 γ -Gens mittels Gen-Targeting. Zu diesem Zweck mußte der murine AP-2 γ -Lokus restriktionskartiert und partiell sequenziert werden. Danach sollte ein Gen-Targetingvektor kloniert werden, welcher durch homologe Rekombination das AP-2 γ -Gen in embryonalen Stammzellen inaktiviert. Durch Injektion der mutierten ES-Zellen in Blastozysten und nach dem Blastozystentransfer in die Uteri scheinchwangerer Mäuse sollten AP-2 γ -defiziente Tiere erzeugt werden. Zusätzlich sollte ein Blastozystenkultursystem etabliert werden, in dem Wirkmechanismen der AP-2 γ -Defizienz studiert werden können. Aufgrund der starken Expression von AP-2 γ im Trophoblasten mußte in Betracht gezogen werden, daß die AP-2 γ -Nullmutante embryonal letal sein könnte, falls die beiden anderen AP-2-Formen diesen Defekt nicht kompensieren können. Deshalb sollte unter Verwendung des Cre/loxP-Systems eine konditional AP-2 γ -defiziente Mauslinie erzeugt werden, die, nach Verpaarung mit einer Mox2Cre-Maus (Tallquist & Soriano, 2000), eine Inaktivierung des AP-2 γ -Gens ausschließlich im Embryo selbst ermöglichen wird, während das Gen im Trophoblasten aktiv bleibt. Weiterhin sollte die konditional AP-2 γ -defiziente-Mauslinie mit einer Wnt1-Cre-Maus (Chai et al., 2000) verpaart werden, wodurch AP-2 γ in der Neuralleiste inaktiviert wird. Dadurch wird die Analyse der AP-2 γ -Funktion während der Entstehung der Neuralleiste möglich sein.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bezugsquellen von Materialien, Reagenzien und Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma, München; Appligene, Heidelberg
alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Ammoniumacetat	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio Rad, München
3-Aminopropyltriethoxy-Silan (TESPA)	Sigma, München
Ampicillin	Sigma, München
ATP	Sigma, München
Bacto- Pepton	GibcoBRL, Karlsruhe
Bacto- Trypton	GibcoBRL, Karlsruhe
Bacto- Yeast	GibcoBRL, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienschalen	Greiner, Nürtingen
BM-Purple-Färbelösung	Boehringer, Mannheim
Boehringer Block	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
3-[(3-Cholamidopropyl)- Dimethylammonio]-1-Propan-Sulfonat (Chaps)	Sigma, München

Coenzym A	Sigma, München
Deckgläschen	Bender und Hobein, Karlsruhe
Dephosphorylierungspuffer, 10x	Boehringer, Mannheim
Desoxy-Nukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fulka, Neu-Ulm
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer, Mannheim
DNA Purification Kit, EASY PURE	Biozyme, Oldendorf
DNase I (RNase frei)	Boehringer, Mannheim
Dulbecco`s Mod Eagle Medium without Sodium Pyruvate, with 4500MG/L Glucose, with Pyridoxine HCl	GibcoBRL, Karlsruhe
Dulbecco`s Mod Eagle Medium with 0.11G/L NA PYR, with Pyridoxine	GibcoBRL, Karlsruhe
Einbettkassetten	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Einzelkammerobjektträger (Glas)	LabTek
Elektroporationsküvetten	Eppendorf , Hamburg
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin B	Sigma, München
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma, München
fötales Kälberserum (FCS)	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
G50 Sephadex	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Sigma, München
Gewebekulturschalen (15cm)	Greiner, Nürtingen
Glutamin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma, München
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Sigma, München
Harnstoff	Bio Rad Laboratories, München

Histowax	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Hybond American National Cam N ⁺ (Nylonmembran)	Amersham Biotec, Freiburg
Hyperfilm (Röntgenfilme)	Amersham Biotec, Freiburg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid (KOH)	Serva, Heidelberg
Klenow-Fragment	Boehringer, Mannheim
Klenow-Puffer (10x)	Boehringer, Mannheim
Kulturschalen für ES-Zellen	Falcon
Leiter-DNA („1 kb Ladder“, Markierung)	GibcoBRL, Karlsruhe
Leukaemia Inhibiting Factor (LIF)	GibcoBRL, Karlsruhe
L-Glutamine	GibcoBRL; Karlsruhe
Ligasepuffer (10x)	Boehringer, Mannheim
Lithiumchlorid (LiCl)	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid-Lösung (PCR)	Boehringer, Mannheim
Magnesiumsulfat	Serva, Heidelberg
Maleinsäure	Serva, Heidelberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad, München
N,N -Methylen-Bisacrylamid	BioRad, München
Na ₂ HSO ₄	Roth, Karlsruhe
NaH ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH), Plätzchen	Serva, Heidelberg
nicht essentielle Aminosäuren	GibcoBRL, Karlsruhe
Nuklease-freies Wasser	Promega, Heidelberg

Nukleotid-Lösung (PCR)	Boehringer, Mannheim
Objektträger	Bender und Hobein, Karlsruhe
Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg
Paraformaldehyd	Sigma, München
Paraplast Plus Histowax	Sherwood, Athy
PCR-Puffer(10x; magnesiumfrei)	Boehringer, Mannheim
PCR-Reaktionsgefäße	AGS, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	GibcoBRL; Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Proteinase K	Merck, Darmstadt; Sigma, München
Quiagen-Plasmidpräparations-Kit	Quiagen, Düsseldorf
Quiagen-tip-500-Säulen	Quiagen, Düsseldorf
RediPrime Random Primer Labelling	Amersham, Braunschweig
Restriktionsendonukleasen und Puffer	New England Biolabs, Schwalbach; Gibco, Karlsruhe; Promega, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Schwalbach; Gibco, Karlsruhe
RNA-Polymerasen	Boehringer, Mannheim
RNase A	Boehringer, Mannheim
RNase-Inhibitor (RNasIn)	Boehringer, Mannheim
Salzsäure (HCl), rauchend	Roth, Karlsruhe
Sephadex G 50	Pharmacia, Freiburg
Seriologische Pipette (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonlösung	Serva, Heidelberg
T3-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T3-m RNS-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T4-DNS-Ligase	Boehringer, Mannheim
T7-DNS-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T7-m RNS-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Taq-Polymerase mit Puffern	GibcoBRL, Karlsruhe

Torula- RNA	Sigma, München
Tris-HCl, Tris-Base	Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg
Triton X-100	BioRad, München
Trypsin	GibcoBRL, Karlsruhe
Tween-20	BioRad, München
Whatmann 3MM-Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe

2.1.2 Plasmide

pBlueskript II KS +/-	Stratagene, Heidelberg
Cre-Expressionsplasmid	Erhalten von K. Rajewsky, Köln
pGEM7 mit LTNL (loxP, HSV- <i>tk</i> , <i>pgk-neo</i> , loxP)	Erhalten von P. Mombaerts, Mombaerts et al. (1996). Visualizing an Olfactory Sensory Map. <i>Cell</i> 87, 675-86.
pBlueskript II KS +/- mit dem genomischen, murinen AP-2 γ -Lokus	Erhalten von P. Dollé, IGMBC, Straßburg

2.1.3 Bakterien

<i>E. coli</i> DH5 α	Rekombinationsdefekter, suppressiver Stamm; <i>EndA1</i> , <i>gryA96</i> , <i>hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$), <i>lac</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , F` [<i>proAB</i> , <i>lac</i> ^q ZDM15, Tn10]; Tn10=> tet ^r
-----------------------------	--

2.1.4 Zellen

Embryonale Stammzellen (<i>KPA</i>), Sublinie der ES-Linie E14 (5) Mausfibroblasten	Hooper Edinburgh, bezogen von Knobeloch, K. P., Harak, I., Labor FMP, Berlin Zellen selbst präpariert
---	---

2.1.5 Cre-Mauslinien

Mox2-Cre (MORE), heterozygot	Erhalten von M.D. Soriano, Tallquist, M. D. und Soriano, P. (2000). Epiblast-restricted Cre expression in MORE mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function. <i>Genesis</i> 26, 113-5.
Wnt1-Cre, heterozygot	Erhalten von Sucoy, Chai, Y., Xiaobing J., Ito, Y., Bringas, P., Jr, Han J., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P. und Sucoy, H.M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. <i>Dev.</i> 127, 1671-9.

2.1.6 Antikörper

Anti-AP-2 (polyklonal, Kaninchen)	Geneka, St. Hanshaugen, Norwegen
Anti-E-Cadherin (polyklonal, Kaninchen)	Erhalten von R.Kemler, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg
Anti-PCNA („Proliferating Cell Nuclear Antigen“, monoklonal, Maus)	Dako, Hamburg
Anti-ADA (Adenosindeaminase, polyklonal, Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Anti-Digoxigenin, Fab-Fragmente, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (150 U/200 HI)	Boehringer, Mannheim
Anti-Kaninchen HRP, Peroxidase-konjugiertes	Dako, Hamburg

Ziegen anti-Kaninchen Immunglobulin

Anti-Ziege HRP, Peroxidase-konjugiertes

Dako, Hamburg

Kaninchen anti-Ziege Immunglobulin

2.1.7 Oligonukleotide

2.1.7.1 PCR-Primer zur Kartierung des genomischen AP-2 γ -Lokus

Ex1f	5´-CAG ATA ATG TCA AGT ATG-3´
Ex1r	5´-CAT ACT TGA CAT TAT CTG-3´
Ex2f	5´-GAG ATG GCT CAC CCC ATA-3´
Ex2r	5´-CGG GAC TGT AGA GAT GTT-3´
Ex3f	5´-CAC TTG CTC CTA CAC GAT-3´
Ex3r	5´-ATC GTG TAG GAG CAA GTG-3´
Ex4f	5´-TAA CGT TGG CTG AGG TAC-3´
Ex4r	5´-CCC AAA GGG TTC TTG GTC-3´
Ex5f	5´-AAA GCT GCC CAC GTC ACT-3´
Ex5r	5´-GTC CAA CTT CTC CCT CAA-3´
Ex6f	5´-AAC GAG ACC ACA TCT TGG-3´
Ex6r	5´-TTC GCA GAC ATA GGC GAA-3´
Ex7f	5´-CTG ATT CCA GCA AGA CGA-3´
Ex7r	5´-TGG GTG TCC GAT CTT GAT-3´

2.1.7.2 Oligonukleotide für die „Drei-Primer-PCR“

In4dn	5´-AAC AGG TTA TCA TTT GGT TGG GAT T-3´
Ex6up	5´-AAT AGT CAG CCA CCG CTT TAC TAG G-3´
Ex5up	5´-CAA TTT TGT CCA ACT TCT CCC TCA A-3´

2.1.7.2 Oligonukleotid zur Klonierung der 5'-loxP-Sequenz des Targetingvektors

5'-TGGTACCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATATGCA-3'

3'-ACGTACCATGGTATTGAAGCATATTACATACGATATGCTTCAATAT-5'

2.1.8 Lösungen für die *In situ* Hybridisierung

PBSw	PBS (-Ca ²⁺ /-Mg ²⁺), 0.1 % Tween-20
Hybridisierungslösung	0.5 g Boehringer Block, 25 ml Formamid, 12.5 ml 20x SSC pH 7.0; Lösen bei 65 °C unter ständigem Rühren; Zugabe von 6 ml ddH ₂ O, 5 ml 10 mg/ml Torula-RNA, 100 µl 50 mg/ml Heparin, 250 µl 20 % Tween-20, 500 µl 10 % CHAPS, 500 µl 0.5 M EDTA pH 8.0; Lagerung bei -20 °C
MA-Puffer (MaleicAcidBuffer)	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7.5 eingestellt mit NaOH
BM-Block-Puffer	10 % Ziegenserum, 1 % Boehringer Block, in PBSw; Lösen für 1 h bei 65 °C unter ständigem Rühren
AP1-Puffer	100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂

2.1.9 Radiochemikalien

α - ³² P-dCTP	Amersham, Braunschweig
α - ³³ P-ddNTPs	Amersham, Braunschweig

2.1.10 Lösungen und Medien

1 x TAE	40mM Tris; 20mM NaOAc; 1mM EDTA pH 8,0
Ethidiumbromid-Lösung	10mg/ml Ethidiumbromid
50 x TAE	2M Tris; 1M NaOAc; 50mM EDTA pH 8,0
1 x TE	10mM Tris pH 7,4; 1mM EDTA, pH 8,0
Schwanz-Puffer	50mM Tris pH8; 100mM EDTA; 100mM NaCl, 1% SDS
1 x LB- Medium	0,5% Hefeextrakt; 2% Bacto-Trypton; 10mM NaCl; mit dH ₂ O auf 1l auffüllen und durch Autoklavieren sterilisieren; (ggf. 100µg/ml Amp.)

2.1.11 Lösungen für Southern-Blot

Hybridisierungspuffer	7% SDS; 0,5M Na-Phosphatpuffer; 1mM EDTA
Na-Phosphatpuffer	684ml 1M Na ₂ HPO ₄ , 316ml NaH ₂ PO ₄
Waschlösung 1	40mM Na-Phosphatpuffer; 1mM EDTA; 5% SDS
Waschlösung 2	40mM Na-Phosphatpuffer; 1mM EDTA; 1% SDS

2.1.12 Medien und Lösungen für ES- und Blastozystenkultur

Kulturmedium für primäre Fibroblasten	Eine Flasche Dulbecco`s Mod Eagle Medium mit 0.11G/L NA PYR, with Pyridoxine; 5ml Glutamin; 5ml Pen/Strep; 50ml FCS
Kulturmedium für ES-Zellen	Eine Flasche Dulbecco`s Mod Eagle Medium ohne Na-Pyruvat, mit 4500MG/L Glucose, mit Pyridoxin HCl; 5ml L Glutamine; 1ml β -Mercapto- EtOH; 5ml nicht essentielle AS; 5ml Pen/Strep; 500-1000 U/ml LIF; 75ml FCS
Selektionsmedium G418	250 μ g G418 pro ml ES Medium
Elektroporationspuffer	PBS (-Ca/Mg); 5mM Hepes, pH 7.05
Einfriermedium für ES-Zellen und primäre Fibroblasten	20% Dimethylsulfoxid (DMSO); 80% FCS
ES-Lysispuffer	100mM Tris HCl pH8.5; 5mM EDTA; 0,2% SDS; 200mM NaCl; 100 μ g Proteinase K/ml
ES-Gelatine	0,2% Gelatine, autoklavieren
M2-Medium	94,66 mM NaCl; 4,78 mM KCl; 1,71 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,19 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4,15 mM NaHCO_3 ; 20,85 mM HEPES; 23,28 mM Na-Laktat; 0,33 mM Na-Pyruvat; 5,56 mM Glukose
PBND-Puffer	50 mM KCl; 10 mM Tris HCl (pH 8,3); 2,5 M MgCl_2 ; 0,1 mg/ml Gelatine; 0,45 % NP40; 0,45% Tween 20

2.2 Methoden

2.2.1 Analyse von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Nukleinsäurekonzentration zu bestimmen, muß die Absorption von UV-Strahlung der Wellenlänge 260 nm und 280 nm einer Nukleinsäurelösung mittels Spektrophotometer gegen das reine Lösungsmittel gemessen werden. Einer Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht eine DNS-Konzentration von 50 µg/ml, eine RNS-Konzentration von 40 µg/ml bzw. eine Konzentration einzelsträngiger Oligonukleotide von 20 µg/ml. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung und sollte bei DNS einen Wert von ca. 1,8, bei RNS einen Wert von ca. 2 annehmen.

2.2.1.2 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Zunächst wurde die Nukleinsäurelösung mit Wasser auf ein Volumen von 500 µl verdünnt und mit gleichem Volumen einer gesättigten Phenol/Chloroform-Mischung (1:1) versetzt. Anschließend wurde die Probe gevortext (ca. 30 sek.). Danach folgte eine Zentrifugation von ca. 5 min. bei 15000x g. Nach Abnahme der oberen wässrigen Phase wurde diese mit gleichem Volumen Chloroform extrahiert.

2.2.1.3 Präzipitation von Nukleinsäuren aus wäßriger Lösung

Um Nukleinsäure aus wässriger Lösung zu fällen, mußte diese zunächst mittels 3 M Natriumazetatlösung (pH 4.8) auf eine Salzkonzentration von 0.2 M eingestellt werden. Danach wurde der Ansatz mit 2.5-fachem Volumen 100% Ethanol durchmischt und die Nukleinsäuren bei -20 °C für ca. 0.5 h gefällt. Es schloß sich ein Zentrifugationsschritt von ca. 10 min. Dauer und 10000x g an. Durch das anschließende Waschen des Präzipitats mit 70 % Ethanol wurden

Salze entfernt und danach das Pellet im Vakuum oder bei RT getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte in TE-Puffer oder H₂O bei -20 °C.

2.2.1.4 Isopropanol-Präzipitation von DNS aus wäßriger Lösung

Die wäßrige DNS-Lösung mit 0.7 Volumeneinheiten 2-Butanol (Isopropanol) versetzt und für ca. 20 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Nukleinsäuren durch Zentrifugation (ca. 10 min., 10000x g) präzipitiert. Durch Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol wurden Salze entfernt. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

2.2.2 DNS-Präparation

2.2.2.1 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNS (Mini-Präp)

Von einer 3 ml Übernachtskultur (1x LB-Medium, 100 µg/µl Amp) wurden ca. 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert (für 10 s bei 12000x g) und der ÜS bis auf ca. 100 µl. verworfen. Das Zellpellet wurde nun resuspendiert und mit 50 µl Phenol/Chloroform (1:1) versetzt. Die Suspension wurde kurz gevortext und im Anschluß für 5 min. bei 12000x g abzentrifugiert. Es wurden ca. 100 µl der oberen Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in welchem 2 µl 5 M NaCl vorgelegt waren. Schließlich wurden 200 µl EtOH hinzugegeben und für 30 min. bei -20 °C eine Fällung durchgeführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 12000x g für 10 min. wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 30 µl TE resuspendiert.

2.2.2.2 Präparation großer Mengen Plasmid-DNS (Maxi-Präp, Quiagen)

250 ml Übernachtskultur (1x LB-Medium, 100 µg/µl Amp) wurden in 500 ml Zentrifugenbecher überführt und für 5 min. bei 4000x g und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml

Puffer 1 resuspendiert (10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM Tris/HCl, 100 µg/ml RNase A). Danach wurden 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) zugegeben, um die Zellen zu lysieren. Die Suspension wurde für 5 min. bei RT geschwenkt. Danach wurden 10 ml Puffer 3 (2,6 M KAc, pH 4,8) hinzugefügt, um Proteine und genomische DNS auszufällen. Diese wurden durch einen Zentrifugationsschritt (30 min. bei 4 °C und 1000x g) pelletiert. Zwischenzeitlich wurde die Quiagen-tip 500-Säule mit 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, 15 % Triton X-100, pH7,0) äquilibriert. Vor Beladen der Säule mit dem ÜS der Zentrifugation, wurde ein Stück Kleenex-Papier leicht in die Säule eingedrückt. Dadurch wurde ein Verstopfen der Säule durch unlösliche Rückstände verhindert. Schließlich wurde die Säule mit 30 ml Puffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 7,0) gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNS erfolgte mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 8,2) in ein Corex-Röhrchen, in dem 12 ml Isopropanol zur DNS-Präzipitation vorgelegt waren. Danach wurde das Eluat bei 4 °C und 13000x g für 30 min. abzentrifugiert. Der ÜS wurde verworfen und das Pellet mit ca. 2 ml 70 % EtOH gewaschen. Das trockene DNS-Pellet wurde schließlich in 500 µl TE aufgenommen.

2.2.3 DNS/RNS-Gelelektrophorese

2.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

In Abhängigkeit von der zu isolierenden Fragmentgröße wurde ein 0,8 % bis 2% Agarosegel gegossen. Die entsprechende Agarosemenge wurde in 1x TAE-Puffer (Volumen abhängig von Gelkammer) gelöst, in der Mikrowelle vollständig aufgelöst und nach Zusatz von 1.5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Lösung in die Apparatur gegossen. Entsprechend des Probenvolumens wurde der benötigte Kamm eingesetzt. Nach Erhärten des Gels wurde dieses mit 1x TAE-Puffer überschichtet und die Proben in 10 x Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8,0, 10 % Glycerin, 0.02 % Bromphenolblau) aufgetragen. Je nach Größe des Gels

wurde eine Spannung von ca. 70 bis 100 Volt angelegt (Feldstärke ca. 5 bis 15 V/cm).

2.2.3.2 Isolierung und Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter UV-Licht wurde die DNS-Bande mit einem Skalpell exakt aus dem Gel ausgeschnitten. Die Reinigung erfolgte mittels des „DNA Purification Kit, EASY PURE“ (Biozym). Für die folgenden Schritte wurden die vom Hersteller mitgelieferten Instruktionen befolgt.

2.2.4 Klonierungstechniken

2.2.4.1 Schneiden von DNS mit Restriktionsenzymen

Für einen Verdau wurden ca. 3 Einheiten (U) Enzym pro μg DNS eingesetzt, wobei 1U die Enzymmenge bezeichnet, die benötigt wird, um in 1 h $1\mu\text{g}$ Lambda-DNS zu verdauen. Die Restriktion erfolgte stets in einem Volumen, das mindestens dem zehnfachen Volumen des verwendeten Enzymvolumens entsprach. Der Verdau wurde bei der empfohlenen Temperatur und im angegebenen Puffer für 1-2 h oder ü.N. durchgeführt.

2.2.4.2 Dephosphorylierung von 5'-DNS-Enden

Das aus dem Gel eluierte und aufgereinigte DNS-Fragment wurde mit $10\ \mu\text{l}$ 10x Dephosphorylierungspuffer versetzt und mit H_2O auf $100\ \mu\text{l}$ aufgefüllt. Nach Zugabe von $2\ \mu\text{l}$ alkalischer Phosphatase ($20\ \text{U}/\mu\text{l}$) wurde der Ansatz für ca. 1 h bei $37\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf einem Agarosegel gereinigt und das DNS-Fragment eluiert und aufgereinigt

2.2.4.3 Ligation von DNS-Fragmenten

Für eine Ligation wurde das DNS-Fragment in einen vierfachen molaren Überschuß zum linearisierten Plasmid eingesetzt. Nach Zugabe der benötigten Menge an *Ligase* und des entsprechenden Volumens an Ligasepuffer erfolgte eine Inkubation des 20 µl Ligationsansatzes bei 16 °C im Wasserbad ü.N..

2.2.4.4 Präparation kompetenter Bakterien

Eine Bakterienkolonie wurde in 100 ml LB-Medium transferiert und für ca. 3 h im Schüttler bei 37 °C inkubiert, wobei alle halbe Stunde die OD bei 600 nm bestimmt wurde. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,3-0,4 (Beginn der logarithmischen Teilungsphase) wurden die Zellen für 10 min. auf Eis inkubiert und schließlich bei 4 °C für 10 min. bei 800x g zentrifugiert. Der ÜS wurde verworfen und das restliche Medium ließ man für 1 min. abtropfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml 50 mM eiskaltem CaCl₂ resuspendiert und für 20 min. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut abzentrifugiert (10 min., 4 °C, 800x g), der ÜS verworfen und das Medium ließ man für 1 min. abtropfen. Im Anschluß wurde das Pellet in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung mit 15 % Glycerol resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zügig auf Eis aliquotiert (100 µl), in N₂(fl) eingefroren und konnte dann bei -80 °C aufbewahrt werden.

2.2.4.5 Herstellung von LB/Amp-Agarplatten

In einer 1 Liter Flasche wurden 5 g Hefeextrakt, 10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl und 15 g Bacto-Agar mit ddH₂O auf 1 Liter aufgefüllt. Diese Mischung wurde autoklaviert. Vor dem Gießen ließ man den Agar auf ca. 60 °C abkühlen. Dann wurde Ampicillin (f.c. 100µg/ml) zugegeben. Damit ließen sich ca. 30 Agarplatten (9 cm Durchmesser) gießen.

2.2.4.6 Transformation von DNS in kompetente Bakterien

3 μl der zu transformierenden DNS wurden zu 80 μl kompetenten Bakterien pipettiert und für 30 min. auf Eis inkubiert. Es schloß sich ein Hitzeschock von 42 °C für 90 sek an. Die Gefäße wurden schnell für ca. 1-2 min. auf Eis gestellt. Dann wurden 800 μl 1x LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch kurzes Zentrifugieren pelletiert. Das überschüssige Medium nahm man ab und resuspendierte das Pellet in 200 μl 1x LB-Medium. Es folgte das Ausplattieren der Zellen auf Amp.-Platten und die Inkubation ü.N. bei 37 °C.

2.2.5 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

0,5 μg des zu markierenden der DNS-Fragments wurden mit ddH₂O auf 45 μl Gesamtvolumen aufgefüllt und 5min. auf 95°C erhitzt. Danach wurde kurz abzentrifugiert und der Überstand in den Rediprime-Reaktionsmix mit der fertigen Primermischung überführt. 5 μl α -CTP wurden hinzugefügt und durch auf und ab pipettieren gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C für 10min. inkubiert.

Danach wurden 50 μl TE-Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 zugegeben, die radioaktive Sonde auf eine selbst hergestellte Sephadex G50 Filtrationssäule von ungebundenen Nukleotiden gereinigt. Dazu wurde der Schaft einer 1 ml Spritze entfernt, diese mit etwas Glaswolle gestopft und zu 90% mit dem Säulenmaterial beschickt. Die Säule wurde mit der zu reinigenden Sonde beladen, in ein 15 ml Falconröhrchen gestellt und für 3 min. bei 1000 U/min. abzentrifugiert. Die Aktivität der Sonde wurde mit einem Geigerzähler kontrolliert. und der gesamte Durchfluß für 25 ml Hybridisierungsvolumen (Southern Blot) eingesetzt. Die Sonde wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 min. auf 95°C erhitzt, für 2 min. auf Eis abgekühlt und anschließend zur Prähybridisierungslösung gegeben.

2.2.6 Southern-Blot Analyse

Nach elektrophoretischer Auftrennung der verdauten genomischen DNS (0,8 % Agarosegel, 25 V, ü.N.) wurde das Gel zusammen mit einem aufgelegten fluoreszierendem Lineal im UV-Licht fotografiert. Durch eine UV-Bestrahlung von mehreren min. Dauer, wurde die DNS fragmentiert und dadurch die Effektivität des anschließenden Transfers verbessert. Der DNS-Transfer aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte nach der Methode des Kapillarblots (Southern, 1975) und wurde mit 0,4 M NaOH als Transfermittel ü.N. durchgeführt. Die Membran wurde für ca. 5 min. mit 4 x SSC gewaschen und konnte in Frischhaltefolie eingeschlagen über Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden. Schließlich wurde die Membran für 1h bei 65°C in 25ml Hybridisierungspuffer im Hybridisierungssofen inkubiert. Dann wurde die radioaktiv markierten Sonde zugegeben und die Membran ü.N. bei 65°C inkubiert. Die Membran wurde 15 min. mit Waschlösung 1 und 3 x 15 min. mit Waschlösung 2 bei 65°C gewaschen. Danach wurde die Membran für ca. 10 min. in 4 x SSC bei RT gespült, zwischen zwei Lagen Papier kurz getrocknet und in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die Nylonmembran wurde für ein bis mehrere Tage entweder auf einer Phosphoimagerplatte oder auf einem Röntgenfilm bei –80°C inkubiert.

2.2.7 Sequenzierung von Plasmid-DNS

Die gereinigte Plasmid-DNS wurde in ca. 50 µl ddH₂O resuspendiert und ihre Konzentration spektrophotometrisch ermittelt. Für die Sequenzierung wurde ein Sequenzier-Kit der Firma USB verwendet. Für jede Sequenzierung wurden jeweils vier PCR-Reaktionen angesetzt, welche 2,5 µl Terminationsmix enthielten, der sich aus 2 µl dGTP-Terminationsmastermix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP jeweils 7,5µM) sowie 0,5 µl des jeweiligen [³³P]-ddNTPs ([³³P]-ddATP, [³³P]-ddCTP, [³³P]-ddGTP, [³³P]-ddTTP) zusammensetzte. Ein PCR-Reaktionsansatz bestand aus 1 µl des jeweiligen Primers (2 pmol), 0,45 µl Reaktionspuffer, 2 µl DNS (ca. 1 µg), 0,45 µl *Taq* Polymerase (4 U/µl), sowie

0,6 µl ddH₂O und 2,5 µl Terminationsmix. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen gefahren. 30 s 95°C; 30 s 55°C; 1 min. 72°C mit 50 Zyklen. Durch Zugabe von jeweils 4 µl Stop-Lösung (95% Formamid, 20mM EDTA, 0,05% Bromphenol Blau, 0,05% Xylen Cyanol FF) wurde die Reaktion gestoppt, für 15 Minuten auf 70-80° C erhitzt und anschließend auf ein denaturierendes 6%-iges Polyacrylamid-Harnstoff-Sequenziergel geladen. Das Gel wurde bei 1500 V und 120 mA in 1 x TBE-Puffer solange gefahren bis die Bromphenolblau-Bande entweder das Gelende erreichte (oder je nach erforderlicher Auftrennung der DNS-Fragmente 30 min. kürzer oder länger). Danach mußte das Gel abkühlen (handwarm) und konnte anschließend auf 3MM Papier aufgezogen werden. Nachdem das Gel getrocknet war, wurde es für 1-2 Tage auf einem AMERSHAM-Hyperfilm-MP exponiert.

Um die DNS-Fragmente der Sequenzierungsreaktion aufzutrennen wurde ein 6% Polyacrylamidgel eingesetzt. Dabei sorgte eine Harnstoffkonzentration von 8 M dafür, daß die DNS-Fragmente im denaturiertem Zustand blieben. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Leistung von 100 W und einer Temperatur von ca. 50°C in einer Sequenzierapparatur der Firma Biorad. Unter diesen Bedingungen wurde das Gel, je nach gewünschter Sequenzinformation für 2 bis 5h gefahren. Es wurden 150 ml Gellösung bestehend aus 6% (w/v) Acrylamid, 0,16% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 8M Harnstoff in TBE pH 8,3. Die Gellösung wurde unter leichtem Rühren mit 900 µl 10% (w/v) APS und 90 µl TEMED versetzt und in die vorbereitete Sequenzierapparatur gegossen. Dabei wurden konische Abstandhalter (Spacer) von 0,4 mm Dicke verwendet. Zügig wurde ein Haifischkamm mit umgekehrter Orientierung eingeschoben und mit einer Klemme fixiert. Um ein Austrocknen des Gels zu verhindern wurde es an den Öffnungen der Glasplatten mit feuchtem Papier eingeschlagen und polymerisierte in horizontaler Lage ü.N.. Danach wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und die Pufferbecken mit TBE-Puffer aufgefüllt. Der Haifischkamm wurde vorsichtig entfernt, umgedreht und ca. 0,5 bis 1 mm in das Gel eingedrückt. Es folgte der Gelvorlauf bei 100 W für 30 min.. Danach wurden die Proben geladen und aufgetrennt. Nach 2 bis 5h wurde das

Gel aus der Halterung entfernt und in horizontaler Lage bei RT abgekühlt (handwarm). Die Glasplatten wurden vorsichtig getrennt und das Gel auf 3 MM Papier aufgezogen. Nachdem das Gel für 2 h auf dem Vakuumtrockner bei 80°C inkubiert wurde, konnte es auf einem Amersham-Hyperfilm-MP bei RT exponiert werden.

2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der exponentiellen Amplifikation definierter DNS-Fragmente. Ein Reaktionsansatz besaß ein Gesamtvolumen von 50 µl und enthielt 3,7 pmol des jeweiligen Primers 0,5 µl Taq-DNS-Polymerase (5 U/µl), 2 µl MgCl₂ (50 mM), 1 µl dNTPs (10 mM), sowie 5 µl Polymerasepuffer (10x) und 0,02 µg Matritzen-DNS. Zur Genotypisierung von Mäusen bzw. Mausembryonen (E6,5 bis E7,5 sowie E8,5 bis E9,5) wurden 5µl Mausschwanz-DNS bzw. 5 µl Gesamtembryolysat-DNS (Präparationsvolumen 50 µl, E6,5 bis E7,5) oder 5 µl Embryonalhäute-DNS (100 µl Präparationsvolumen, von E8,5 bis E9,5) oder 5 µl Blastozysten-DNS eingesetzt. Die PCR wurde mit folgenden Parametern in einem Thermo Cycler gefahren.

10 min. 94°C

30 s 94°C, Denaturierung der DNS

30 s 55°C, Annealing der Primer

30 s 72°C Synthese der Produkte

Zyklenzahl: 37

2.2.9 Histologie von Mausembryonen

2.2.9.1 Isolierung von Mausembryonen

Durch zervikale Dislokation wurde die Maus rasch getötet und mittels spitzer Schere ein kurzer Schnitt auf der Ventralseite des Tieres geführt, der das Fell durchtrennte. Die Bauchdecke konnte nun durch vorsichtiges Aufreißen des Fells

freigelegt werden. Ein weiterer medianer Schnitt eröffnete die Peritonealhöhle und ermöglichte die Entnahme des Uterus duplex. Dieser wurde in eiskaltes PBS überführt. Unter dem Binokular erfolgte schließlich die Isolierung der Embryonen. Dazu durchtrennte man in einer mit PBS beschickten Petrischale mittels einer kleinen Schere die einzelnen Implantationen. Mittels 2 Uhrmacherpinzetten wurden das Uterusgewebe, die Embryonalhüllen, sowie die Plazenta entfernt. Nach zwei Waschschritten in PBS für jeweils 5 min. wurden die Embryonen für die histologische Arbeit fixiert.

2.2.9.2 Fixierung der Embryonen

Die Fixierung erfolgte ü.N. in 4 % PFA in PBS (-Ca²⁺/-Mg²⁺) bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Embryonen in PBS (-Ca²⁺/-Mg²⁺) für 10 min. gewaschen und im Anschluß durch eine aufsteigende MetOH-Reihe (25%, 50%, 75%, 100% MetOH in PBS -Ca²⁺/-Mg²⁺ für jeweils 10 min.) dehydriert. Danach konnten sie bei -20 °C gelagert werden.

2.2.9.3 Einbetten von Embryonen

Nach der Fixierung der Objekte wurden diese in Einbettkassetten schrittweise nach folgendem Schema mit Gewebewachs perfundiert (Gewebeeinbettautomat der Firma Shandon, Frankfurt): 15 min. 50% Ethanol (45 s abtropfen lassen), 15 min. 70% Ethanol (45 s abtropfen lassen), 3x 10 min. 95% Ethanol (2x 15 s und 1x 45 s abtropfen lassen), 2x 10 min. 100% Ethanol (15 s bzw. 1 min. abtropfen lassen), 15 min. Xylol (15 s abtropfen lassen), 10 min. Xylol (2 min. abtropfen lassen), 20 min. Paraffin (60°C) (1 min. abtropfen lassen), 15 min. Paraffin (60°C) (2 min. abtropfen lassen). Die Embryonen wurden in den Einbettformen (60 °C) in der gewünschten Position plziert mit Wachs übergossen. Eine Haltekassette für das Mikrotom wurde in das noch flüssige Wachs eingedrückt. Das Wachs erhärtete für 1 bis 2 h auf Eis. Mittels Skalpell konnten die Wachsblöcke aus den Behältern gelöst und zurecht geschnitten werden.

2.2.9.4 Herstellung histologischer Schnitte

Zur Anfertigung histologischer Präparate der eingebetteten Objekte wurde zunächst das überschüssige Wachs mittels Skalpell entfernt, so daß eine möglichst geringe Schnittfläche mit zueinander rechtwinkligen Kanten entstand. Die Präparate wurden schließlich in die Halterung des Mikrotoms (Rotationsmikrotom 2035, Leica, Bensheim) eingesetzt und mit einer Schichtdicke von 6-7 µm geschnitten. Mit Hilfe zweier feiner Pinsel oder Pinzetten die Schnitte in ein 40 °C Wasserbad transferiert, in dem sie sich durch die Oberflächenspannung des Wassers innerhalb 30 s glätteten. Schließlich wurden sie auf die Objektträgern aufgezogen und ü.N. bei RT getrocknet. Die Lagerung bis zum Gebrauch der Schnitte erfolgte bei RT.

2.2.10 Antikörperfärbungen auf Paraffinschnitten

Die Gewebe wurden zunächst durch Xylol und einer absteigenden EtOH-Reihe entparaffiniert und die endogene Peroxydaseaktivität durch 30 min. 6% H₂O₂ in MetOH inhibiert. Danach wurden die Schnitte 3 x 5 min. in PBS gewaschen und einer Mikrowellenbehandlung von 5 x 5 min. Dauer in 10 mM Zitratpuffer (pH 6) unterzogen. Unspezifische Bindungen wurden in 10 % Pferdeserum mit 2% Milchpulver (w/v) in PBS für 30 min. bei RT blockiert. Die Inkubation des Erstantikörpers (AP-2, Geneka, 1:200) erfolgte ü.N. bei 4° in 2% Milchpulver in PBS (Feuchtekammer). Nach dem Waschen in PBS (3x5 min.) wurden die Schnitte mit dem Biotin-konjugierten Zweitantikörper (1:400, in 2 % Milchpulver/PBS) für 1 h bei RT inkubiert. Die Färbung erfolgte der vom Hersteller mitgelieferten Anleitung (Vectastain ABC Kit; Vector, Burlingam, USA) mittels DAB. Die Schnitte wurden anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt.

2.2.11 Proliferationsnachweis auf Paraffinschnitten (PCNA-Färbung)

PCNA („Proliferating Cell Nuclear Antigen“) fungiert als Kofaktor der DNS-Polymerase δ und ist in proliferierenden Zellen nachweisbar. Die entparaffinierten Schnitte wurden 2 x 5 min. mit H₂O dest. gewaschen und für 10 min. in 2 N Salzsäure inkubiert. Danach wurden die Schnitte 2 mit H₂O dest. gespült, 20 min. in 0,3 % H₂O₂ in Methanol inkubiert und anschließend jeweils 2 min. mit H₂O dest. und PBS gewaschen. Danach wurden für 10 min. unspezifische Bindungsstellen mit 10 % Pferdeserum und 0,5% Mausserum in Cadenza-Puffer (0,05 M Tris HCl; 0,15 M NaCl pH 7,6; 0,5% Tween 20) blockiert, die Schnitte in PBS gewaschen und mit dem Erstantikörper (Maus Anti-PCNA-Ak., 1:100 in Cadenza-Puffer) für 1-2 h inkubiert. Danach wäscht man mit PBS und inkubiert mit dem Sekundäranitkörper (HRP-konjugierter Anti-Maus-Ak., 1:50 in Cadenza-Puffer) und spült zweimal mit PBS. Danach inkubiert man mit die Schnitte 30 min. Peroxidase Standard-Lösung der Firma Vector und wäscht sie 2 x in PBS. Schließlich wurden die Schnitte in AEC-Standard-Lösung der Firma Vector für einige min. inkubiert, danach mit H₂O dest. gewaschen, mit Hämatoxylin gegengefärbt, gewaschen und eingedeckelt.

2.2.12 Isolierung von genomischer DNS

2.2.12.1 Isolierung von DNS aus der Schwanzspitze von Mäusen

Um die unterschiedlichen Mauslinien zu genotypisieren, wurden mit einer Schere ca. 5 mm der Schwanzspitze abgetrennt, in 500 μ l Schwanzpuffer transferiert und ü.N. bei 55 °C auf dem Schüttler inkubiert. Proteine wurden durch Zugabe von 180 μ l NaCl (5M) ausgesalzen und bei 10000x g für 10 min. abzentrifugiert. Der ÜS wurde in ein neues Gefäß überführt und einer Isopropanolpräzipitation unterzogen. Die genomische DNS wurde in 300 μ l TE-Puffer für 1-2h bei 37°C inkubiert.

2.2.12.2 Isolierung von genomischer DNS aus dem Dottersack

Das extraembryonale Gewebe wurde für die Genotypisierung von Mausembryonen eingesetzt, die 8,5 Tage oder älter waren. Die Embryonen wurden mittels zweier Uhrmacherpinzetten aus dem Endometrium präpariert und die Embryonalhüllen mit dem Dottersack in 100 µl Schwanzpuffer transferiert. Nach einer Inkubation bei 55°C auf dem Schüttler (ü.N.), folgte eine Isopropanolfällung der DNS, die anschließend in 20 µl TE-Puffer gelöst und bei 4°C gelagert wurde. Für eine PCR-Reaktion wurden 2-5µl dieses Ansatzes verwendet.

2.2.12.3 Isolierung von genomischer DNS aus dem Totalpräparat

Embryonen im Alter von 5,5 bis 7,5 wurden nach der Präparation vollständig lysiert. Dazu wurden die Embryonen in 30 µl PBND-Puffer transferiert und bei 55°C im PCR-Reaktionsgefäß in einem Thermo Cycler für 2 h lysiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch einen Hitzeschritt von 95°C für 5 min. inaktiviert. Von diesem Ansatz wurden ca. 5 µl für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die Lagerung der genomischen DNS erfolgte bei 4°C.

2.2.13 Präparation Digoxigenin-markierter Sonden mittels *in vitro*-Transkription

Durch die *in vitro* -Transkription mittels T7- oder T3-mRNS-Polymerase kann aus der cDNS eines Gens die mRNS in Sinn- oder Antisinnorientierung erzeugt werden, wobei Digoxigenin- gekoppeltes dUTP eingebaut wird. Ein enzymgekoppelter αDigoxigenin-Antikörper weist schließlich die mRNS indirekt über eine Farbreaktion nach.

Für die Synthese der Sinn- und Antisinn-RNS-Sonde wurden jeweils 10 µg des Plasmids mit dem entsprechenden Enzym linearisiert über ein Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte DNS-Fragment isoliert und aufgereinigt. Beide Sonden wurden präzipitiert und in 10 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen.

2 μl (ca. 1 μg) des linearisierten Plasmids wurde mit 2 μl 10x Transkriptionspuffer, 12 μl Nuklease-freiem ddH₂O, 2 μl NTP-Markierungs-Mix und 1 μl RNasin und 2 μl der entsprechenden mRNS-Polymerase (T7 oder T3) versetzt. Beide Ansätze wurden für ca. 3 h bei 37°C inkubiert.

Danach wurde die Sonde durch eine LiCl-Fällung von den überschüssigen Nukleotiden befreit. Die mRNS-Proben in 40-50 μl Nuklease-freiem H₂O aufgenommen und konnten bei -20 °C gelagert werden.

2.2.14 *In situ* Hybridisierung im Totalpräparat („Whole mount“ *in situ* Hybridisierung)

Die *in situ* Hybridisierung dient dem Nachweis des RNS-Expressionsmusters im Totalpräparat (Organe, Embryonen). Eine mit Digoxigenin markierte Antisinn-RNS-Sonde bindet an die Sinn-RNS im Präparat. Der indirekte Nachweis der gebundenen Sonde erfolgt durch einen α Digoxigenin-Antikörper, welcher mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, die Nitroblau Tetrazoliumsalz (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) zu einem blauen Endprodukt umsetzt. Die Präparate müssen für die Sonde und den Antikörper durchlässig sein. Deshalb dürfen die analysierten Embryonen nicht älter als E11-E12 dpc. alt sein. Bei älteren Tieren bildet die mehrschichtige Haut eine undurchlässige Barriere. Die präparierten Embryonen wurden auf Eis durch eine abfallende MetOH-Reihe geführt (75%, 50% und 25% MetOH in PBSw, jeder Schritt 10 min., 4°C) und danach 3x5 min. auf Eis mit PBSw (jeweils 5 min.) gewaschen. Anschließend wurden die Präparate bei RT in PBSw mit 4,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K angedaut, um die Permeabilität des Gewebes zu erhöhen. Die Inkubationszeit ist abhängig vom Alter der Tiere. Die entsprechenden Werte wurden tabellarisch zusammengefaßt:

Alter der Embryonen in dpc.	Inkubationszeit in min.
6,5	3
7,5	5
8,5	6
9,5	10
10,5	13
11,5	20
12,5	25-30

Um den Proteinaseverdau zu stoppen, transferiert man die Embryonen in eine frisch angesetzte Glyzinlösung (2 mg/ml in PBSw). Danach wäscht man 2x 5 min. mit PBSw und refixiert die Präparate für 15 min. in einer Lösung mit 4% PFA (w/v) und 0,2% (v/v) Glutaraldehyd in PBSw. Anschließend wurden die Embryonen 3x für jeweils 5 min. in PBSw gewaschen und schrittweise, zuerst in die mit PBSw 1:1 verdünnte Hybridisierungslösung und danach in die unverdünnte Hybridisierungslösung überführt. Aufgrund der höheren Dichte der Hybridisierungslösung gegenüber PBSw, schwimmen die Präparate zunächst an der Oberfläche und dürfen erst nachdem sie abgesunken sind und die Lösung vollständig das Präparat penetriert hat, transferiert werden. Die Hybridisierungslösung wurde erneuert und die Präparate für 2-3 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Die Digoxigenin-markierte mRNS-Sonde wurde in ca. 100µl Hybridisierungslösung aufgenommen, für 5 min. auf 95°C denaturiert und den Embryonen zugeführt. Die Endkonzentration der Sonde betrug 200 ng/ml. Die Hybridisierung erfolgte bei 70°C ü.N. im Wasserbad unter leichtem Schütteln. Am folgenden Tag ersetzt man die Hybridisierungslösung durch – 20°C kalte Hybridisierungslösung und wäscht für 5 min. bei 70°C. Zur Hybridisierungslösung wurden 60% (v/v) 2x SSC (pH 4,5) hinzugegeben und nach ca. 3 min. wurde die gesamte Lösung durch 2x SSC (pH 7,4) ersetzt und für 30 min. bei 70°C gewaschen. Die Lösung wurde erneuert und die Präparate ein

zweites mal für 20 min. bei 70°C gewaschen. Die Embryonen wäscht man anschließend 2x bei 70°C für 30 min. in MA-Puffer und 3x bei RT für 10 min. in PBSw. Die Präparate wurden in BM-Block-Puffer transferiert und für 2h bei 4°C auf einem Nutator inkubiert. Gleichzeitig wurde der Anti-Digoxigenin-Antikörper mit der vom Hersteller angegebenen Konzentration separat in BM-Block-Puffer präinkubiert (2h, 4°C). Die Embryonen transferiert man in die Antikörperlösung und inkubiert auf dem Nutator bei 4°C ü.N.. Die Präparate wurden bei RT 5x für 45 min. in 0,1% BSA (w/v) in PBSw (Absättigung unspezifischer Bindestellen) und 2x für 30 min. in PBSw, sowie 2x für 10 min. in AP1-Puffer gewaschen. Danach transferiert man die Embryonen in BM Purple-Färbelösung und inkubiert sie auf dem Nutator im Dunkeln bis die gewünschten Intensität der Farbreaktion erreicht wurde. Die Farbreaktion kann durch den Transfer der Präparate in AP1-Puffer unterbrochen und durch Inkubation bei 4°C verlangsamt werden. Die Farbreaktion stoppt man durch 3x waschen (10 min.) in PBSw. Die gefärbten Embryonen wurden durch eine aufsteigende MetOH-Reihe (jeweils 10 min., RT) dehydriert und bei -20°C gelagert.

2.2.15 Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)

Murine Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse (ICM) früher Embryonalstadien isoliert. Die Zellen sind pluripotent und somit in der Lage unter bestimmten Voraussetzungen einen kompletten Organismus zu generieren. ES-Zellen müssen sehr sorgfältig behandelt werden. Eine zu hohe Zelldichte führt zu Differenzierungsprozessen und zum Verlust der Pluripotenz der Zellen. Deshalb wurden die Zellen regelmäßig gesplittet. Die embryonalen Stammzellen wurden auf gelatinisierten Gewebekulturschalen auf einer Schicht embryonaler Feederzellen in ES-Medium kultiviert, wobei das Medium täglich gewechselt wurde.

2.2.15.1 Gelatinisieren von Gewebekulturschalen

Die Gewebekulturschalen wurden mit Gelatine-Lösung (0,2% in ddH₂O) beschickt und einige Minuten inkubiert, bevor die Gelatine wieder abgesaugt wurde und die Schalen für die weitere Verwendung zu Verfügung standen.

2.2.15.2 Splitten von ES-Zellen

Wird eine bestimmte Zelldichte überschritten, so beginnt die Differenzierung der ES-Zellen, was zum Verlust der Pluripotenz führt. Es ist deshalb wichtig die Morphologie (tropfenförmige Kolonien mit regelmäßigem Rand) der Zellen alle 1-2 Tage zu überprüfen und sie gegebenenfalls je nach Bedarf 1:2 bis 1:10 zu splitten.

Dazu wurden die ES-Zellen 1x mit PBS (-Ca²⁺/-Mg²⁺) gewaschen und mit 1ml 0,25% Trypsin pro 10 cm Gewebekulturschale bei 37°C im Brutschrank für ungefähr 5 min. inkubiert. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen schließlich vereinzelt, in 5 ml ES-Medium gewaschen und bei 1000 U/min. 3 min. abzentrifugiert und mit der gewünschten Konzentration ausplattiert.

2.2.15.3 Einfrieren von ES-Zellen

Bei Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die ES-Zellen trypsiniert, vereinzelt, gewaschen, abzentrifugiert und im geeigneten Volumen Einfriermedium (80% FCS / 20% DMSO, eiskalt) resuspendiert und bei -80° ü.N. eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff transferiert und konnten so über Monate gelagert werden.

2.2.15.4 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut in ES-Medium gewaschen und anschließend auf die vorbereiteten gelatinisierten und mit Feederzellen präparierten Gewebekulturschalen ausgesät.

2.2.15.5 Präparation und Kultivierung embryonaler Feederzellen.

Feederzellen wurden aus Rümpfen 13 bis 14 Tage alter Embryonen isoliert. Diese Mischpopulation besteht zum größten Teil aus Fibroblasten, welche die gleiche Antibiotikumresistenz besitzen müssen, wie der Targeting-Vektor. Im allgemeinen verwendet man das Neomycinresistenzgen, auf das mit G418 (Neomycin) selektiert werden kann. Homozygote CD44 Knockout Mäuse erfüllen diese Bedingung. Die trächtigen Weibchen wurden nach Erreichen des 13. – 14. Schwangerschaftstages durch zervikale Dislokation getötet, der Uterus duplex wurde entnommen und in PBS ($-Ca^{2+}/-Mg^{2+}$) transferiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden in einer Sterilbank durchgeführt. Die Embryonen wurden vom Uterusgewebe, von der Dezidua sowie von den Embryonalhäuten befreit und anschließend dekaputiert. Danach wurden die inneren Organe entfernt und der übrige Rumpf in eine Petrischale mit 0,25% Trypsin überführt. Mittels Schere wurde das Gewebe zu einer breiigen Masse verarbeitet und durch Auf- und Abpipettieren (10 ml Pipette) weiter zerkleinert, um in einem Inkubationsschritt von 30 min. bei 37°C optimale Enzymwirkung zu erzielen. Danach wurden die Einzelzellen durch ein Zellsieb von der übrigen Gewebemasse separiert und in einem mit Feedermedium beschickten 50 ml Falconröhrchen gesammelt. Anschließend wurden die Zellen 3 min. bei 1000 U/min. abzentrifugiert in Feedermedium resuspendiert und auf 20 cm Petrischalen ausplattiert (ca. 1 Embryo pro Schale). Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Feederzellen je nach Bedarf 2 bis 3 mal ca. 1:5 gesplittet (die Zellen sollten nicht öfter als 7 mal gesplittet werden, da ungefähr ab dieser Passage Seneszenz auftritt), bevor sie durch Bestrahlung teilungsunfähig gemacht und aus ihnen Gefrierkulturen angelegt wurden.

2.2.15.6 Inaktivierung von Feederzellen

Die Feederzellen wurden nach Erreichen von 90-100% Konfluenz (die Zellen sollten keine Mehrzellschichten ausbilden) trypsiniert, in einem 50 ml Falconröhrchen gesammelt. Durch Zugabe des gleichen Volumens Feedermedium wurde das Enzym inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen einer Strahlung von 2000 bis 3000 rad einer ^{60}CO Quelle ausgesetzt und somit teilungsunfähig gemacht.

2.2.15.7 Einfrieren und Auftauen von Feederzellen

Das Einfrieren und Auftauen von Feederzellen erfolgte analog dem Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen unter Verwendung von Feedermedium.

2.2.15.8 Linearisierung des Targetingvektors

Für die Linearisierung des Targetingvektors wurden 30 μg Plasmid-DNS mit dem Restriktionsenzym Sall oder ClaI geschnitten. Der Verdau wurde in einem Gesamtvolumen von 100 μl durchgeführt und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die Linearisierung wurde auf einem Agarosegel überprüft. Es folgte die Reinigung der linearisierten DNS mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und eine NaAc-Präzipitation, wobei das Trocknen des Pellets unter der Sterilbank durchgeführt wurde. Die aufgereinigte DNS konnte in 20-30 μl ddH₂O bei -20°C bis zur Elektroporation aufbewahrt.

2.2.15.9 Elektroporation von ES-Zellen

Der mit Sall oder ClaI linearisierte Targetingvektor (20-30 μg) wurde durch Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und das Pellet nach EtOH/NaOAc Fällung in H₂O aufgenommen (Konzentration: 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Die ES-Zellen einer 5 cm Schale wurden nach Erreichen der geeigneten Zelldichte trypsiniert, zweimal mit eiskaltem Elektroporations-Puffer (5 mM HEPES in PBS, pH 7,0) gewaschen, in

800 μ l eiskaltem E-Puffer resuspendiert und in eine eiskalte Elektroporationsküvette transferiert, die mit 20-30 μ g des linearisierten Plasmids beschickt war. Die ES-Zellen wurden mit 400 V und 250-500 μ F elektroporiert („Gen-Pulser“ der Firma BioRad) und auf 1-5 10 cm Schalen ausplattiert. Die Elektroporation zirkulärer Plasmide (z.B. Cre-Expressionsvektor) erfolgte analog.

2.2.15.10 Selektion neomycinresistenter ES-Klone

Mit der Neomycinselektion wurde entweder nach 24 h begonnen oder die Zellen wurden unmittelbar nach der Elektroporation in das Selektionsmedium (250 μ g/ μ l G418, aktive Substanz) überführt. Die Zellen wurden ca. 7-10 Tage unter Selektion gehalten, wobei nach ca. 1-2 Tagen Zellklone erkennbar waren und die nicht resistenten Kolonien nach ca. 5 Tagen abstarben.

2.2.15.11 Picken neomycinresistenter ES-Klone

Nach Erreichen der geeigneten Koloniegröße wurden die Zellen gepickt, in einer 96-Lochplatte trypsiniert und zu gleichen Teilen auf eine 96- und auf eine 24-Lochplatte ausgesät. Die Zellklone der 96-Lochplatte wurden nach Erreichen einer geeigneten Kolonienzahl und -größe bei -80° C eingefroren. Dazu wurden die Platten um das Austrocknen der Zellen zu verhindern mit Parafilm abgedichtet und in Folie eingeschweißt. Die Klone der 24-Lochplatte konnten nach Erreichen von ca. 90% Konfluenz der DNS-Präparation unterworfen werden.

2.2.15.12 Isolierung von ES-DNS und Restriktionsanalyse

Für die DNS-Präparation wurden die ES-Zellen der 24-Lochplatte für 3h bis 1 Woche mit 500 μ l ES-Lysispuffer inkubiert. Durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol erfolgte die Fällung der DNS für ca. 30 min. bis 1h bei RT. Die

genomische DNS wurde mit einer blauen Eppendorfspitze aufgenommen und in einer Petrischale in 70% EtOH durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gewaschen und anschließend in 300-400µl TE-Puffer transferiert. Die DNS wurde ü.N. bei 55°C auf dem Schüttler gelöst. 100µl DNS wurden im geeigneten Restriktionspuffer und 80 U des entsprechenden Enzyms in 140µl Gesamtvolumen ü.N. verdaut. Die DNS wurde präzipitiert, in 40µl H₂O gelöst und ein zweites Mal verdaut, um eine möglichst vollständige Restriktion zu gewährleisten. Das Gesamtvolumen betrug 60µl mit ca. 40U des entsprechenden Enzyms. Nach der Inkubation des Ansatzes ü.N. bei 37°C wurde die DNS in einem 0,8% Agarosegel bei 20-25V ü.N. aufgetrennt.

2.2.16 Kultivierung von Blastozysten

2.2.16.1 Herstellung von Blastozystenkulturen

Trächtige Weibchen wurden an Tag 3,5 der Embryonalentwicklung durch zervikale Dislokation getötet und der Uterus duplex freipräpariert. Der Uterus wurde auf einem saugfähigen Papier ausgebreitet und die versorgenden Blutgefäße abgespreitet. Die Blutgefäße wurden mittels Schere abgetrennt, da rote Blutkörperchen die Lokalisation der Blastozysten in einem späteren Präparationsschritt stören. Die Blastozysten wurden mit M2-Medium (mittels Spritze) aus dem Uterus ausgespült und mit einer Glaskapillare einzeln in die Kammern von gelatinisierten Einzelkammerobjektträgern („Chamber Slides“), die mit 50 µl ES-Medium (ohne LIF) beschickt waren, transferiert. Die Objektträger wurden in einer Feuchtekammer kultiviert. Die Blastozysten hefteten sich nach 1-2 Tagen an den Objektträgern an. Danach wurde nochmals 50 µl frisches ES-Medium (ohne LIF) zugeführt und die Blastozystenkulturen nach ca. 5 bis 7 Tagen für die entsprechenden Versuche eingesetzt.

2.2.16.2 Isolierung von DNS aus Blastozystenkulturen

Der Keimknoten der Blastozystenkultur wurde gepickt, in 20 µl PBNB-Puffer transferiert und für 2 h bei 55°C inkubiert. Davon wurden 2-5 µl für die Genotypisierung mittels PCR eingesetzt. Die genomische DNS konnte bei 4 °C gelagert werden.

2.2.16.3 Antikörperfärbung von Blastozystenkulturen

Die Blastozystenkultur wurde zunächst mit Azeton bei -20°C für 10-20 min. fixiert und die endogene Peroxydaseaktivität durch 5 min. 3% H₂O₂ in MetOH inhibiert. (Dieser Schritt entfiel, falls der verwendete Zweitantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war.) Danach wurden die Schnitte 3 x 5 min. in PBS gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden in 3% Milchpulver (w/v) in PBS für 30 min. bei RT blockiert. Die Inkubation des Erstantikörpers (Anti-AP-2, 1:200; Anti-E-Cadherin, 1:100; Anti-ADA, 1:100) erfolgte ü.N. bei 4° in 3% Milchpulver in PBS (Feuchtekammer). Nach dem Waschen in PBS (3x5 min.) wurden die Schnitte mit dem HRP-konjugierten Zweitantikörper (1:400, in 3 % Milchpulver/PBS) für 1 h bei RT inkubiert. Die Färbung erfolgte der vom Hersteller mitgelieferten Anleitung (Vectastain ABC Kit; Vector, Burlingam, USA) mittels DAB.

2.2.17 Blastozysteninjektion

2.2.17.1 Vorbereitung der ES-Zellen für die Blastozysteninjektion

Zunächst mußten die ES-Zellen von den primären Fibroblasten getrennt werden. Die embryonalen Fibroblasten haben die Eigenschaft schneller am Substrat anzuwachsen als die ES-Zellen. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Trennung der beiden Zelltypen zu Nutzen. Die Zellen wurden trypsiniert und 20-30min. bei 37°C inkubiert. Die Fibroblasten hafteten an der Gewebekulturschale und die im Überstand befindlichen ES-Zellen konnten abgezogen werden. Die ES-Zellen wurden bei 1000U/min. 3min. zentrifugiert und das Zellpellet in 300µl

ES-Medium resuspendiert. Die ES-Zellen wurden bis zur Injektion auf Eis gelagert.

2.2.17.2 Isolation von Blastozysten

Weibliche Tiere der Stämme C57BL6/DBA2 werden mit fertilen Männchen des selben Stammes verpaart. Am nächsten Morgen werden die weiblichen Tiere auf die Anwesenheit eines Vaginalpfropfs untersucht. Vaginalpfropfe sind koagulierte Proteine der männlichen Samenflüssigkeit, die nach der Kopulation noch ungefähr 12 Stunden sichtbar sind, dann aber aus der Vagina herausfallen oder sich auflösen.

Die trächtigen Tiere wurden am 3.5 Tag nach der Befruchtung durch zervikale Dislokation getötet, das Abdomen mit 70% EtOH desinfiziert und das Bauchfell mit einer Pinzette angehoben und eingeschnitten. Die Bauchdecke konnte nun durch vorsichtiges Aufreißen des Fells freigelegt werden. Ein weiterer medianer Schnitt eröffnete die Peritonealhöhle und ermöglichte die Entnahme des Uterus duplex. Der Uterus wurde auf ein Papierhandtuch überführt und das restliche Fettgewebe abgetrennt. Der Uterushals wurde durchtrennt und die zwei Uterushälften in M2-Medium (94,66 mM NaCl; 4,78 mM KCl; 1,71 mM CaCl₂ x 2H₂O; 1,19 mM MgSO₄ x 7H₂O; 4,15 mM NaHCO₃; 20,85 mM HEPES; 23,28 mM Na-Laktat; 0,33 mM Na-Pyruvat; 5,56 mM Glukose) überführt. Die beiden Uterushälften wurden unter dem Binokular mit M2-Medium aus einer feinen Spritze gespült. Anschließend wurden die Blastozysten mit einer Transferkapillare in ein neues Schälchen mit M2-Medium überführt. Bis zur Injektion wurden die Blastozysten im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.17.3 Injektion von ES-Zellen in Blastozysten

(Diese Technik wurde von technischen Assistentinnen durchgeführt.)

Die Injektion erfolgte auf einem Deckglas mit erhöhtem Rahmen als Injektionskammer. Zunächst wurde ein großer Tropfen M2-Medium in die Mitte

des Deckglas gebracht. Danach wurden 10 Blastozysten und einige hundert ES-Zellen in den Mediumtropfen transferiert. Man läßt die Zellen kurz absetzen und bringt danach den Halterahmen unter das Mikroskop.

Es wurden 20-30 ES-Zellen in die Injektionskapillare gesaugt und mit der Haltekapillare wurde die Blastozyste so fixiert, daß der Keimknoten oben im Bild zu liegen kommt. Mit der Injektionsnadel wurde ins Blastozoel gestochen und 10-15 ES-Zellen injiziert, anschließend wurde die Nadel vorsichtig herausgezogen. Der Vorgang wurde bei allen Blastozysten wiederholt.

2.2.17.4 Uterustransfer der Blastozysten in scheinchwangere Mäuse

(Diese Technik wurde von technischen Assistentinnen durchgeführt.)

Die Blastozysten (2.5 dpc.) wurden in den Uterus scheinchwangerer Weibchen transferiert. Scheinchwangere Mäuse erhält man durch die Verpaarung mit vasektomierten männlichen Mäusen.

Das scheinchwangere Tier wurde mit i.p.-Injektion von Avertin narkotisiert. Nach vollständiger Narkose wurde das Fell auf dem Rücken des Tieres mit 70% Ethanol gereinigt. Die Maus wurde nach der Desinfektion mit einem 1cm langen Schnitt in die Oberhaut entlang der Wirbelsäule im Bauchbereich geöffnet. Die Öffnung wurde zunächst nach links gezogen, an der Stelle wo das Ovar durch die Unterhaut scheint wurde ein kleiner Schnitt gesetzt.

Ovar, Eileiter und Uterus wurden an dem dort lokalisierten Fettpolster herausgezogen und mit einer Klemme, die am Fettpolster befestigt wurde fixiert. Sechs bis acht Blastozysten wurden mit einer Transferkapillare in den Uterus transferiert, hierfür wurde mit einer Kanüle ein Loch in den Uterus gestochen und in dieses die Transferkapillare eingeführt. Nach dem Transfer wurde der Uterus in die Körperhöhle zurückgedrückt und der Vorgang auf der rechten Seite wiederholt. Anschließend wurde die Oberhaut geklammert.

3. Ergebnisse

3.1 Kartierung des genomischen AP-2 γ -Lokus

Für die Erzeugung einer AP-2 γ -defizienten und einer konditional AP-2 γ -defizienten Mauslinie wählte ich das Cre/loxP-System. Die loxP-Sequenzen werden hierbei in funktionell unwichtigen, nicht kodierenden Intronsequenzen plaziert. Da ausschließlich lineare DNS mit dem genomischen Ziellokus effektiv homolog rekombiniert, muß der fertige Targetingvektor eine Restriktionsschnittstelle ausschließlich im Rückgrad des Plasmids aufweisen, durch die das zirkuläre Plasmid linearisiert werden kann. Detaillierte Kenntnisse über die Struktur des genomischen Ziellokus sind deshalb die Voraussetzung für die Klonierung eines geeigneten Targetingvektors. Die Sequenz des humanen Lokus wurde 1996 vollständig sequenziert und publiziert (Büttner, 1996, Accession Y09912). Die murine genomische AP-2 γ -Sequenz war noch nicht bekannt, deshalb mußte ich den murinen Lokus restriktionskartieren und teilweise sequenzieren. Die Exon-Sequenzen der AP-2-Gene sind zwischen Maus und Mensch hoch konserviert. Somit konnte ich die Exongrenzen des humanen AP-2 β -Lokus auf die murine AP-2 β -cDNS übertragen (s. Anhang). Die Gene der AP-2-Familie kodieren für 7 Exons, die zwischen den einzelnen Familienmitgliedern hoch konserviert sind. Durch einen Sequenzvergleich zwischen der murinen AP-2 β -cDNS mit der murinen AP-2 γ -cDNS konnten so die Exongrenzen des AP-2 γ -Gens ermittelt werden (s. Anhang). Diese Information ermöglichte die Bestimmung der Introngrößen des genomischen AP-2 γ -Lokus, denn nun konnten PCR-Primer konzipiert werden, die in benachbarten Exons binden und die entsprechenden Introns in einer PCR-Reaktion amplifizieren. Zur exakten Kartierung des murinen Lokus wurde die Größe der Introns und die Position ihrer Restriktionsschnittstellen rechnerisch über eine Eichkurve ermittelt. Die Laufweite der Marker-DNS-Fragmente (x-Achse) im Agarosegel wurden bestimmt (vgl. Tab. 3.1) und gegen ihre Größe (y-Achse) graphisch dargestellt (vgl. Abb. 3.1). Über die logarithmische Regression (vgl.

Abb. 3.1) dieser Wertepaare konnte die Größe der Introns errechnet werden (vgl. Tab. 3.2).

Tabelle 3.1: Ermittelte Laufwerte der Marker-Fragmente bei der Elektrophorese

Marker-Fragment Nr.	Marker-Fragment: Laufwert in mm	Marker-Fragment: Größe in bp
1	4	3054
2	12	2036
3	16,5	1636
4	27,5	1018
5	42	506
6	46,5	396
7	48,5	344
8	50,5	298

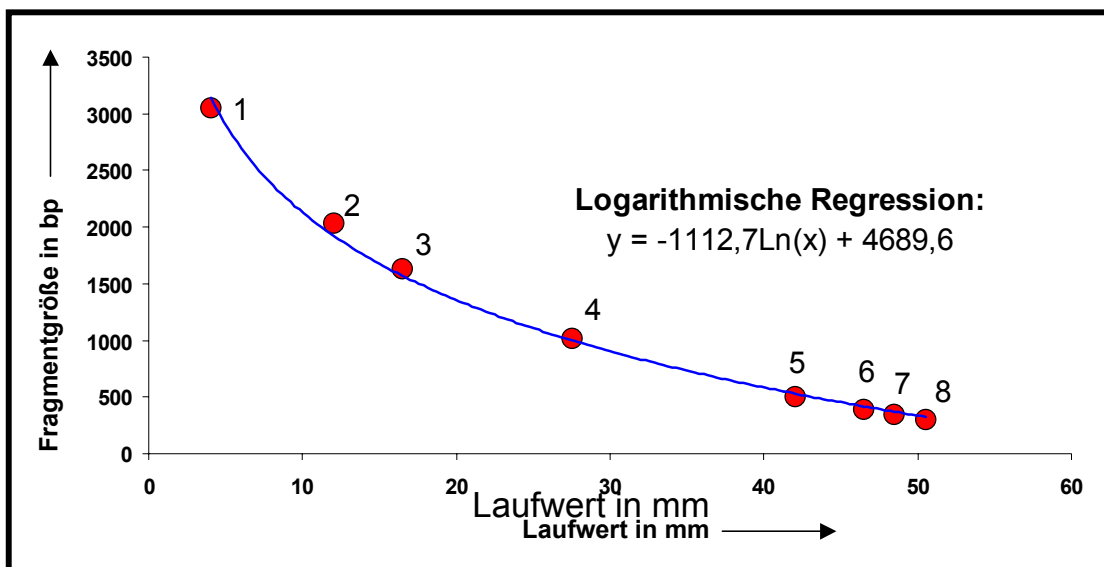


Abbildung: 3.1 Graphische Darstellung der Laufwerte der Marker-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe.

Die Größe der Marker-Fragmente (Y-Achse, in bp) wurde gegen ihre Laufwerte (x-Achse, in mm) bei der Elektrophorese aufgetragen. Aus der Datenreihe wurde die logarithmische Regression ($y = -1112,7\ln(x)+4689,6$) berechnet, über die sich die Fragmentgrößen (y) der Introns aus ihren gemessenen Laufwerten (x) bei der Elektrophorese bestimmen lassen.

Tabelle: 3.2 Berechnete Introngrößen

Intron Nr.	Intron-Laufwert in mm	Introngröße in bp
1	17	1537
2 (S3)	59,5	*143 (101)
3	19,5	1384
4 (S6)	40	*585 (406)
5	12,5	1879
6	28	982

Die Introns Nr. 2 und 4 wurden später sequenziert und ihre Größe auf die in den Klammern angegebenen exakten Werte korrigiert. Die Sequenzen sind im Anhang unter S3 bzw. S6 aufgeführt.

Mit den gereinigten Amplifikaten führte ich eine Restriktionskartierung durch. Um die Position einer asymmetrischen Schnittstelle (z.B. HindIII, Abb. 3.2) in einem Intron (z.B. A, Abb. 3.2) eindeutig zu bestimmen, wurden überlappende Fragmente (z.B. F) generiert. Die Fragmente sind in Abb. 3.2 als gelbe Balken und die verwendeten Primer als Pfeile dargestellt, wobei rote Linien die Primerbindestellen markieren. Zusätzlich wurden die Exon-Intron-Übergänge partiell sequenziert und in Abb. 3.2 als schmale hellgraue Balken eingezeichnet (S1-S10, Sequenzen s. Anhang). Die singulären Schnittstellen sind mit einem Stern (*) markiert. Nach Auswertung der Daten konnte eine detaillierte Karte des ca. 8 kb großen genomischen Bereichs zwischen Exon 1 und 7 erstellt werden (Abb. 3.2).

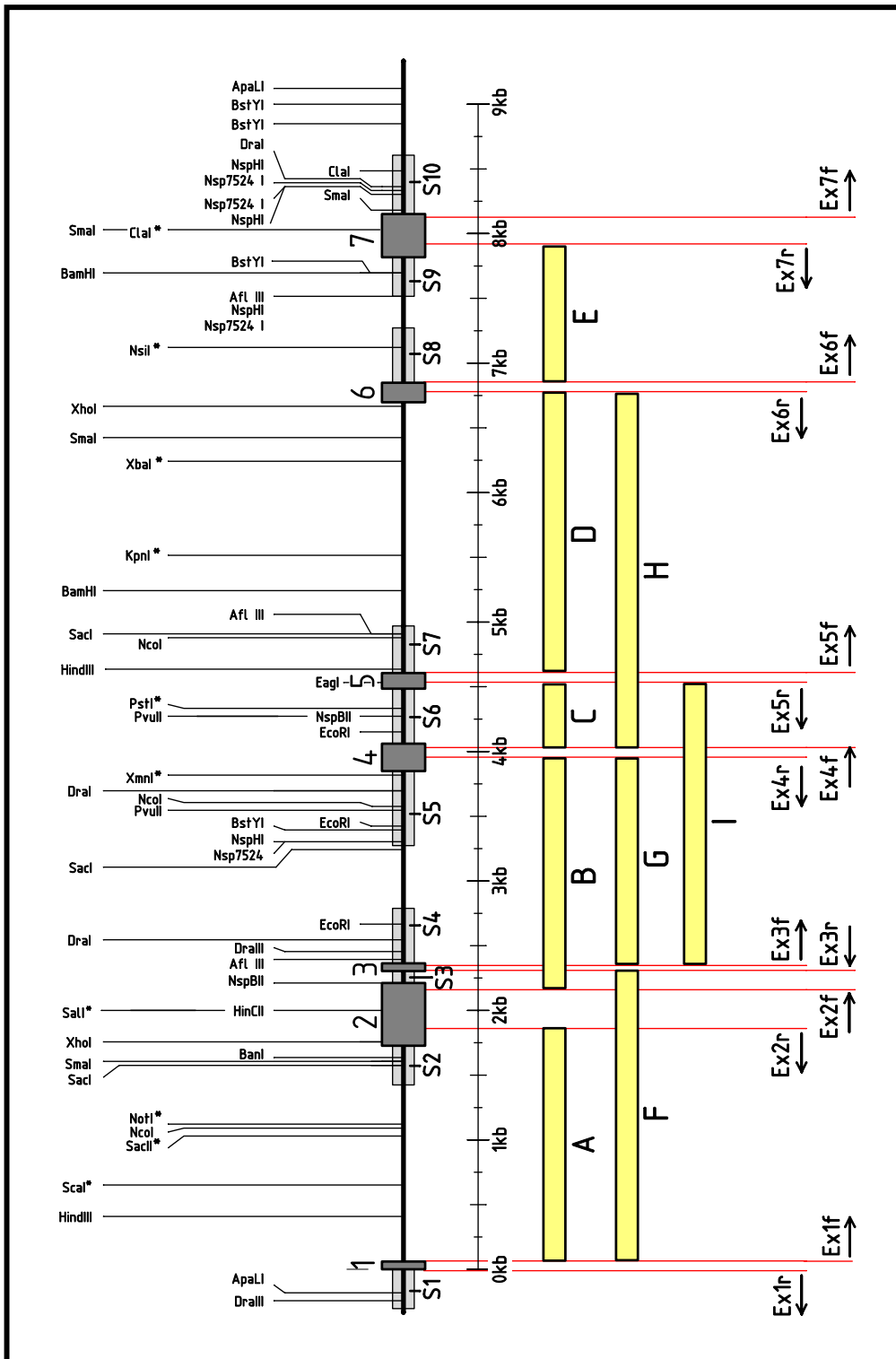


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des genomischen AP-2 γ -Lokus der Maus.

Der linke Teil der Darstellung zeigt schematisch den bisher noch nicht publizierten genomischen Locus von AP-2 γ . Die sieben Exons wurden als dunkelgraue Balken eingezeichnet und nummeriert. Die Introns sind als Strich dargestellt und die sequenzierten Regionen mit hellgrauen Balken (S1-S10) unterlegt. Die Restriktionsschnittstellen sind eingetragen, wobei singuläre Schnittstellen durch einen Stern markiert (*) wurden. Die exakte Position der Schnittstellen kann über den Skalenmaßstab in der Mitte der Abbildung

bestimmt werden. Die gelben Balken im rechten Teil der Abbildung kennzeichnen die PCR-Produkte A-I, durch welche die Größen und die Restriktionsschnittstellen der Introns ermittelt wurden. Die Position und Orientierung der verwendeten Primer wurden als Pfeile im rechten Teil der Abbildung dargestellt und ihre Bindestellen durch rote Linien markiert.

3.2 Klonierungsstrategie des konditionalen Targetingvektors

Die Exons 4 bis 6 kodieren für die Dimerisierungs- und DNS-Bindungsdomäne der Proteine (Williams & Tjian, 1991). Zur Inaktivierung des AP-2 α -Gens war die Selektionskassette in das 5. Exon (Schorle et al., 1996) oder in das 6. Exon (Zhang et al., 1996) eingeführt worden. Die Funktion des AP-2 β -Gens konnte durch die Insertion der Selektionskassette in das 4. Exon zerstört werden (Moser et al., 1997a). Ich konnte somit davon ausgehen, daß die Deletion eines der Exons 4 bis 6, welche für die Funktion der DNS-Bindungsdomäne essentiell sind (Williams & Tjian, 1991; Bauer et al., 1994), im Falle von AP-2 γ ebenfalls zur erfolgreichen Geninaktivierung führen würde. Basierend auf den ermittelten Restriktionsschnittstellen beschloß ich das 5. Exon durch loxP-Sequenzen zu flankieren und die „geflochte“ Tk/neo-Selektionskassette zwischen Exon 5 und 6 zu plazieren. Nach dem Entfernen der Selektionskassette durch transiente Cre-Expression im ES-Zellsystem, kann sowohl eine Knockout-Mauslinie als auch eine konditionale Mutante mit dem „geflochten“ Exon 5 etabliert werden. Durch Einkreuzen einer Cre-Maus kann schließlich bei der konditionalen Mutante das 5. Exon deletiert und das AP-2 γ -Gen inaktiviert werden.

Ausgangsprodukt für die Klonierung des Targetingvektors war ein ca. 20 kb großer, modifizierter pBluescript II KS-Vektor, welcher den murinen genomischen AP-2 γ -Lokus sowie nicht weiter definierte flankierende Sequenzen enthielt (erhalten von Pascal Dollé, IGMBC, Straßburg). Bei der folgenden Erläuterung der Klonierungsstrategie werde ich aus Gründen der Übersichtlichkeit nach der Bezeichnung der Klonierungszwischenstufen die verwendeten Restriktionsenzyme in Klammern angeben.

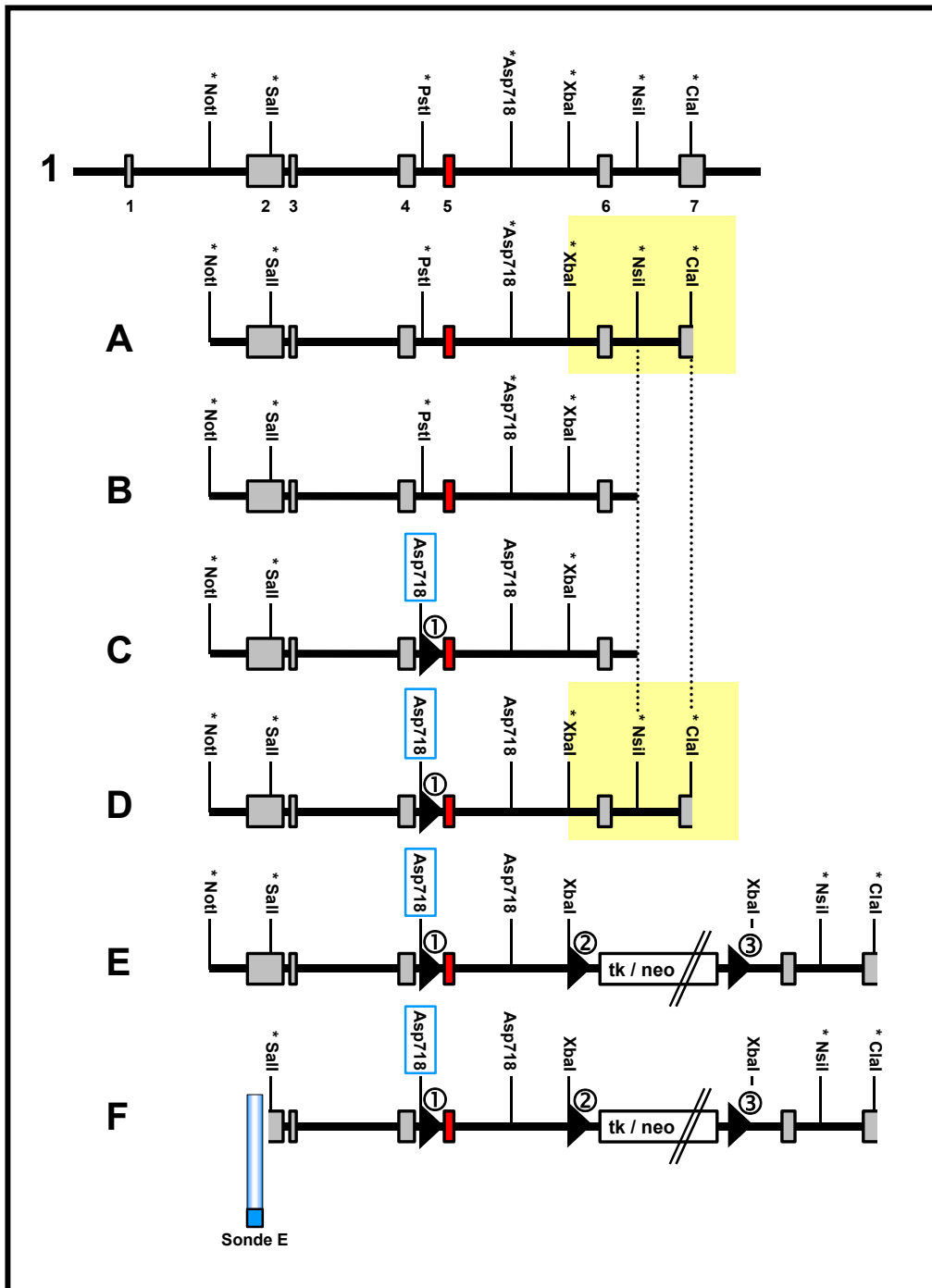


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des Targetingvektors.

Ausgehend von der genomischen Struktur des AP-2 γ -Lokus (1) sind alle Klonierungsvorstufen (A-E) des Targetingvektors bis zum fertigen Konstrukt (F) dargestellt. Alle für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Singuläre Restriktionsschnittstellen wurden mit einem Stern (*) markiert. Das funktionell essentielle Exon 5, dessen Deletion zur Geninaktivierung führen soll, ist rot unterlegt. Auf die Darstellung von Vektorsequenzen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Die Southern Blot-Sonde E wurde als blauer Balken dargestellt. Die gesamte Abbildung ist bis auf die Darstellung der loxP Sequenzen (Dreiecke ①, ②, ③) maßstabgetreu. Die Erklärung der gelb unterlegten Bereiche erfolgt ebenso wie die Erläuterung der Klonierungsstrategie im Text. Tk/neo = Selektionskassette bestehend aus dem HSV-tk- und dem pgk-neo-Gen.

Zunächst wurde das ca. 7 kb große Fragment 1 (NotI/ClaI) in pBluescript II KS (NotI/ClaI) subkloniert (Abb. 3.3 A).

A (NotI/NsiI) klonierte ich in pBluescript II KS (NotI/PstI) (Abb. 3.3 B). NsiI und PstI sind Isoschizoenzyme. Deshalb wurde durch diesen Schritt die singuläre NsiI-Schnittstelle in B deletiert. Der Verlust der NsiI Schnittstelle war essentiell, weil für die Klonierung der loxP-Sequenz ① zwischen Exon 4 und 5 in Produkt C, eine singuläre NsiI-Restriktionsschnittstelle benötigt wurde (vgl. Klonierungsschritt C).

Die loxP-Sequenz klonierte ich als Oligonukleotid (NsiI) in B (PstI) (Abb. 3.3 C). Das modifizierte Oligonukleotid (vgl. Abb. 3.4 A) bestand aus einer loxP-Sequenz, mit einer 5'-angrenzenden Asp718-Restriktionsschnittstelle. Über die NsiI-Überhänge am 5'- und 3'-Ende des Oligonukleotids, erfolgte die Klonierung in B (PstI).

Kleine Fragmente mit kompatiblen Überhängen führen bei der Ligation oft zu Mehrfachinsertionen. Der Aufbau des Oligonukleotids ermöglichte es, Plasmide mit Mehrfachinsertionen negativ zu selektieren. Solche Plasmide (vgl. Abb. 3.4 B) besitzen zwischen zwei Oligonukleotiden eine NsiI-Schnittstelle (rot) und wurden vor der Transformation in *E. coli* durch einen NsiI-Verdau linearisiert. Außerdem konnte die Orientierung der loxP-Sequenz ① im Produkt C durch die asymmetrische Asp718-Restriktionsschnittstelle bestimmt werden. Im Falle einer korrekten 5'-3'-Orientierung der loxP-Sequenz entstand durch einen Asp718-Verdau von C ein 1000 bp großes Fragment, während bei einer falschen 3'-5'-Orientierung ein um ca. 40 bp kleineres Asp718-Fragment gebildet wurde.

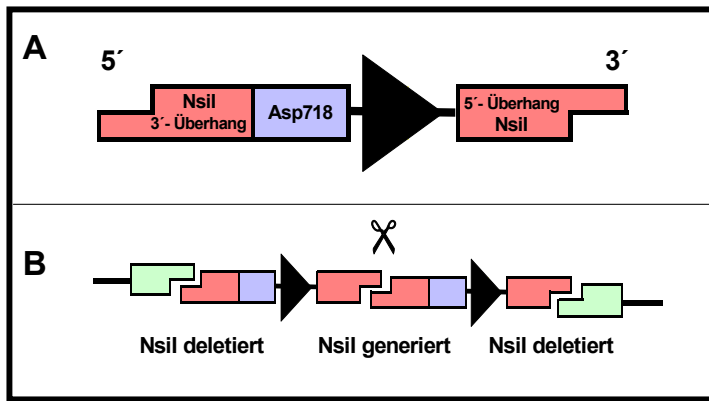


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des modifizierten Oligonukleotids mit loxP-Sequenz und Asp718-Schnittstelle.

(A) Das Oligonukleotid besteht aus einer loxP-Sequenz (Dreieck), die am 5'-Ende durch eine Asp718-Restriktionsschnittstelle begrenzt wird. Die Orientierung des Oligonukleotids kann durch die Asp718-Schnittstelle bestimmt werden. Das Oligonukleotid wird durch zwei NsiI-Schnittstellen

mit entweder 5'- oder 3'-Überhang flankiert. (B) PstI und NsiI sind Isoschizoenzyme. Die besondere Struktur des Oligonukleotids gewährt den Einbau von genau einer loxP-Sequenz in die PstI Schnittstelle (grün) des Targetingvektors. Ein NsiI-Verdau des Ligationsansatzes vor der Transformation selektiert die Plasmide mit nur einem Integrationsereignis, weil die Ligation von zwei bzw. mehreren Oligonukleotiden eine bzw. mehrere NsiI Schnittstellen generiert.

Der Klonierungsschritt D rekonstituierte die in B deletierte Sequenz zwischen der NsiI- und der ClaI-Schnittstelle (Punktlinien) (Abb. 3.3 D). C (NotI/XbaI) wurde in das gelb unterlegte Fragment A (NotI/XbaI) ligiert. Dieser Klonierungsschritt sollte die Effizienz der homologen Rekombination verbessern, indem er die 3' homologe Sequenz des Targetingvektors zum genomischen Locus vergrößerte.

Im vorletzten Schritt (Abb. 3.3 E) inserierte ich in die singuläre XbaI-Schnittstelle des Konstrukts D (XbaI) eine „geflochte“ tk/neo-Kassette, in der Weise, daß alle drei loxP-Sequenzen die gleiche Orientierung besaßen.

Der letzte Klonierungsschritt (Abb. 3.3 F) deletierte den 5'-Bereich von E (NotI/SalI) zwischen der NotI- und SalI-Schnittstelle. Somit konnten Sequenzen dieses Bereiches für eine Southern Blot-Sonde (blaues Rechteck), die außerhalb des Targetingvektors hybridisiert, verwendet werden. Der fertige Targetingvektor umfaßte ein 6 kb großes genomisches AP-2 γ -Fragment zwischen dem 3' Teil des zweiten und dem 5' Teil des siebten Exons. Das für die AP-2 γ -Funktion essentielle fünfte Exon wurde durch loxP-Sequenzen flankiert. Intron 5 enthielt eine „geflochte“ Selektionskassette, bestehend aus dem *pgk-neo* und dem *HSV-tk* Gen (tk/neo), die den Targetingvektor in einen vier kb und einen zwei kb großen Arm unterteilte, welche homolog zum Ziellokus waren.

Lineare DNS wird wesentlich effektiver homolog rekombiniert als zyklische DNS. Deshalb mußte bei der Klonierung beachtet werden, daß das zyklische Targetingvektorplasmid durch eine singuläre Restriktionsschnittstelle außerhalb der genomischen Sequenz linearisiert werden konnte. Ich verwendete dazu wahlweise die singuläre Sall- oder ClaI-Schnittstelle. Die nicht homologe Plasmidsequenz des Targetingvektors geht bei der homologen Rekombination verloren.

3.2.1 Sequenzierung des modifizierten Oligonukleotids im Targetingvektor

Die singuläre loxP-Sequenz (vgl. Abb. 3.3 ①) wurde als modifiziertes Oligonukleotid in den Targetingvektor kloniert. Die kommerzielle Oligonukleotidsynthese arbeitet firmenabhängig mit einer signifikanten Fehlerquote. Eine Bestätigung der korrekten Basenfolge war deshalb absolut erforderlich. Die Basenfolge des modifizierten Oligonukleotids wurde in Abbildung 3.5 A dargestellt und die funktionellen Einheiten farblich markiert. Wie die Autoradiographie in der Abbildung 3.5 B zeigt, wurden die Klonierungsvorstufen C-E und der Targetingvektor F im Bereich der loxP-Sequenz ansequenziert und enthalten genau ein fehlerfreies Oligonukleotid in 5'-3'-Orientierung.

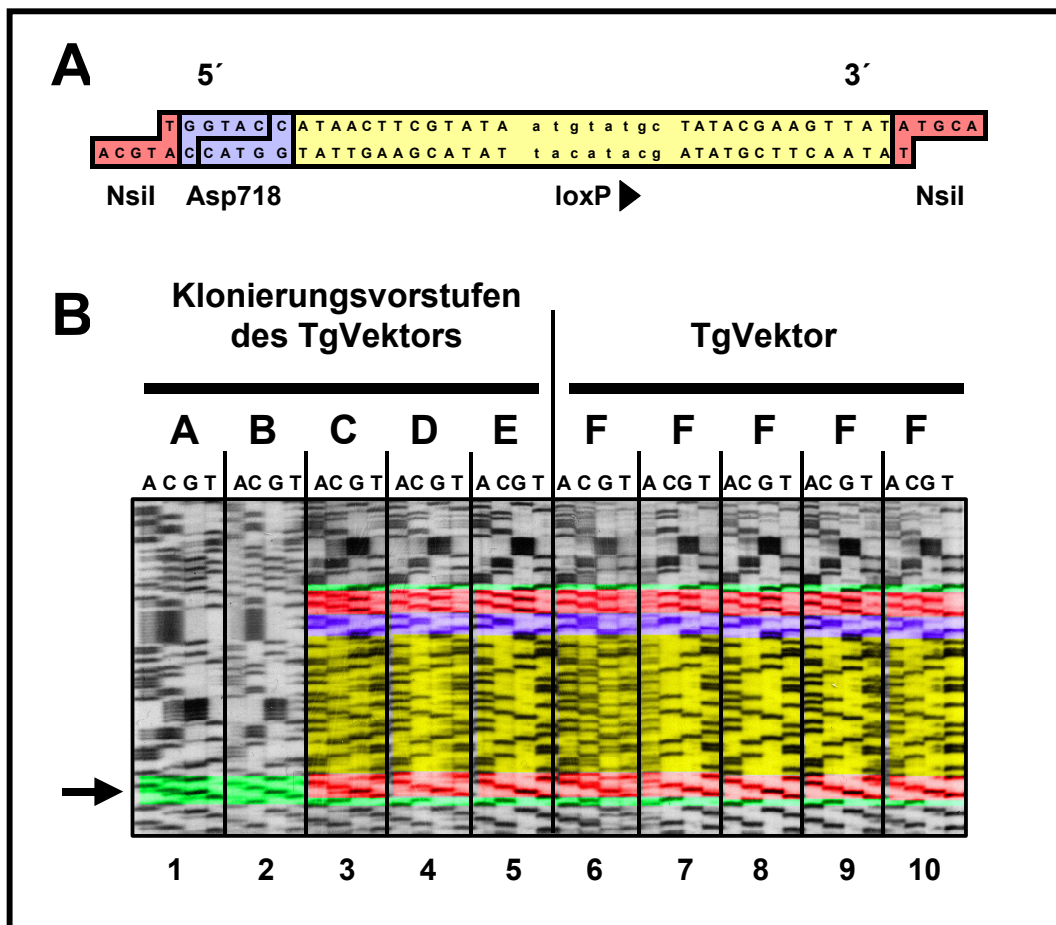


Abbildung 3.5: Autoradiographie des modifizierten Oligonukleotids.

A: Schematische Darstellung des modifizierten Oligonukleotids, mit loxP-Sequenz und einer analytischen Asp718 Restriktionsschnittstelle.

Das Oligonukleotid enthält die loxP-Erkennungssequenz (34 bp, gelb). Sie besteht aus zwei äußeren palindromischen Sequenzen aus jeweils 13 bp (Großbuchstaben) und aus einer zentralen gerichteten Sequenz aus 8 bp (Kleinbuchstaben). Die loxP-Sequenz ist 5' von einer Asp 718-Restriktionsschnittstelle (blau) begrenzt. Das Oligonukleotid wird durch zwei NsiI-Restriktionsschnittstellen (rot) mit 5'- bzw. 3'-Überhang flankiert. Über sie erfolgte die Klonierung in die grün unterlegte PstI-Schnittstelle der Klonierungsvorstufe B.

B: Sequenzanalyse des Targetingvektors und seiner Klonierungsvorstufen.

Der Targetingvektor (F, Spuren 6-10) und seine Klonierungsvorstufen (A-E, Spuren 1-5) wurden im Bereich der loxP-Sequenz (gelb) ansequenziert. Die Vorstufen A und B enthalten eine PstI-Restriktionsschnittstelle (grün, →), über die in B das korrekte Oligonukleotid mit 5'-3'-Orientierung eingeführt wurde. In den folgenden Zwischenstufen D und E sowie im fertigen Targetingvektor F traten keine Mutationen im Oligonukleotid auf. Die analytische Asp718 Schnittstelle ist blau unterlegt. Die Farben entsprechen denen im oberen Teil der Abbildung.

3.3 Homologe Rekombination des Targetingvektors in embryonalen Stammzellen

Der linearisierte Targetingvektor wurde in embryonale Stammzellen transfiziert, welche auf Fibroblastenzellen ausgesät und anschließend unter G418-Selektion kultiviert wurden. G418-Resistenz zeigen diejenigen Zellklone, welche den Targetingvektor mit dem Neomycinresistenzgen stabil in das Genom eingebaut haben. Der Einbau kann durch unspezifische Integration oder durch homologe Rekombination erfolgen. Bei der unspezifischen Integration inseriert die linearisierte DNS in eine beliebige Stelle des Genoms, bei der homologen Rekombination erfolgt ein ortsspezifischer Austausch des linearisierten Targetingvektors mit der homologen Gensequenz des Genoms. Durch eine partielle homologe Rekombination können wichtige Strukturen im 5'- und 3'-Bereich des Targetingvektors, wie z.B. eine loxP-Sequenz verloren gehen. Es mußte deshalb eine Strategie entwickelt werden, die nachweist, daß der Targetingvektor mit der loxP-Sequenz und die Resistenzkassette komplett homolog rekombiniert wurden.

3.3.1 Nachweis der homologen Rekombination mittels Southern Blot

3.3.1.1 Southern Blot-Strategien

Die homologen Rekombination wurde durch drei Southern Blots nachgewiesen, welche in Abb. 3.6 schematisch dargestellt sind. Der obere Teil der Abbildung zeigt den konditionalen Targetingvektor mit drei loxP-Sequenzen, die so angeordnet sind, daß je zwei von ihnen die Selektionskassette (tk/neo) bzw. das funktionell wichtige Exon 5 (rot unterlegt) flankieren. Der Targetingvektor verfügt 5' über ungefähr 4 kb und 3' über ungefähr 2 kb homologe Sequenzen.

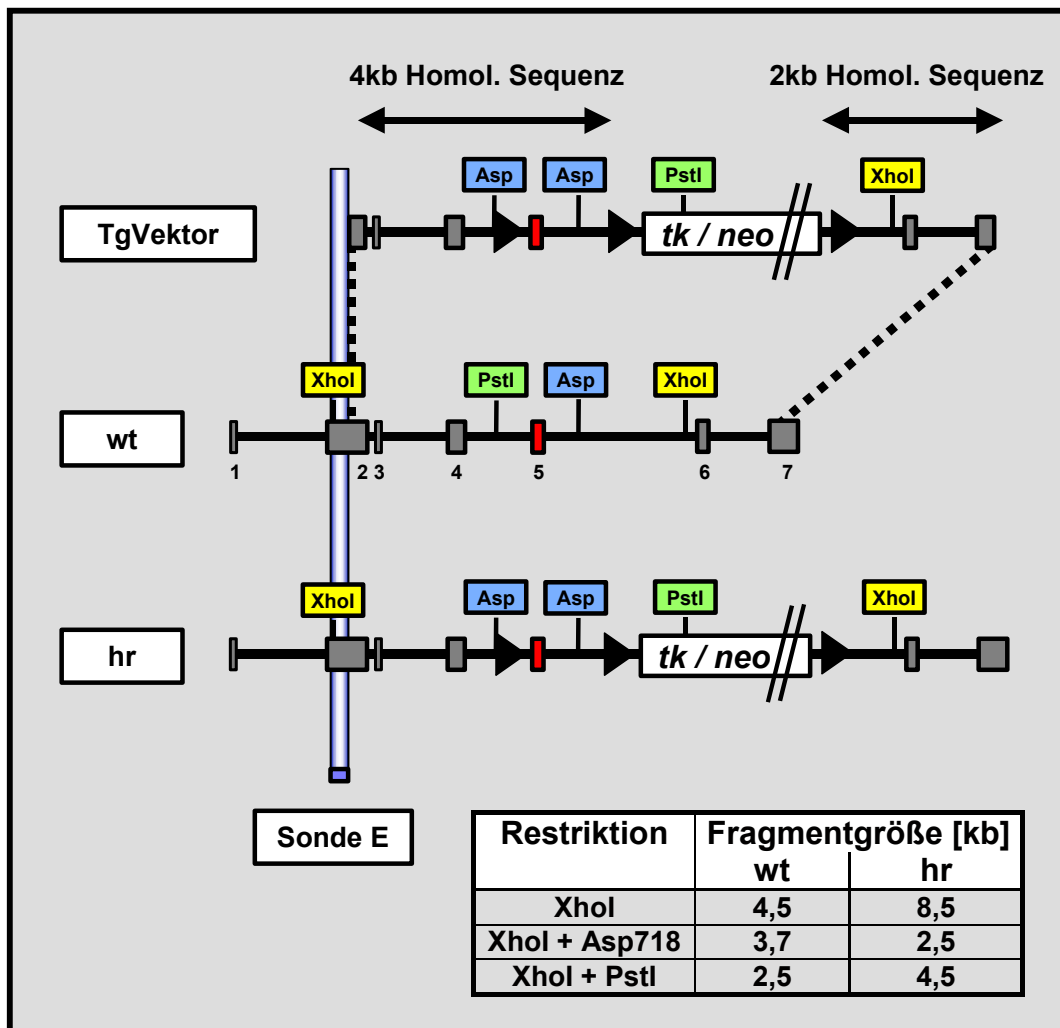


Abbildung 3.6: Nachweis der homologen Rekombination im Southern Blot.

Der Targetingvektor (TgVektor) umfaßt ein 6 kb großes genomisches AP-2 γ -Fragment zwischen dem 3' Teil des zweiten und dem 5' Teil des siebten Exons. Das für die AP-2 γ -Funktion essentielle fünfte Exon wird durch loxP-Sequenzen flankiert. Intron 5 enthält eine „geflochte“ Selektionskassette (tk/neo) bestehend aus dem *HSV-tk* und dem *pgk-neo* Gen. Der Targetingvektor besitzt 5' vier kb und 3' zwei kb homologe Sequenzen. Die homologe Rekombination mit dem Wildtypallel (wt) ist durch Strichlinien angedeutet. Die homologe Rekombination erzeugt das mutierte Allel hr. In hr wurde die ursprüngliche PstI-Restriktionssequenz des Wildtypallels durch eine Asp718 (Asp)-Schnittstelle ersetzt und über die Selektionskassette an anderer Stelle eingeführt. Beide Modifikationen dienen der Identifizierung homolog rekombinierter Klone. Dazu wurden drei Southern Blot-Analysen (XhoI-Restriktionsanalyse, sowie XhoI/Asp- und XhoI/PstI-Doppelrestriktionsanalyse) verwendet. Die Fragmentgrößen sind tabellarisch zusammengefaßt. Die Sonde ist als blaues Rechteck dargestellt und liegt außerhalb des Targetingvektors. Die relevanten Enzymschnittstellen sind eingezeichnet und farbig unterlegt.

Die durch Strichlinien angedeutete homologe Rekombination des Targetingvektors (TgVektor) in der oberen Hälfte der Abbildung 3.6 mit dem Wildtypallel (wt) im mittleren Teil der Abbildung erzeugt das homolog rekombinierte Allel (hr), das in der unteren Bildhälfte dargestellt wurde. Die

Sonde E wurde für alle drei Southern Blot Strategien verwendet und ist als blaues Rechteck eingezeichnet. Durch die Wahl der Sonde kann man die homologe Rekombination von der unspezifischen Integration des Targetingvektors unterscheiden. Der blaue Balken verdeutlicht, daß die Sonde außerhalb des Targetingvektors liegt und somit ausschließlich mit dem AP-2 γ -Gen hybridisiert.

Mit zunehmender Größe der homologen Sequenzen im Targetingvektor steigt die Wahrscheinlichkeit für eine homologe Rekombination. Gleichzeitig wird aber auch die unvollständige homologe Rekombination des Targetingvektors wahrscheinlicher. Bereiche am 5'- und 3'-Ende des Targetingvektors können dabei verloren gehen. Würden zwei kb des 5'-Endes nicht rekombinieren, so würde die 5' loxP-Sequenz verloren gehen, und das generierte Allel wäre nutzlos. Eine solche unvollständige Rekombination ist durch die XhoI-Southern Blot-Analyse nicht nachweisbar. Aus diesem Grund verwendete ich zwei Doppelrestriktionsanalysen (XhoI/PstI und XhoI/Asp718), mit denen ich die Präsenz der 5' loxP-Sequenz im Genom der ES-Klone nachweisen konnte.

Die PstI-Restriktionsschnittstelle im Wildtypallel zwischen Exon 4 und 5 wurde im mutierten Allel durch eine Asp718-Restriktionsschnittstelle ersetzt und zwischen Exon 5 und 6 eine PstI-Schnittstelle durch die Selektionskassette eingeführt.

Die Sonde E detektiert somit nach XhoI/Asp718-Doppelrestriktion im Southern Blot ein Wildtypfragment von 3,7 kb und im mutierten Allel ein kleineres Fragment von ca. 2,5 kb. Die Doppelrestriktion mit XhoI und PstI generiert im Wildtypallel ein 2,5 kb großes Fragment und im mutierten Allel ein größeres Fragment von ca. 4,5 kb. Die Fragmentgrößen der beiden Allele in Abhängigkeit von der jeweiligen Restriktion wurde in Abbildung 3.6 tabellarisch zusammengefaßt.

3.3.1.2 Nachweis der homologen Rekombination

192 G418-resistente Klone wurden isoliert. Von diesen wurden 173 Klone weiter kultiviert und mit den oben erwähnten Southern Blot-Strategien auf homologe

Rekombination überprüft. Dabei konnten zwei positive Klone, #59 und #184, identifiziert werden.

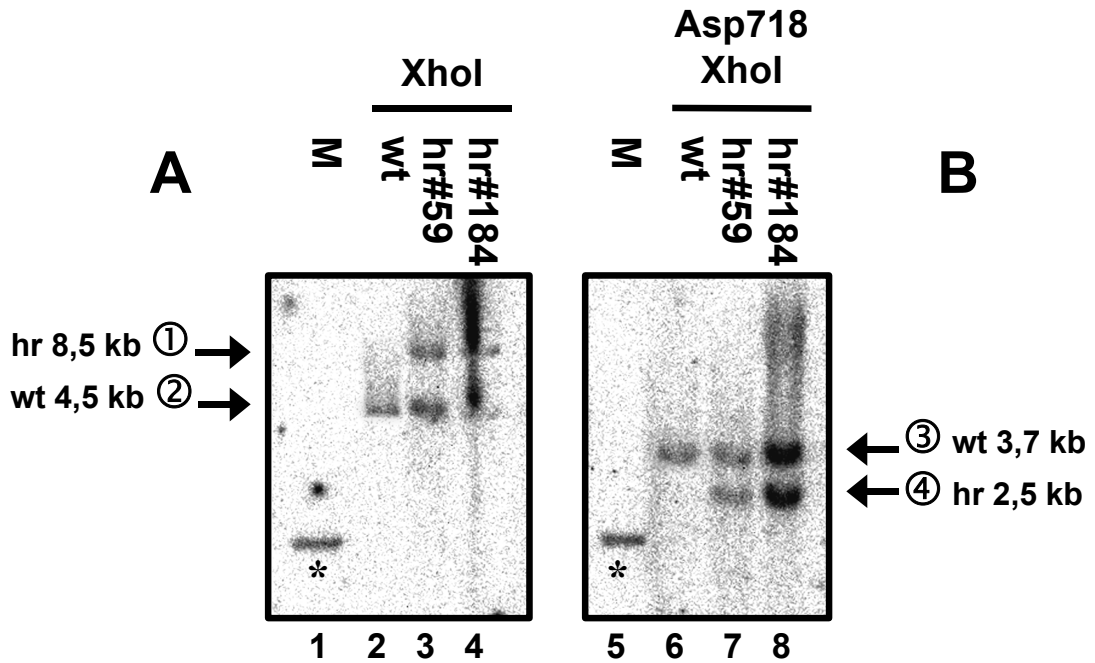
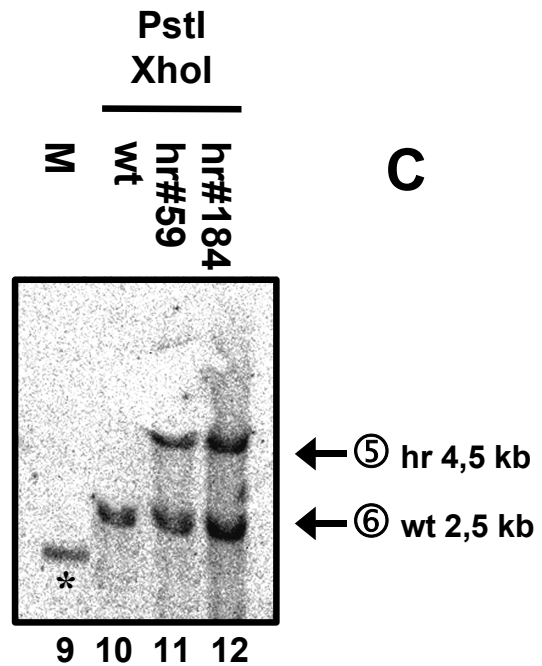


Abbildung 3.7 : Nachweis der homologen Rekombination des Targetingvektors bei den ES-Klonen hr#59 und hr#184 mittels Southern Blot.

Murine embryonale Stammzellen wurden mit dem linearisierten Targetingvektor transfiziert und unter G418-Selektion kultiviert. Bei 2 von 173 Neomycin resistenten Klonen wurde der Targetingvektor homolog in den genomischen Locus rekombiniert. Die Southern Blots zeigen die beiden positiven Klone hr#59 und hr#184 nach XhoI Restriktion (A), nach XhoI und Asp718 Doppelrestriktion (B), sowie nach XhoI und PstI Doppelrestriktion (C). In A-C wird neben der Bande des Wildtypallels (wt) die des homolog rekombinierten Allels (hr) detektiert. Die jeweiligen Größen der Restriktionsfragmente sind angegeben. Die Doppelverdau in B und C verifizieren die Mutation der PstI-Schnittstelle des Wildtypallels zu einer Asp718-Schnittstelle im mutierten Allel. Der Stern (*) kennzeichnet die 1,6 kb Bande des Markers (M).



Wie aus Abbildung 3.7 hervorgeht, detektiert die Sonde im XhoI Southern Blot (A) die beiden Allele der Wildtypzelle in Spur 2 als 4,5 kb großes Fragment (②). In die Spuren 3 bis 4 wurde genomische DNA der beiden positiven Klone

hr#59 (Spur 3) und hr#184 (Spur 4) aufgetragen. Neben dem Fragment des Wildtypallels (②) ist das Signal des homolog rekombinierten (hr) Allels (①) mit der erwarteten Fragmentgröße von 8,5 kb sichtbar. Die Differenz der Fragmentgrößen zwischen dem rekombinierten Allel und dem Wildtypallel von 4 kb ergibt sich aus der Größe des Selektionsmarkers.

Die Abbildung 3.7B zeigt den XhoI/Asp718 Southern Blot. In Spur 6 wurde die Wildtyp-ES-DNS aufgetragen und in Spur 7 und 8 die DNS der beiden positiven ES-Klone. Die Sonde erkennt das 3,7 kb große Fragment des Wildtypallels (③) in den Spuren 6 bis 8. In Spur 7 und 8 ist zusätzlich das kleinere 2,5 kb-Fragment des homolog rekombinierten Allels (④) nachweisbar.

In Blot C (Abb. 3.7) detektiert die Sonde das XhoI/PstI Fragment des Wildtypallels von 2,5 kb Größe in Spur 10, sowie bei den positiven Klonen in Spur 11 und 12 (⑥). Das XhoI/PstI-Fragment des mutierten Allels (⑤) wird in Spur 11 und 12 erwartungsgemäß als zusätzliches Signal bei 4,5 kb detektiert.

Aus den Ergebnissen der Southern Blot-Analyse ergab sich folgende Statistik für die homologe Rekombination.

3.3.2 Statistik der homologen Rekombination

Insgesamt wurden 192 G-418-resistente Klone gepickt und auf Kulturschalen ausgesät. 173 Klone wuchsen an und wurden mit drei Southern Blot Analysen auf „vollständige“ homologe Rekombination überprüft. Von diesen wurden 2 positive Klone identifiziert.

Tabelle 3.3: Rekombinationsstatistik

Gepickt	Analysiert	Homologe Rekombination
192	173	2 (1,1%)

Dies entspricht einer Rekombinationseffizienz von ungefähr 1% (Tab. 3.3). Ähnliche Werte erhielten Schorle et al. (1996) und Moser et al. (1997b) bei der Mutagenese des AP-2 α - und AP-2 β -Lokus (H. Schorle bzw. M. Moser, persönliche Mitteilung).

3.4 Die Cre-vermittelte Exzisionsreaktion erzeugt das Knockout- und das konditionale Knockoutallel

3.4.1 Southern Blot-Strategie zum Nachweis des konditionalen Allels und des Knockout-Allels

Durch die homologe Rekombination des Targetingvektors mit dem Wildtypallel (Abb. 3.8 oberer Teil) wird die Selektionskassette in das Wildtypgenom eingeführt. Weil das *tk*-Gen der tk/neo-Selektionskassette mit der Keimbahntransmission der mutierten ES-Zellen inkompatibel ist, wurde *in vitro* die Selektionskassette aus dem Genom der manipulierten ES-Zellen durch transiente Transfektion eines Cre-Expressionsplasmids entfernt. Dabei wird eine „geflochte“ Gensequenz durch ortsspezifische Rekombination zweier loxP-Sequenzen deletiert. Wenn, wie im homolog rekombinierten Allel (Abb. 3.8 C), mehr als zwei loxP-Sequenzen vorhanden sind, so resultieren mehrere mögliche Rekombinationsprodukte. Von C leiten sich die Deletionsprodukte C1 bis C3 im mittleren und unteren Teil der Abbildung 3.8 ab. Die homologe Rekombination der loxP-Sequenzen ① und ② generiert durch Deletion des grün unterlegten Genabschnitts das Produkt C1. Wird die Selektionskassette durch homologe Rekombination der loxP-Sequenzen ② und ③ deletiert, so entsteht das konditionale Allel C2. Das Knockoutallel C3 wird durch Deletion der gesamten Gensequenz zwischen loxP ① und ③ gebildet. Abhängig von der Transfektionseffizienz wird ein gewisser Prozentsatz der ES-Klone kein Cre-Enzym exprimieren und ein unverändertes homolog rekombiniertes Allel C besitzen.

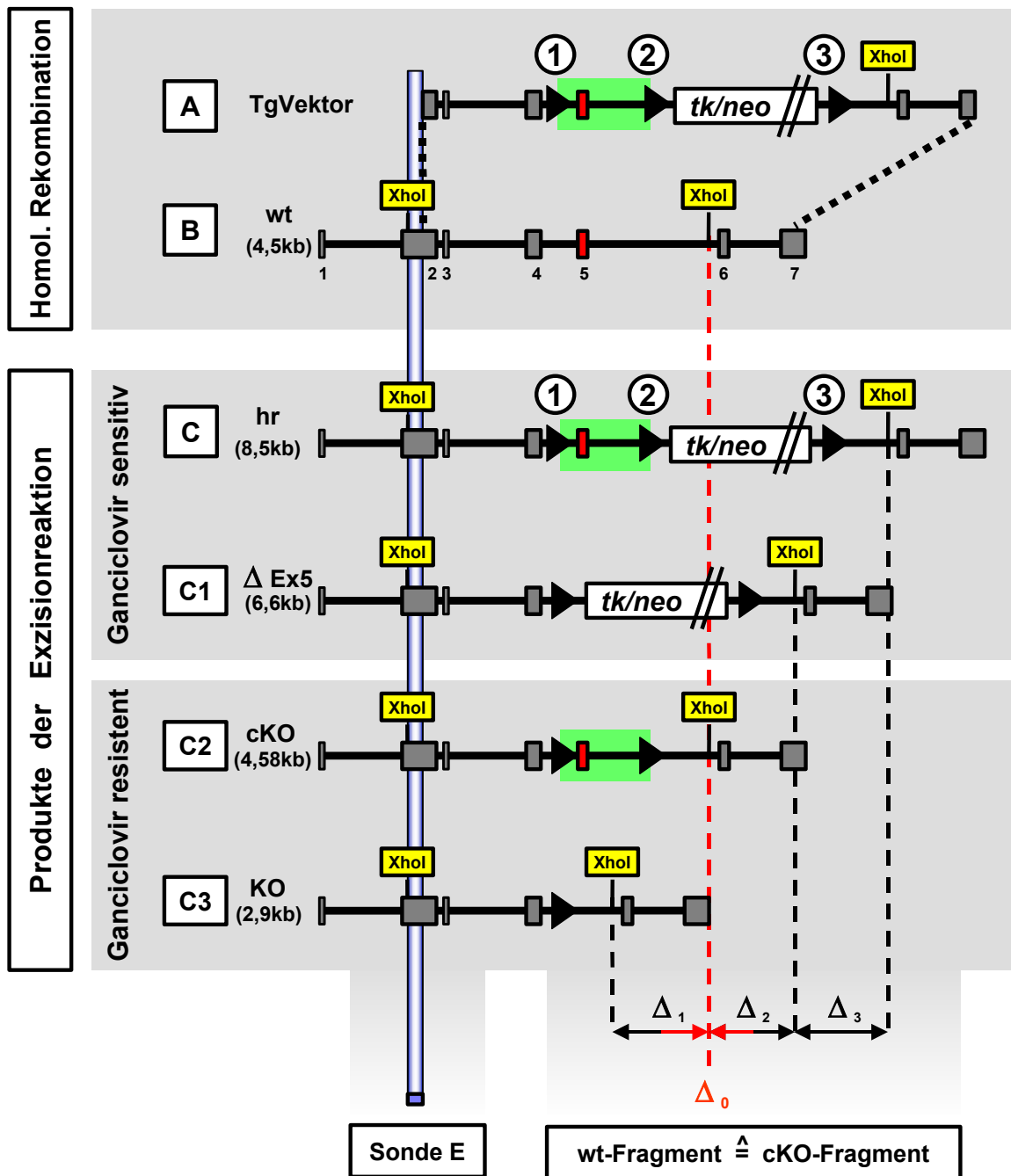


Abbildung 3.8: Nachweis der Exzisionsprodukte im Southern Blot.

Oberer Teil: Homologe Rekombination des Targetingvektors (A) in den genomischen AP-2 γ -Lokus (B). Mittlerer und unterer Teil: Produkte der Cre-vermittelten Exzisionsreaktion (C-C3). Mittlerer Teil: Ganciclovir sensitive Produkte (C, C1). Unterer Teil: Ganciclovir resistente Produkte (C2, C3).

Die Cre-vermittelte Exzisionsreaktion deletiert eine „geflochte“ Gensequenz durch ortsspezifische Rekombination zweier loxP-Sequenzen (①, ② und ③). Sind, wie in C, drei oder mehr loxP-Sequenzen vorhanden, erfolgt deren Rekombination statistisch (①+②, ②+③ bzw. ①+③). Von C leiten sich die drei Produkte C1, C2 und C3 ab. ES-Klone mit den Allelen C oder C1 enthalten die Selektionskassette und werden durch Ganciclovir negativ selektiert. Der Nachweis der Allele C2 und C3 (sowie C und C1 bei

unvollständiger Negativselektion) erfolgt über die Größenunterschiede ihrer XhoI-Restriktionsfragmente (Δ_1 , Δ_2 , Δ_3) im Southern Blot. Die Fragmentgrößen sind in B (4,5 kb) und in C2 (4,58 kb) fast identisch. Die Differenz beträgt aufgrund der beiden loxP-Sequenzen in C2 ca. 80 bp. Deshalb ist das Wildtypallel B und das konditionale Knockoutallel C2 im Southern Blot nicht zu unterscheiden (Δ_0 , rote Strichlinie). Die XhoI-Restriktionsschnittstellen sind gelb unterlegt, die „geflochte“ genomische Sequenz grün und Exon 5 rot. Die Größe des jeweiligen XhoI Fragmentes ist in Klammern angegeben. Die Sonde E ist als blaues Rechteck dargestellt. cKO = konditionales Knockoutallel, hr = homolog rekombiniertes Allel, KO = Knockoutallel, wt = Wildtypallel, TgVektor = Targetingvektor, $\Delta Ex5$ = Exzisionsprodukt mit Exon 5-Deletion

Es mußte folglich eine Nachweismethode entwickelt werden, um die vier Allele C bis C3 zu unterscheiden. Bei C und C1 wurde die Selektionskassette nicht deletiert. ES-Klone mit diesen Genotypen sind Ganciclovir-sensitiv und sterben im Selektionsmedium ab (mittlerer Teil der Abbildung 3.8). Die ES-Klone mit dem konditionalen (cKO) und dem kompletten (KO) Knockoutallel C2 bzw. C3 werden angereichert und können durch eine XhoI-Restriktionsanalyse im Southern Blot mit Sonde E genotypisiert werden. Das XhoI-Fragment des Knockoutallels ist kleiner als das XhoI-Fragment des konditionalen Allels. Die Differenz $\Delta 1$ beträgt ca. 1,6 kb. Das XhoI-Fragment des Wildtypallels B besitzt fast die gleiche Größe wie das konditionale Allel C2. Die Differenz $\Delta 0$ (rote Strichlinie) beträgt aufgrund der beiden loxP-Sequenzen in C2 lediglich 80 bp. Dieser Größenunterschied kann bei einer Fragmentgröße von ca. 4,5 kb im Southern Blot nicht mehr aufgelöst werden. Konditionale ES-Klone und Wildtyp-ES-Klone sind so nicht unterscheidbar.

3.4.2 Nachweis des konditionalen Allels und des Knockoutallels

Die beiden homolog rekombinierten ES-Klone hr#59 und hr#184 wurden transient mit einem Cre-Expressionsplasmid transfiziert. Es wurden insgesamt 111 Klone gepickt. Die Abbildung 3.9 zeigt die XhoI-Southern Blot-Analysen nach Cre-vermittelter Exzisionsreaktion der homolog rekombinierten Klone hr#59 (A) und hr#184 (B). Der rote Rahmen markiert die parentalen Klone hr#59 in Spur 3 bzw. hr#184 in Spur 8 vor der Exzisionsreaktion und der rote Pfeil jeweils drei der Ganciclovir-resistenten Derivate des entsprechenden Klons nach der Cre-vermittelten Exzisionsreaktion (Spur 4 bis 6 bzw. Spur 10 bis 12).

In Spur 2 und 7 wurde Wildtyp-ES-DNS als Kontrolle mit geführt. Das Wildtypfragment ② in Spur 2 und 7 entspricht der erwarteten Größe von 4,5 kb. Die beiden Ausgangsklone in Spur 3 und 8, zeigen das bereits bekannte Bandenmuster (vgl. Abb. 3.9 A) des Wildtypallels ② bei 4,5 kb und des homolog rekombinierten Allels ① bei 8,5 kb. Die Ganciclovir-resistenten Derivate in Spur 4 bis 6 bzw. 10 bis 12 besitzen entweder das konditionale Allel (cKO#644 in Spur 4 und cKO#901 in Spur 12) oder das Knockoutallel (KO#627 in Spur 5, KO#637 in Spur 6 sowie KO#910 in Spur 10 und KO#904 in Spur 11).

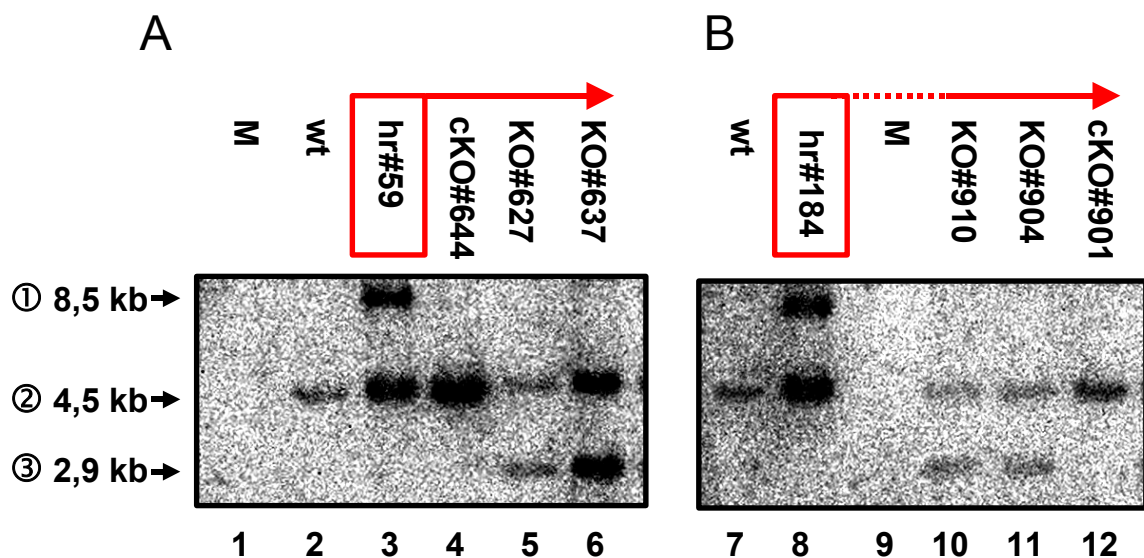


Abbildung 3.9: Die Cre vermittelte Exzisionsreaktion generierte aus dem homolog rekombinierten Allel der Klone hr#59 und hr#184 das Knockout-Allel und das konditionale Knockout-Allel.

Die homolog rekombinierten ES-Klone hr#59 und hr#184 wurden mit einem Cre-Expressionsplasmid transient transfiziert und unter Ganciclovir-Selektion kultiviert. Die XhoI-Southern Blots (A bzw. B) zeigen die homolog rekombinierten Ursprungsklone (roter Kasten) hr#59 (Spur 3) bzw. hr#184 (Spur 8) und exemplarisch jeweils drei ihrer Ganciclovir resistenten Derivate (roter Pfeil). Die Knockout-Klone KO#627 und KO#637 (Spur 5 und 6) bzw. KO#910 und KO#904 (Spur 10 und 11) haben die Selektionskassette sowie Exon 5 verloren und zeigen neben der 4,5 kb Bande des Wildtyp-Allels (②) zusätzlich die 2,9 kb Knockout-Bande (③). In den konditionalen Knockout-Klonen cKO#644 und cKO#901 (Spur 4 bzw. 12) wurde ausschließlich die Selektionskassette deletiert, Exon 5 ist vorhanden. Die Fragmentgrößen des Wildtyp-Allels und des konditionalen Knockout-Allels sind deshalb nahezu identisch (4,5 bzw. 4,58 kb) und werden im Southern Blot als singuläres Signal (②) bei ca. 4,5 kb detektiert. M= Marker, wt= Wildtyp ES-DNS

Die Größenunterschiede zwischen dem konditionalen XhoI-Fragment und dem Wildtypfragment wird im Southern Blot nicht aufgelöst und die Sonde detektiert

in Spur 4 und 12 ein singuläres Signal ② von ca. 4,5 kb. Deletiert die Cre-Rekombinase zusätzlich zur Selektionskassette das Exon 5, so entsteht das Knockoutallel. Das XhoI-Fragment des Knockoutallels ist 1,6 kb kleiner als das Wildtypfragment und wird im Southern Blot als 2,9 kb große Bande ③ in Spur 5 und 6 bzw. 10 und 11 detektiert.

3.4.3 Statistik der Cre-vermittelten Exzisionsreaktion

Von 111 analysierten Klonen waren 50% Ganciclovir-sensitiv und 50% Ganciclovir-resistent (Abb. 3.10). 44% der resistenten Klone besaßen das Knockoutallel (Abb. 3.10, dunkelblauer Sektor) und bei 6% der Klone wurde das konditionale Allel nachgewiesen (Abb. 3.10, hellblauer Sektor).

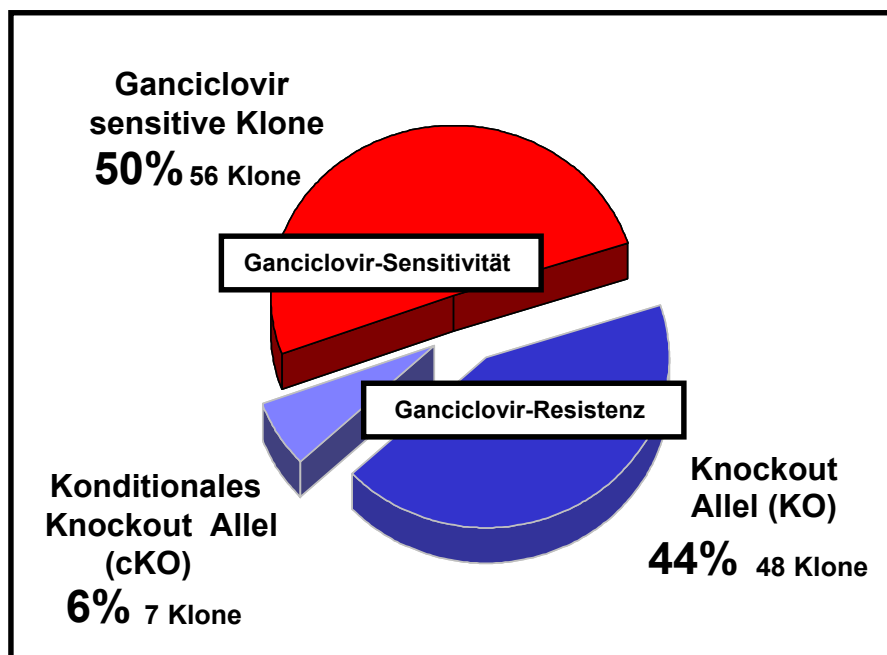


Abbildung 3.10: Die Cre vermittelte Exzisionsreaktion erzeugt zu 44% das Knockoutallel und zu 6% das konditionale Knockoutallel.

Das Diagramm zeigt eine Gleichverteilung Ganciclovir-sensitiver (rot) und Ganciclovir-resistenter Klone (blau). Die 55 resistenten Klone haben die Selektionskassette verloren. 48 von ihnen besitzen das Knockoutallel (KO, dunkelblau) und 7 das konditionale Knockoutallel (cKO, hellblau), was 44% bzw. 6% der analysierten Klone entspricht.

Bei den 56 Ganciclovir-sensitiven Klonen wurde die Selektionskassette nicht deletiert. Sie besaßen entweder das Allel C oder C1 (vgl. Abbildung 3.8) und

wurden nicht genauer analysiert. Insgesamt standen 7 konditionale und 48 Knockout ES-Klone für die Blastozysteninjektion zu Verfügung.

3.4.4 Etablierung einer „Drei-Primer-PCR“

Ich entwickelte eine „Drei-Primer-PCR“, mit der das Wildtyp-, das Knockout- und das konditionale Knockoutallel in einem Reaktionsansatz nachweisbar sind, weil die PCR später a) zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des konditionalen Allels und b) zur Genotypisierung der Mauslinien verwendet werden sollte.

Die „Drei-Primer-PCR“ ist in Abbildung 3.11 schematisch dargestellt. Die beiden „upstream“-Primer Ex5up (rot) und Ex6up (blau) und der „downstream“-Primer In4dn (grün) binden an die homologen Sequenzen des Wildtypallels im oberen Teil der Abbildung 3.11.

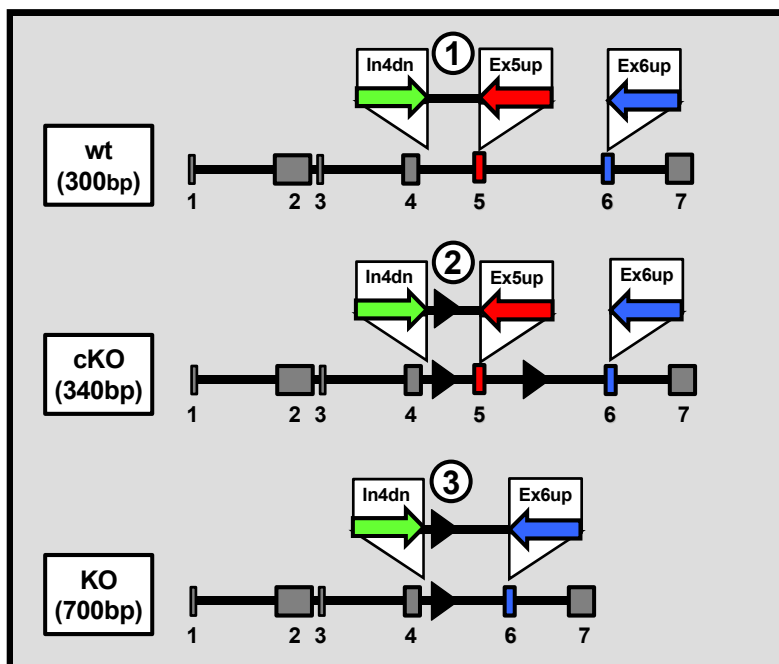


Abbildung: 3.11 Schematische Darstellung der „Drei-Primer-PCR“.

Die „Drei-Primer-PCR“ diskriminiert das Wildtypallel (wt), das Knockout- (KO) und das konditionale Knockoutallel (cKO) in einem Reaktionsansatz und kann deshalb auch zur späteren Genotypisierung von AP-2 γ ^{cKO/KO}-Mauslinien herangezogen werden. Die beiden 3'-Primer Ex5up bzw. Ex6up (roter bzw. blauer Pfeil) und der 5'-Primer In4dn (grüner Pfeil) amplifizieren unter geeigneten Reaktionsbedingungen aus dem entsprechenden Allel jeweils nur ein Fragment

charakteristischer Größe. Der Primer In4dn bindet in Intron 4 in „downstream“ Richtung und die Primer Ex5up bzw. Ex6up entsprechend in Exon 5 bzw. in Exon 6 in „upstream“ Richtung. Die Reaktionsbedingungen ermöglichen ausschließlich die Amplifizierung von Fragmenten kleiner 0,9 kb. Im Wildtypallel binden alle drei Primer und amplifizieren das 300 bp Fragment ①. Das Produkt der Primer In4dn und Ex6up ist zu groß und wird nicht gebildet. Analog entsteht im cKO-Allel aufgrund der loxP-Sequenz ein um 40 bp größeres Fragment ②. Im Knockoutallel kann Primer Ex5up nicht binden, weil das Exon 5 und flankierende Intronsequenzen deletiert wurden. Dadurch verringert sich die Distanz zwischen In4dn und Ex6up auf 700 bp, und Fragment ③ wird amplifiziert.

In4dn amplifiziert mit Ex5up ein 300 bp großes Produkt ①. Die Reaktionsbedingungen wurden so gewählt, daß große Produkte (>0,9 kb) nicht amplifiziert werden können. Deshalb wird das Produkt zwischen In4dn und Ex6up nicht gebildet. Im konditionalen Allel, das im mittleren Teil der Abbildung dargestellt wurde, amplifizieren die Primer In4dn und Ex5up das 340 bp Fragment ②. Der untere Teil der Abbildung zeigt das Knockoutallel, dem das Exon 5 fehlt, weshalb der Primer Ex5up nicht binden kann. Durch den Verlust von Exon 5 und der flankierenden Intronsequenzen zwischen den loxP-Sequenzen verringert sich die Distanz zwischen den Primern In4dn und Ex6up und das 700 bp Fragment ③ kann amplifiziert werden. Die kleinen (ca. 300 bp) Fragmente ① und ② besitzen einen Größenunterschied von 40 bp und lassen sich in einem 2 % Agarosegel deutlich auftrennen. Somit kann die „Drei-Primer-PCR“ jede mögliche Allelenkombination eindeutig identifizieren.

3.4.5 Überprüfung der Funktionsfähigkeit des konditionalen Allels

Bevor transgene Mäuse generiert wurden, sollte überprüft werden, ob aus dem konditionalen Allel tatsächlich das Knockoutallel erzeugt werden kann. Diese Frage wird durch die bloße Existenz des KO-Allels, wie sie durch die XhoI-Southern Blot-Analyse in Abbildung 3.9 nachgewiesen wurde, nicht beantwortet, denn das Knockoutallel kann auf zwei unterschiedlichen Wegen aus dem homolog rekombinierten Allel generiert werden. Erstens über einen indirekten Weg mit dem konditionalen Allel als Zwischenprodukt. Das entspräche einer *in vitro* Simulation des Vorgangs wie er später *in vivo* durch das Einkreuzen einer Cre-Maus ablaufen würde und wäre ein Nachweis der Funktionsfähigkeit des konditionalen Allels. Zweitens kann das Knockoutallel direkt aus dem homolog rekombinierten Allel (vgl. Abb. 3.8 C) durch die Rekombination der beiden äußeren loxP-Sequenzen (vgl. Abb. 3.8 ①+③) entstanden sein. In diesem Fall könnten keine Aussagen über die Funktionsfähigkeit des konditionalen Allels gemacht werden. Deshalb transfizierte ich konditionale ES-Klone mit dem Cre-Expressionsvektor, um aus ihnen Knockout-Klone zu erzeugen und dadurch die

Funktionsfähigkeit des Cre-loxP-Systems im konditionalen Allel eindeutig zu beweisen.

3.4.5.1 Nachweis der Funktionsfähigkeit des Cre/loxP-Systems im konditionalen Allel

Es sollte überprüft werden, ob aus embryonalen Stammzellen mit dem konditionalen Knockoutallel durch transiente Cre-Expression das Knockoutallel erzeugt werden kann.

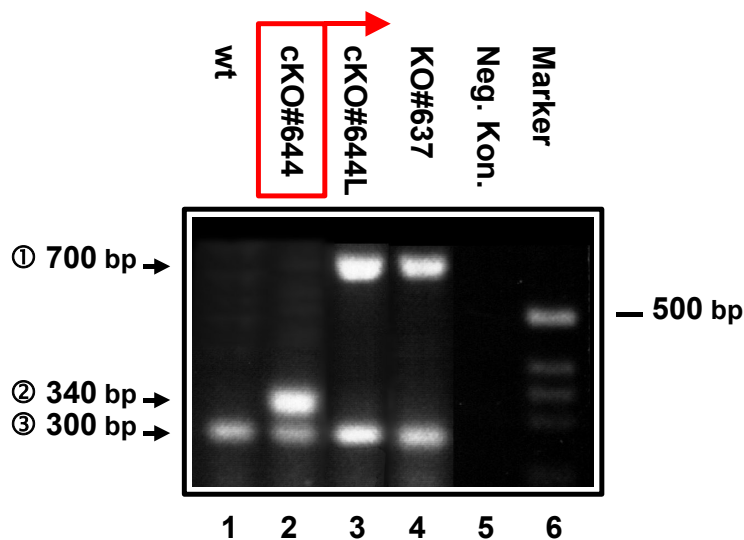


Abbildung 3.12: Die transiente Cre-Expression erzeugt *in vitro* aus dem konditionalen Knockoutallel das Nullallel.

Die Reaktionsparameter der „Drei-Primer-PCR“ wurde mit DNS aus embryonalen Stammzellen etabliert. Das Agarosegelfoto zeigt die PCR-Produkte eines Wildtypklons (wt, Spur 1), des konditionalen Knockout Klons cKO#644 vor (roter Rahmen, Spur 2) und nach transienter Cre-Expression (cKO#644L, roter Pfeil, Spur 3), sowie des Knockout Klons KO#637 (Spur 4). In Spur 5

wurde ein Reaktionsansatz ohne Matrize als Negativkontrolle (Neg.Kon.) aufgetragen. Spur 6 enthält einen DNS-Marker. Die 300 bp Bande ③ des Wildtypallels (Spur 1) ist in allen Klonen (Spur 1-4) nachweisbar. Klon cKO#644 in Spur 2 zeigt zusätzlich die 340 bp Bande ② des konditionalen Knockoutallels. Die Cre vermittelte Exzisionsreaktion erzeugte aus dem konditionalen Knockoutallel das Nullallel (cKO#644L). Die PCR identifiziert das Nullallel als 700 bp Fragment ① (Spur 3). Es entspricht dem Fragment des Knockout Klons KO#637 in Spur 4. Die H₂O Kontrolle ist negativ.

Ich wollte damit den Exzisionsprozeß, wie er sich später in der Maus abspielen wird, *in vitro* simulieren und die Funktionsfähigkeit des Cre-loxP-Systems überprüfen. Der Nachweis erfolgte durch die „Drei-Primer-PCR.“ In Spur 2 wurden die PCR-Produkte des konditionalen Knockout-Klons cKO#644 vor der transienten Cre-Expression (Abb. 3.12, roter Rahmen) geladen. Wie erwartet, zeigt das Gelfoto eine Doppelbande im Bereich von 300 bp. Das größere 340 bp Fragment ② entspricht dem konditionalen Knockoutallel, das kleinere Fragment ③ dem Wildtypallel. Es besitzt die gleiche Größe wie das Fragment in Spur 1,

welches aus Wildtyp ES-DNS amplifiziert wurde. Das Wildtypsignal ist in den Spuren 1 bis 4 nachweisbar. Der Klon cKO#644L (L= „loop out“) in Spur 3 (roter Pfeil) ist ein Derivat von cKO#644 nach transienter Cre Transfektion. Offensichtlich wurde das Exon 5 deletiert, so daß sich der Abstand zwischen Exon 6 und Exon 4 so weit verringerte, daß die beiden Primer In4dn und Ex6up das Produkt ① von 700 bp Größe amplifizierten. Die Fragmentgrößen entsprechen dem Knockoutklon KO#637, welcher in Spur 4 als Kontrolle geladen wurde. Von insgesamt 22 genotypisierten Derivaten konnte ich bei 21 (95%) das Knockoutallel nachweisen, bei nur einem Klon blieb das konditionale Allel erhalten (Daten nicht gezeigt).

Die Effektivität der Exzisionsreaktion lag bei fast 100%. Die Transfektionseffizienz wurde nicht bestimmt, lag aber mit Sicherheit unter 100% und ist deshalb die plausibelste Erklärung dafür, daß bei einem Klon das Exon 5 nicht deletiert wurde. Die Funktionsfähigkeit des Cre/loxP-Systems im konditionalen Allel des ES-Klons cKO#644 war damit eindeutig bewiesen.

3.5 Erzeugung einer AP-2 γ -Knockout-Mauslinie und einer konditionalen AP-2 γ -Knockout-Mauslinie

Der konditionale ES-Klon cKO#644 und der Knockout-Klon KO#637 wurden in Blastozysten injiziert und diese in die Uteri scheinchwangerer Ammenmäuse transferiert. Es konnten vier männliche chimäre Tiere mit dem Knockoutallel und drei männliche Chimäre mit dem konditionalen Allel erzeugt werden (vgl. Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: Erzeugung männlicher Chimären aus den ES-Klonen cKO#644 und KO#637

ES-Klon	Männliche Chimäre	Geschätzte Chimarität in %	Keimbahntransmission
	A	40	keine
	B (steril)	90	/
KO#637	C	80-90	100%
	D (†)	50	keine
	1	40	keine
cKO#644	2	80	100%
	3	50	keine

Die chimären Mäuse sind Zellmosaik aus zwei verschiedenen Mausstämmen mit unterschiedlicher Fellfarbe. Die manipulierten ES-Zellklone sind homozygot für das dominante *agouti*-Gen für braune Fellfarbe, und die Empfängerblastozyste ist homozygot für das rezessive Gen für schwarzes Fell. Der Grad der Chimarität ist deshalb ein Maß für den Anteil manipulierter ES-Zellen am Gesamtorganismus und wurde anhand der Fellfarbe geschätzt. Bei den generierten Tieren variierte die Chimarität zwischen 40-80%. Je höher der Anteil der ES-Zellen an einem Organismus ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß seine Keimzellen von ES-Zellen abstammen und die eingeführte Mutation an die Nachkommen weitergegeben wird. Extrem hochgradig chimäre Tiere sind jedoch oft steril (z.B. Tier B in Tab. 3.4). Chimäre Mäuse werden nicht so alt wie der jeweilige Wildtyp. Sie erreichen ein Alter von ungefähr einem Jahr oder sterben frühzeitig aufgrund organischer Defekte wie z.B. Chimäre D (Alter: 2

Monate). Die männlichen Chimären wurden mit schwarzen C57Bl/6 Wildtyp-Weibchen verpaart. Gibt die Chimäre die Erbinformation der manipulierten ES-Zellen an seine Nachkommen weiter, so entstehen braune Tiere, die entweder das mutierte Allel oder das Wildtypallel tragen und deshalb mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% heterozygot für das Transgen sind.

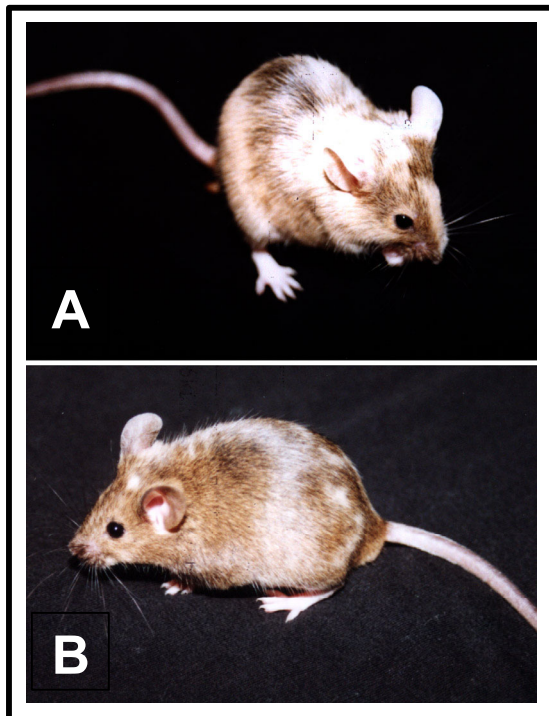


Abbildung 3.13: AP-2 γ -Chimäre.

A: AP-2 γ Knockout-Chimäre mit einem Chimäritätsgrad von 80-90%.

B: Konditionale AP-2 γ Knockout-Chimäre mit ca. 80% Chimärität

Aus dem Knockout-ES-Klon KO#637 und dem konditionalen ES-Klon cKO#644 konnte jeweils ein Keimbahntransmitter (Tab. 3.4, C bzw. 2, gelb unterlegt) mit 80-90% bzw. 80% geschätzter Chimärität generiert werden (vgl. Tab. 3.4). Jedes der beiden Tiere zeugte zu 100% braune Nachkommen. Die heterozygoten Nachkommen der Nullmutante wurden miteinander verpaart, um homozygote Tiere mit dem defekten Allel zu erzeugen. Die Analyse des Knockout-Phänotyps wird im folgenden Kapitel dieser Arbeit beschrieben.

Die konditionale Knockout-Mauslinie wurde in zwei verschiedene Cre-Mauslinien eingekreuzt, um die gewebespezifischen Defektmutanten zu generieren (s. 3.8.2).

3.6 Analyse der AP-2 γ -Knockout-Maus

3.6.1 Erhöhte Letalität der heterozygoten Knockout-Tiere am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung

Die heterozygoten Knockout-Mäuse (AP-2 $\gamma^{wt/KO}$) wurden mit C57Bl6-Wildtypmäusen (AP-2 $\gamma^{wt/wt}$) verpaart und die Nachkommen mittels der in Abbildung 3.11 beschriebenen „Drei Primer PCR“ genotypisiert. Nach Mendel erwartet man in der F1-Generation eine Gleichverteilung der heterozygoten und Wildtyp-Tiere. Die heterozygoten Mäuse sind mit 38% (Tab. 3.5) unterrepräsentiert.

Tabelle 3.5: Genotypen von AP-2 $\gamma^{wt/KO}$ X AP-2 $\gamma^{wt/wt}$ -Verpaarungen

Summe	wt	het
180	111	69
100%	62%	38%

Neugeborene AP-2 $\gamma^{wt/KO}$ -Tiere zeigen keine Mißbildungen, sind aber oft in den ersten Entwicklungswochen unabhängig vom Geschlecht leicht wachstumsretardiert (Daten nicht gezeigt). Die adulten Tiere hingegen unterscheiden sich nicht mehr von ihren Wildtyp-Geschwistern. Die verminderte Geburtenrate der heterozygoten Tiere läßt auf eine erhöhte embryonale Letalität schließen. Ein Grund hierfür könnte sein, daß die Gendosis des Wildtypallels den Defekt bei ca. 12% der heterozygoten Embryonen nicht kompensieren kann und die Tiere deshalb sterben.

3.6.2 Resorption der homozygoten Nullmutante am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung

Ich analysierte die Embryonen aus einer $AP-2\gamma^{wt/KO} \times AP-2\gamma^{wt/KO}$ -Verpaarungen während der frühen Embryonalentwicklung am Tag 9,5. Nach Mendel würde man zu 25% Wildtyp-Mäuse, zu 50% heterozygote Tiere und zu 25% Knockout-Embryonen erwarten. Tatsächlich war dieses Verhältnis zu Gunsten der Wildtyp-Tiere (39%) verschoben. Nur 39% der untersuchten Mäuse waren heterozygot, und bei nur 11% handelte es sich um Knockout-Tiere (Tab. 3.6, gelb unterlegt).

Tabelle 3.6: Genotypen einer $AP-2\gamma^{wt/KO} \times AP-2\gamma^{wt/KO}$ -Verpaarung an Tag 9,5 der Embryonalentwicklung

Summe	wt	het	KO	n. g.
18	7	7 (2R)	2 (2R)	2 (2R)
100%	39%	39%	11 %	11%

Die Anzahl der Resorptionen (R) wurde in Klammern angegeben.

Bei den heterozygoten und den Knockout-Tieren beobachtete ich eine auffällig hohe Resorptionsrate. Die Anzahl der resorbierten Embryonen wurde in Tabelle 3.6 hochgestellt und in Klammern angegeben. Alle Nullmutanten und ca. 1/3 der heterozygoten Tiere waren resorbiert. Zwei weitere Resorptionen konnten nicht genotypisiert werden. Der Stichprobenumfang von 18 Tieren ist zwar relativ gering, die gewonnenen Daten zeigen aber, daß die $AP-2\gamma$ -defizienten Tiere und ein Teil der heterozygoten Mäuse bereits vor Tag 9,5 der Embryonalentwicklung absterben.

3.6.3 Retardiertes Wachstum und Gastrulationsdefekt der AP-2 γ -Nullmutante am Tag 8,0 der Embryonalentwicklung

AP-2 γ -defiziente Embryonen (vgl. Abb. 3.14, links) sind am Tag 8 der Embryonalentwicklung stark im Wachstum retardiert. Ihr Körpervolumen beträgt ca. 1/50 des Volumens der gleichaltrigen wt-Geschwister (vgl. Abb. 3.14, rechts). Einer der wichtigsten entwicklungsbiologischen Prozesse zu diesem Zeitpunkt der Embryogenese ist die Gastrulation, welche die Mesodermbildung einleitet. *In situ*-Analysen im Totalpräparat mit einer Sonde für den mesodermalen Marker *Brachyury*, der im Primitivstreifen exprimiert wird, zeigen, daß im AP-2 γ -Knockout die Mesodermbildung gestört ist.

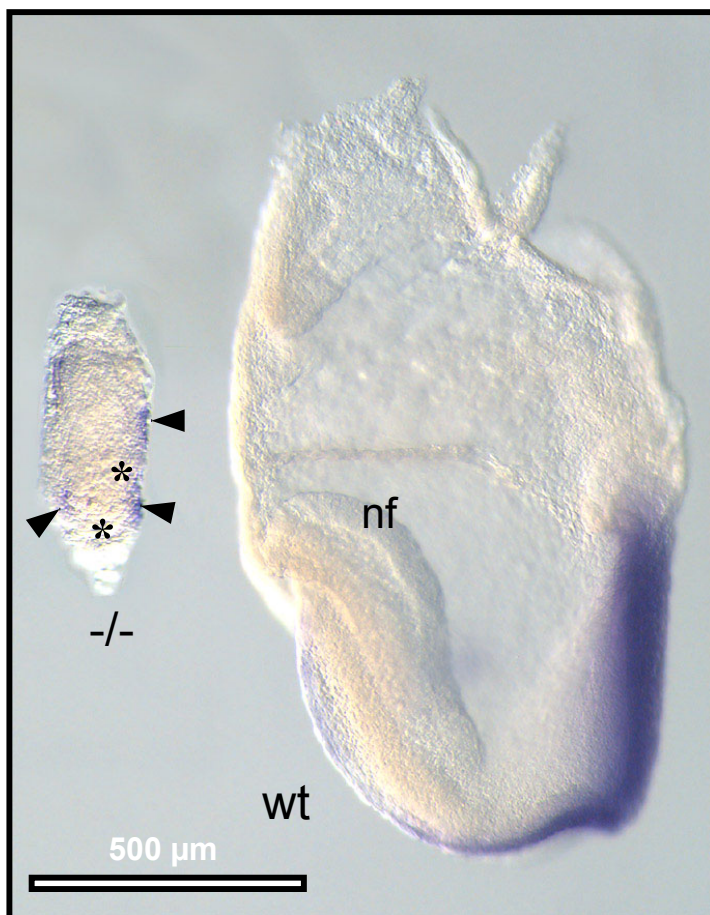


Abbildung 3.14: Der AP-2 γ -Knockout ist im Wachstum retardiert und gastruliert nur unvollständig.

Die Abbildung zeigt eine *in situ* Färbung für *Brachyury* im Totalpräparat der Nullmutante (links, -/-) und der Kontrolle (rechts, wt) am Tag 8 der Embryonalentwicklung. Die Blaufärbung markiert die Expression von *Brachyury*. Pfeile ohne Schaft kennzeichnen das Signal im Knockout. Die Sterne markieren den Verlust des *Brachyury*-Signals. nf=Neuralfalte

Die blaue Färbung markiert die Expressionsorte von *Brachyury*. Das Signal ist im Wildtyp deutlich zu erkennen, während die Nullmutante einen defekten Primitivstreifen aufweist. Das *Brachyury*-Signal bildet keine durchgehende

Linie, sondern wird durch Bereiche ohne Signal unterbrochen (Sterne). Möglicherweise ist die Mesodermbildung gestört. Um diese Aussage jedoch eindeutig zu belegen, müßten Wildtypembryonen von gleicher Größe wie die Nullmutante untersucht werden, denn der beschriebene Defekt könnte auch auf das retardierte Wachstum zurückzuführen sein.

3.6.4 AP-2-Expression im Wildtyp während der frühen Embryonalentwicklung

In der frühen Entwicklung ist die Nährstoffversorgung des Embryos im wesentlichen über Diffusionsprozesse sichergestellt. Mit zunehmender Größe des Embryos wäre dieser rein physikalische Prozeß viel zu langsam, um eine ausreichende Versorgung des Embryos zu gewährleisten. Diese Aufgabe wird deshalb von einer Gruppe hoch spezialisierter extraembryonaler Zellen übernommen, den Trophoblastenzellen. Am Tag 6,5 und 8 der Embryonalentwicklung führte ich in Wildtypembryonen eine pan-Antikörperfärbung von AP-2 durch (Abb. 3.15).

Die Zellen des ekto-plazentalen Konus (ek) und die Riesenzellen (rz) zeigen am Tag 6,5 dpc. eine starke nukleäre AP-2-Expression (Abb. 3.15, A). Das extraembryonale Ektoderm (Abb. 3.15, B, Schnittebene ①) ist schwach AP-2-positiv (Pfeile ohne Schaft). Ab Tag 8 der Embryonalentwicklung (Abb. 3.15, C) wird AP-2 zusätzlich im Neuroepithel (ne) und dem Amnion (am) exprimiert. Die Hauptexpressionsorte von AP-2 sind in der frühen Embryonalentwicklung (bis 6,5 dpc.) auf extraembryonale Strukturen beschränkt, wobei in den Trophoblastenzellen des ekto-plazentalen Konus und in den Riesenzellen die stärkste AP-2-Expression detektiert wird. Mit Beginn der Neurulation wird AP-2 erstmals embryonal, im Neuroepithel der apikalen Neuralfalte nachgewiesen. Während der weiteren Embryonalentwicklung persistiert die starke AP-2-Expression in den Trophoblastenzellen.

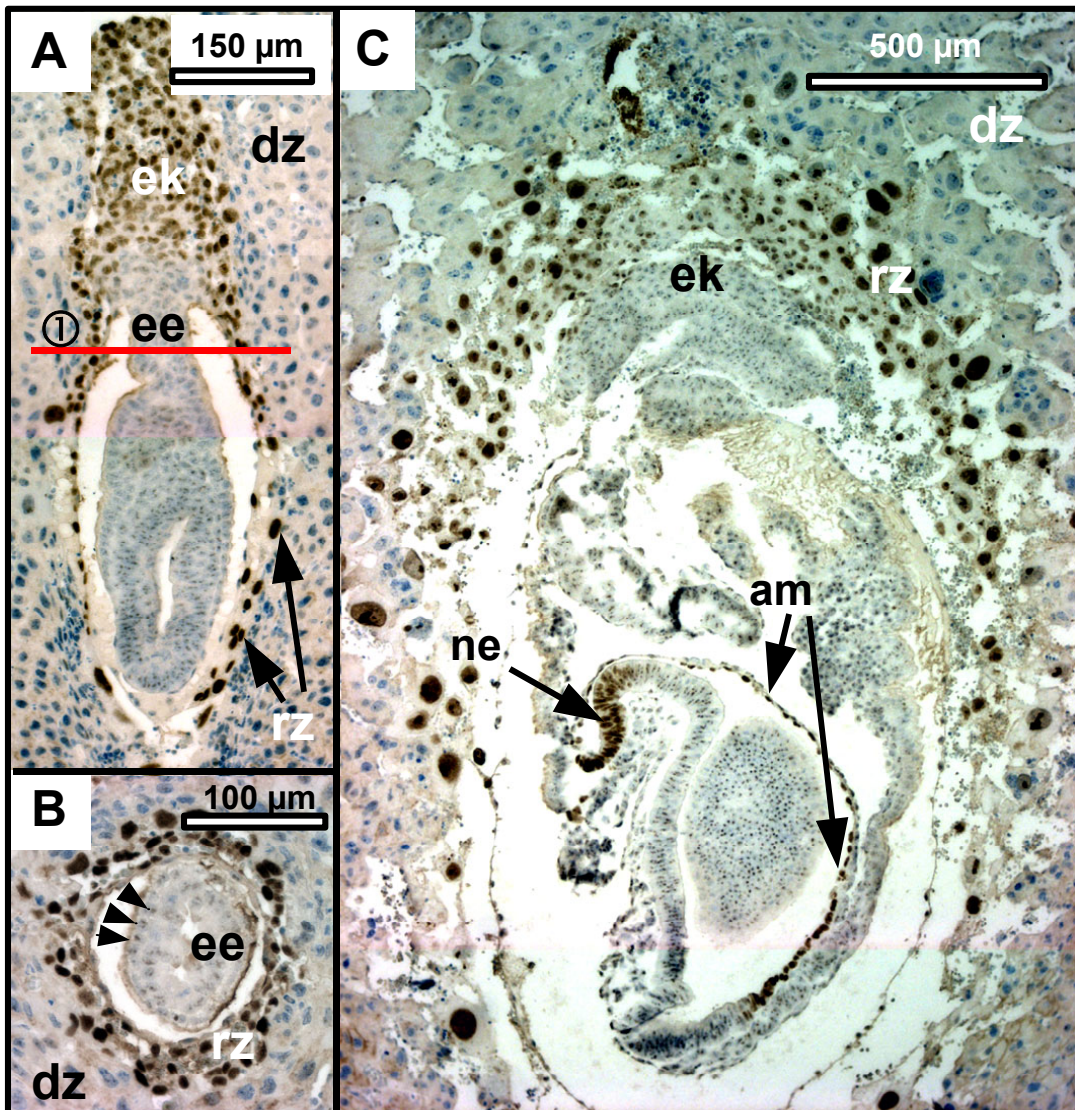


Abbildung 3.15: AP-2-Expression im Trophoblasten von Wildtyp-Embryonen.

Immunohistochemische Analyse mit einem pan-AP-2-Antiserum. Die Abbildung zeigt Schnitte durch Embryonen in der Dezidua (dz) an Tag 6,5 (A, B) und 8 (C) der Embryonalentwicklung. Bei A und C handelt es sich um Sagittalschnitte durch den Embryo, bei B um einen Transversalschnitt. Die Schnittebene ① von B ist in A rot eingezeichnet. Die Riesenzellen (rz) und der ekto-plazentale Konus (ek) zeigen ein starkes braunes AP-2-Signal. Das etwas schwächere Signal im extraembryonalen Ektoderm (ee) ist im Transversalschnitt B erkennbar (Pfeile ohne Schaft). Am Tag 8 dpc. wird AP-2 erstmals im Embryo selbst exprimiert. Zusätzlich zu den Trophoblastenzellen ist das Neuroepithel (ne) der apikalen Neuralfalte und das Amnion (am) AP-2-positiv.

Ist also die dramatische Wachstumsretardierung der AP-2 γ -Nullmutante ein sekundärer Defekt, dessen Ursache auf eine Trophoblastendysfunktion

zurückzuführen ist? Um diese Frage zu beantworten, untersuchte ich die Proliferation des Trophoblasten.

3.6.4.1 Verminderte Proliferation im ekto-plazentalen Konus und im extraembryonalen Ektoderm der Nullmutante am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung

Im Sagittalschnitt werden in der wachstumsretardierten Nullmutante (Abb. 3.16, B) morphologische Defekte des ekto-plazentalen Konus (ek) sichtbar. Der in B markierte Ausschnitt ist in D vergrößert dargestellt. In der Vergrößerung erkennt man, daß dieses Gewebe bei der Nullmutante weniger kompakt ist als im Kontrollembryo (A, bzw. Vergrößerung C). Als Folge davon kommt es bei der Nullmutante zu Einblutungen (weißer Pfeil markiert rote Blutkörperchen) im ekto-plazentalen Konus.

Proliferierende Zellen können mit einem PCNA-Antikörper nachgewiesen werden. Die PCNA-Färbung (Abb. 3.16, C und D) zeigt, daß im ekto-plazentalen Konus der Mutante die Zellproliferation stark verringert ist. Nur vereinzelt erkennt man proliferierende Zellen (weiße Pfeile ohne Schaft), während im Kontrollembryo über 90% der Zellen im ekto-plazentalen Konus das rote PCNA-Signal zeigen.

Das extraembryonale Ektoderm (ee) begrenzt als innerste Zellschicht den ekto-plazentalen Konus. Die punktierten Linien kennzeichnen die Grenze zwischen beiden Strukturen. Zusätzlich zur eingeschränkten Proliferation des ekto-plazentalen Konus zeigt die Nullmutante einen Proliferationsverlust im extraembryonalen Ektoderm, während im Kontrollembryo fast alle Zellen proliferieren.

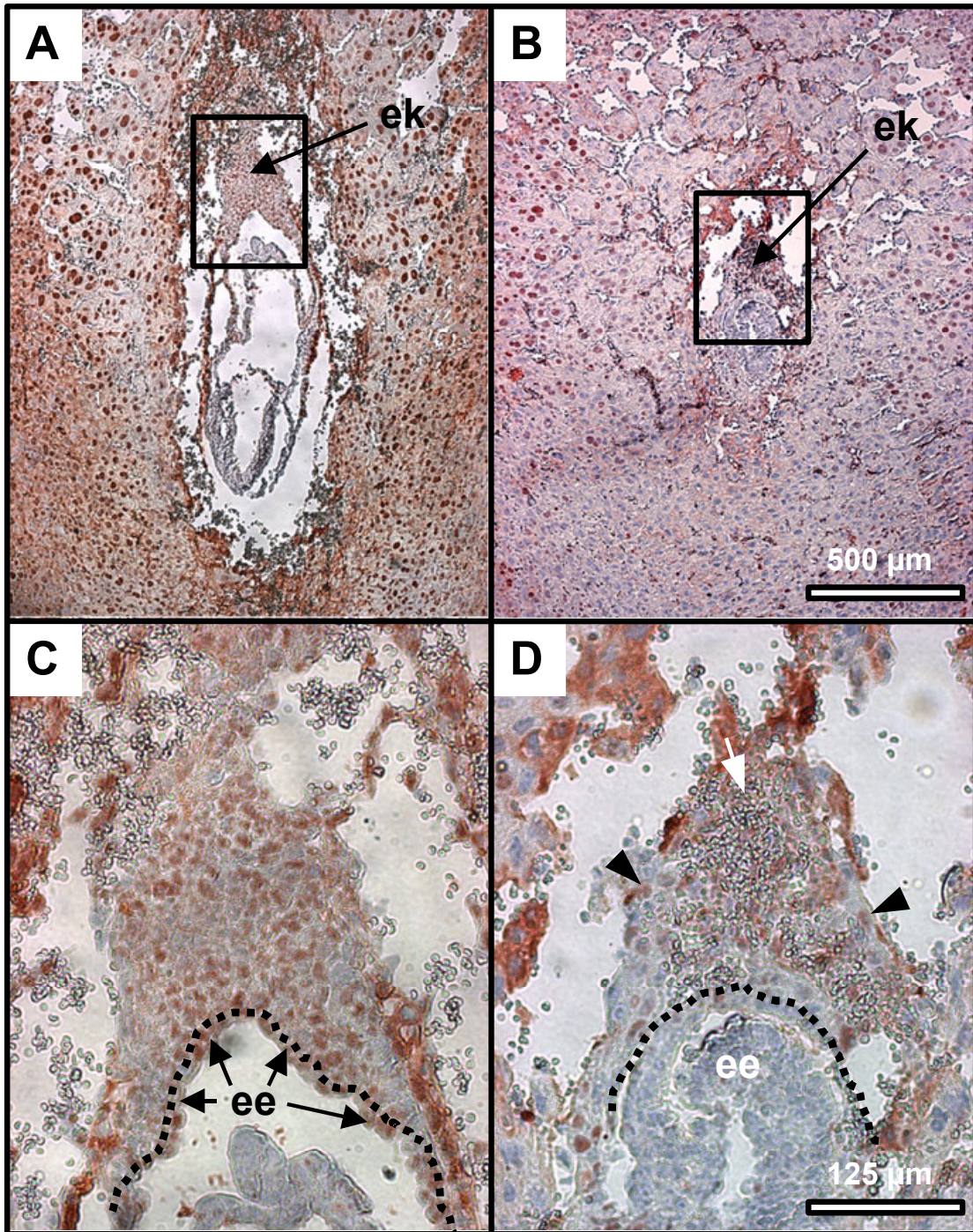


Abbildung 3.16: Proliferationsverlust im ektoplazentalen Konus und extraembryonalen Ektoderm der Nullmutante am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung.

Die Proliferation der Nullmutante wurde am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung mittels PCNA-Färbung untersucht. Aus den Übersichten eines normal entwickelten Embryos (A) und eines retardierten Tieres (B) wurde der ektoplazentale Konus im eingerahmten Bereich vergrößert dargestellt (C, D). Die Mutante (D) zeigt neben des retardierten Größenwachstums eine verminderte Proliferation im extraembryonalen Ektoderm (ee) und im ektoplazentalen Konus (ek) (weiße Pfeile ohne Schaft markieren einzelne proliferierende Zellen). Zusätzlich treten bei der Mutante Einblutungen im ektoplazentalen Konus auf (weißer Pfeil markiert Erythrozyten). Die Grenze zwischen ee und ek wurde durch eine Strichlinie angedeutet.

3.6.4.2 Die Nullmutante entwickelt kein Labyrinth, die Anzahl der Riesenzellen ist verringert

Durch die vorangegangenen Versuche wurde in der Mutante eine Proliferationsdefizienz sowohl im extraembryonalen Ektoderm als auch im ekto-plazentalen Konus festgestellt. Beide Gewebe sind während der weiteren Trophoblastenentwicklung am Aufbau komplexer plazentaler Strukturen beteiligt. So bildet der ekto-plazentale Konus Riesenzellen, die in distaler Richtung wandern und den Konzeptus als mehrschichtige Zelllage umschließen.

Das extraembryonale Ektoderm fusioniert mit der mesodermalen Allantois und bildet schließlich das Labyrinth. Deshalb wurde die Mutante gezielt auf Defekte bei der Labyrinthbildung und auf eine Fehlregulation bei der Entstehung der Riesenzellen untersucht.

Die Abbildung 3.17 zeigt eine AP-2-Färbung mit einem pan-Antiserum im Wildtypkonzeptus (A) und der Nullmutante (B), um die Morphologie des AP-2-positiven ekto-plazentalen Konus (ek) zu verdeutlichen und um die AP-2-exprimierenden Riesenzellen vom maternalen Deziduagewebe zu unterscheiden. Die Mutante zeigt im Vergleich zur Kontrolle im Bereich des ekto-plazentalen Konus eine reduzierte Zahl von Riesenzellen (rz). Die Riesenzellen des Wildtypkonzeptus wandern in der Dezidua in distaler Richtung und bilden mehrschichtige Zellagen aus, welche durch Pfeile markiert wurden. Die Nullmutante hingegen bildet lediglich eine einzelne Zellschicht (Pfeile) um den Konzeptus. In C und D wurde der eingerahmte Bereich aus A und B vergrößert dargestellt. Abbildung 3.17 C zeigt die AP-2-positive Labyrinthanlage im Wildtypembryo, deren Grenze durch eine Strichlinie verdeutlicht wurde. Der Mutante (D) fehlt diese Struktur vollständig.

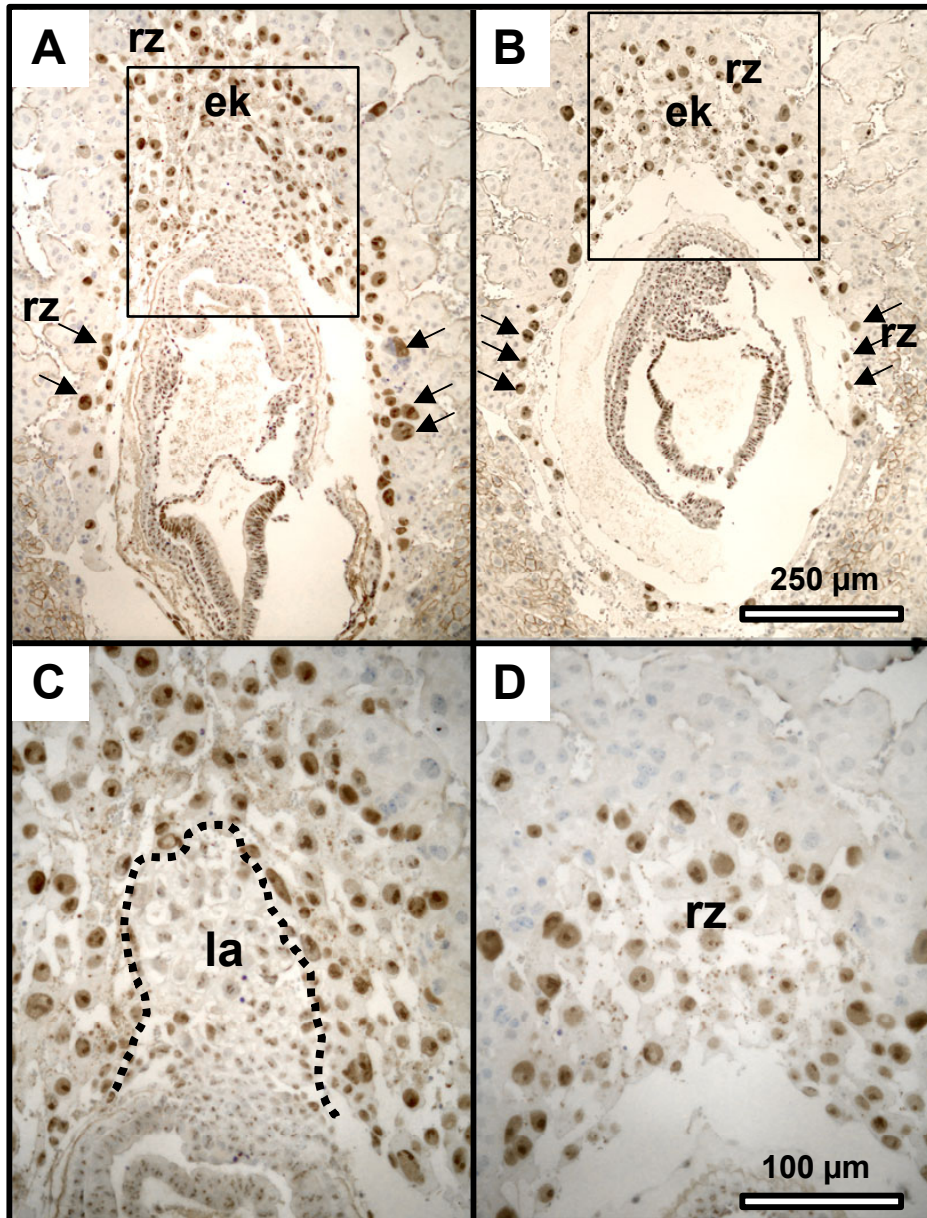


Abbildung 3.17: AP-2 γ -Mutante entwickelt kein Labyrinth und bildet weniger Riesenzellen.

Die Abbildung zeigt eine immunhistochemische Färbung für AP-2 im Kontrollembryo A und in der Mutante B an Tag 8 der Embryonalentwicklung. Die Mutante besitzt im Bereich des ektoplazentalen Konus (ek) weniger Riesenzellen (rz) als der Kontrollembryo. Weiterhin bildet die Mutante lediglich eine Einzelschicht von Riesenzellen um den proximalen Bereich des Konzeptus, während der Kontrollembryo mehrere Schichten von Riesenzellen besitzt (Pfeile). Die in A und B markierten Bereiche wurden in C bzw. D vergrößert dargestellt. In der Vergrößerung wird deutlich, daß der Kontrollembryo (C) eine normale Labyrinthanlage entwickelt, welche in der Nullmutante (D) komplett fehlt. Die Grenze der Labyrinthanlage (la) ist im Kontrollembryo durch eine Punktlinie markiert. Die Schnitte sind mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, daß AP-2 γ essentielle Funktionen bei der Entwicklung des Trophoblasten übernimmt. Dieser Prozeß

ist von einer massiven Zellproliferation in bestimmten Geweben des Trophoblasten abhängig. Der Verlust der AP-2 γ -Expression im Trophoblasten führt zu einer Proliferationsdefizienz im ekto-plazentalen Konus, was die Ursache für die eingeschränkte Bildung der Riesenzellen sein könnte. Ebenso läßt sich die gestörte Entwicklung der Labyrinthanlage durch die Proliferationsdefizienz des extraembryonalen Ektoderms erklären. Da AP-2 γ in allen Zellen des Trophoblasten exprimiert wird, handelt es sich bei diesen Phänotypen um Primärdefekte der AP-2 γ -Defizienz. Im Gegensatz dazu muß der Gastrulationsphänotyp und die dadurch gestörte Mesodermbildung in der Nullmutante auf einen sekundären Defekt zurückgeführt werden, weil AP-2 γ im Mesoderm nicht exprimiert wird (Shi & Kellems, 1998). Das retardierte Wachstum und die gestörte Mesodermbildung des Embryos könnte auf die unzureichende Nährstoffversorgung zurückzuführen sein, deren Ursache der Defekt im Trophoblasten sein könnte.

3.7 Etablierung eines Blastozystenkultursystems

Für die Analyse von AP-2 γ -Zielgenen etablierte ich ein Blastozystenkultursystem, in dem die Entwicklung von Blastozysten über mehrere Tage untersucht werden konnte. Der Vorteil dieses Kultursystem liegt in seiner geringeren Komplexität gegenüber den bisher durchgeführten *in vivo*-Studien. Der Trophoblast ist das Verbindungsglied zwischen Fötus und Mutter, über ihn findet ein reger Stoffaustausch statt. Diese Wechselwirkungen, welche die Ausprägung eines potentiellen Defekts der Nullmutante abschwächen oder sogar vollständig kompensieren könnten, sind im Kultursystem ausgeschlossen.

Am Tag 3,5 der Schwangerschaft wurden die Blastozysten isoliert und in Kultur gebracht. Die Blastozysten schlüpfen aus der Zona Pelluzida und hefteten sich innerhalb von ein bis zwei Tagen an den Untergrund an. Die Trophektodermzellen wuchsen flächig aus und bildeten eine Einzelzellschicht. Die innere Zellmasse der Blastozyste entwickelte sich zu einer definierten

Zellkolonie, dem sogenannten Keimknoten. Aus dem Keimknoten wurde DNS für die Genotypisierung gewonnen.

3.7.1 Nachweis der AP-2 –Expression im Kultursystem

Nach der Etablierung des System wurde mittels Antikörperfärbung überprüft, ob die Wildtyp-Blastozysten unter den gegebenen Kulturbedingungen das AP-2-Protein exprimieren. Die Abbildung 3.18 zeigt ein deutliches nukleäres AP-2-Signal in den Trophoblastenzellen der differenzierten Blastozysten.

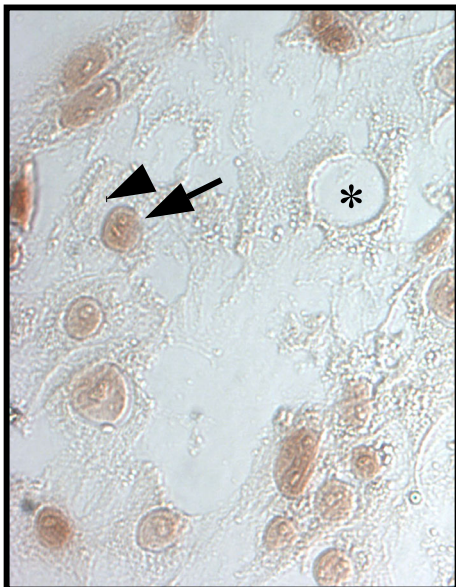


Abbildung 3.18: AP-2-Expression der Trophoblastenzellen im Kultursystem.

Blastozysten von Wildtyp-Mäusen wurden an Tag 3,5 der Schwangerschaft isoliert, in Kultur gebracht und für ca. 1 Woche einzeln in einem Tropfen Medium kultiviert. Die Trophoblastenzellen wurden einer immunhistochemischen AP-2-Analyse unterzogen. Das rote AP-2-Signal ist strikt kernständig (Pfeil). Die zytoplasmatischen Strukturen (Pfeil ohne Schaft) sind erkennbar und zeigen keine Färbung. *=Artefakt, Zellkern löste sich beim Prozessieren ab.

3.7.2 Die Trophektodermzellen der Nullmutante verlieren ihren epithelialen Charakter, der Keimknoten seine kompakte Struktur

Die Mutante schlüpft wie die Wildtypblastozyste aus der Zona Pelluzida und heftet sich an den Untergrund an. Die Trophektodermzellen (te) der Nullmutante verlieren jedoch ihren epithelialen Charakter und wachsen flächig aus (Abb. 3.19 A). Weiterhin ist ein Defekt im Keimknoten (kk) erkennbar. Der Keimknoten bildet im Wildtyp (Abb. 3.19 B) eine definierte Zellkolonie, während der Keimknoten der Mutante aus einem lockeren Zellverband besteht.

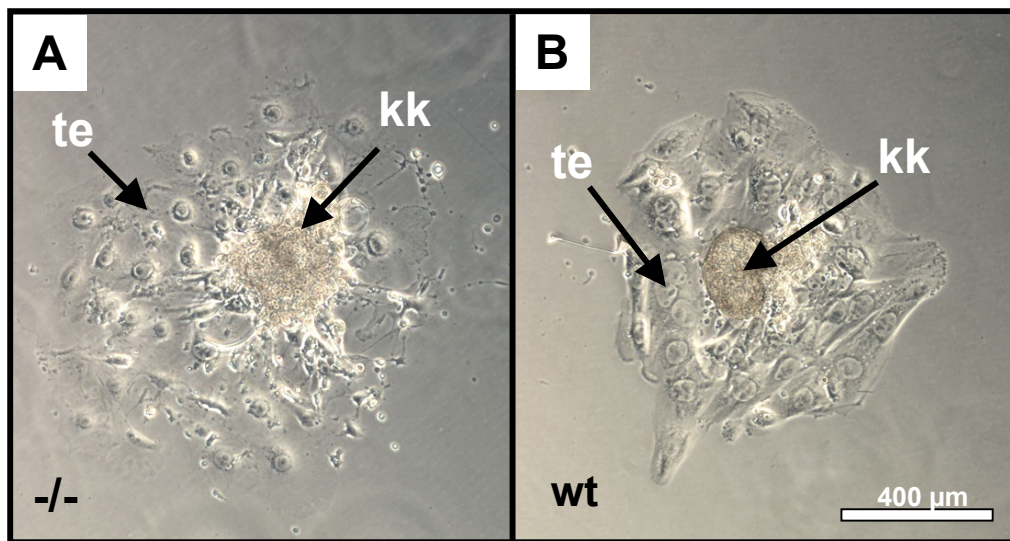


Abbildung 3.19: Primäre AP-2 γ -defiziente Trophektodermzellen verlieren ihren epithelialen Charakter und der Keimknoten seine kompakte Struktur.

Knockout- (A) und Wildtypblastozysten (B) wurden an Tag 3,5 dpc. präpariert und sechs Tage kultiviert. Beide Blastozysten schlüpften und hefteten sich an den Untergrund. Die Keimknoten proliferierten und die Trophektodermzellen (te) wuchsen aus. Die epitheliale Morphologie der Trophektodermzellen (te), sowie die kompakte Struktur des Keimknotens (kk) gingen im Knockout verloren

3.7.3 Analyse von AP-2 γ -Zielgenen

3.7.3.1 E-Cadherin-Expressionsanalyse

E-Cadherin ist für die Entstehung und die Aufrechterhaltung des Trophektoderms essentiell und deshalb entwickelt der E-Cadherin-Knockout kein funktionsfähiges Trophektoderm, implantiert nicht und stirbt ab (Larue et al., 1994). Außerdem wurden im Promotor und Enhancer von E-Cadherin je zwei AP-2-Konsensussequenzen identifiziert und die AP-2-Bindung an diese Sequenzen durch Mutationsstudien nachgewiesen (Hennig et al., 1996). Weil der Phänotyp der AP-2 γ -Nullmutante auf eine Fehlregulation der Zelladhäsion hindeutete, wurde die Expression von E-Cadherin untersucht.

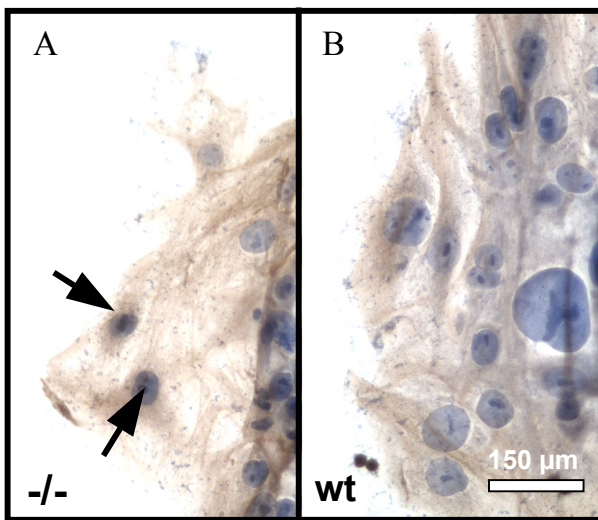


Abbildung 3.20: Keine Fehlregulation von E-Cadherin in der Nullmutante.

Die Abbildung zeigt eine E-Cadherin Antikörperfärbung in ca. 5 Tage alten Blastozysten kulturen. Das rotbraune, Antikörpersignal ist in den Trophoblastenzellen der Mutante (A) und im Wildtyp (B) mit gleicher Intensität sichtbar. Die Zellkerne (blau) wurden mit Hämatoxilin gegengefärbt. Die Pfeile markieren die Kerne von Zellen, die sich aus dem Zellverband lösen.

Die immunhistochemische Analyse der Blastozysten kulturen mit einem E-Cadherin-Immuns serum detektierte keine Unterschiede in der E-Cadherin-Expression zwischen der Nullmutante (Abb. 3.20 A) und dem Wildtyp (Abb. 3.20 B). Die Nullmutante und die Wildtypkontrolle exprimierten vergleichbare E-Cadherin-Spiegel. Durch eine RT-PCR-Analyse der E-Cadherin-Expression könnten die Ergebnisse der Immunhistochemie quantifiziert werden. Die Zellen (Abb. 3.20, Pfeile) lösen sich aus dem Zellverband.

3.7.3.2 ADA-Expressionsanalyse

Adenosindeaminase (ADA) ist ein wichtiges Enzym des Purinstoffwechsels und wird während der Plazentaentwicklung durch AP-2 γ reguliert. Die Expressionsmuster beider Gene überlappen in den Trophoblastenzellen und ADA-defiziente Tiere sterben während der frühen Postimplantationsphase (Shi & Kellems, 1998; Blackburn et al., 1997). ADA kommt sowohl im Zytoplasma, als auch an die Zellmembran gebunden vor.

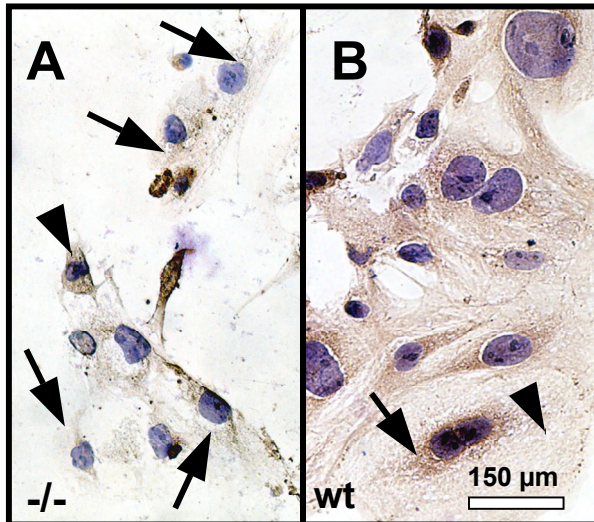


Abbildung 3.21: Die Expression von Adenosindeaminase ist in der Nullmutante stark reduziert.

Die Abbildung zeigt eine ADA-Antikörperfärbung in ca. 5 Tage alten Blastozystenkulturen. Das rotbraune, zytosolische Antikörpersignal ist in der Mutante stark reduziert, während der Wildtyp hohe Proteinspiegel exprimiert. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gefärbt. Die Pfeile sowie die Pfeile ohne Schaft werden im Text erklärt.

Abbildung 3.21 zeigt die Färbung von differenzierten Blastozysten mit einem ADA-Antiserum nach ca. 5 Tagen Wachstum unter den beschriebenen Kulturbedingungen. Ein Ausschnitt aus dem Bereich der Trophoblastenzellen einer AP-2 γ -defizienten Kultur (Abb. 3.21, links) und einer Wildtyp-Kultur sind dargestellt. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gefärbt. Das rotbraune ADA-Signal ist im Zytosol der Wildtyp-Trophoblastenzellen erkennbar. Das Zytosol konzentriert sich um den zentral gelegenen Zellkern der Zelle, während der Zellkörper zur Peripherie hin eine abgeflachte Morphologie mit wenig Zytoplasma annimmt. Deshalb ist die ADA-Färbung um die Zellkerne intensiver (Abb. 3.21 B, Pfeil) als im Randbereich der Zelle (Pfeil ohne Schaft).

Die Zellen und Zellkerne der Knockout-Kultur sind im Durchschnitt kleiner als in der Kontrolle. Die Nullmutante ist in ihrer Adhäsionsfähigkeit an den Untergrund eingeschränkt, was zur Folge hat, daß sich die Zellen während der Färbeprozedur leicht ablösen. Das Zytosol der Nullmutante zeigt stark reduzierte ADA-Expression, wobei die meisten Zellen im Bereich um den Zellkern keine oder nur sehr schwache ADA-Expression aufweisen (Pfeile). Bei einigen Zellen ist eine mäßig starke Färbung erkennbar (Pfeil ohne Schaft). Außerdem werden die Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen Wildtyp und Mutante sichtbar.

Die Ergebnisse zeigen, daß Adenosindeaminase im Trophoektoderm der Nullmutante stark herabreguliert wird.

3.8 Gewebespezifische AP-2 γ -Defektmutanten

3.8.1 Wahl der Cre-Mauslinien

Meine Untersuchungen zeigten, daß die AP-2 γ -defiziente Maus früh embryonal letal ist. AP-2 α und AP-2 β können den letalen Trophoblastendefekt nicht kompensieren. Die Einkreuzung der Mox2Cre (MORE) Mauslinie in die konditionale AP-2 γ -Knockout-Linie ermöglicht die Funktionsanalyse von AP-2 γ zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung (Tallquist & Soriano, 2000), denn die MORE-Linie exprimiert die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Mox2-Promotors, welcher die Aktivierung des Enzyms exklusiv im Epiblasten vermittelt. Im Trophoblasten wird die Cre-Rekombinase nicht aktiviert, die Funktion des AP-2 γ -Gens bleibt erhalten und ein Defekt im Trophoblasten wird vermieden. Ebenso wie die Trophoblastenzellen gehören die Neuralleiste und ihre Derivate zu den Hauptexpressionsorten der AP-2-Gene. Das Einkreuzen einer Wnt1-Cre Mauslinie (Chai et al., 2000) in die konditionale AP-2 γ -Linie ermöglicht die gewebespezifische AP-2 γ -Inaktivierung in der Neuralleiste sowie in den Neuralleistenderivaten und wird zum besseren Verständnis der Rolle von AP-2 γ bei der Entstehung und Entwicklung dieser Strukturen beitragen.

3.8.2 Etablierung der gewebespezifischen Defektmutanten

Für die Etablierung der beiden gewebespezifischen Defektmutanten standen vier Gründermauslinien zu Verfügung: Die heterozygote AP-2 γ -Nullmutante (AP-2 γ ^{wt/KO}), die heterozygote konditionale AP-2 γ -Mutante (AP-2 γ ^{wt/cKO}) sowie die heterozygoten Cre-Linien Mox2^{wt/Cre} und Wnt1^{wt/Cre}.

Die Effizienz, mit der ein konditionales Allel *in vivo* durch die Cre-Rekombinase deletiert wird, ist abhängig vom Genlokus und deshalb bei jeder

Cre-Mauslinie individuell verschieden. Um eine möglichst hohe Effizienz zu garantieren, wurden die Cre-Linien in die heterozygote Nullmutante AP-2 γ ^{wt/KO} eingekreuzt. Diese Tiere besitzen neben einem konditionalen Allel bereits ein Nullallel, so daß die Cre-Rekombinase lediglich ein einziges konditionales Allel inaktivieren muß, um die gewebespezifische Mutation zu induzieren. Dazu wurden die in Tabelle 3.7 aufgeführten Mauslinien etabliert.

Tabelle 3.7: Mauslinien, die für die Erzeugung der konditionalen Defektmutanten benötigt werden.

Mauslinie	Beschreibung
AP-2 γ ^{wt/KO} Mox2 ^{Cre/Cre}	Heterozygot für das AP-2 γ -Nullallel und homozygot für das Mox2-Cre Allel
AP-2 γ ^{wt/KO} Wnt1 ^{Cre/Cre}	Heterozygot für das AP-2 γ -Nullallel und homozygot für das Wnt1-Cre-Allel
AP-2 γ ^{cKO/cKO}	Homozygot für das konditionale AP-2 γ -Allel

Die drei Mauslinien aus Tab. 3.7 wurden nach folgendem Schema miteinander verpaart, um die gewebespezifischen AP-2 γ -Defektmutanten zu erzeugen.

Tabelle 3.8: Kreuzungsschema zur Erzeugung der gewebespezifischen Defektmutanten

Parentalgeneration	Gewebespezifische Defektmutanten der F1-Generation
AP-2 γ ^{cKO/cKO} X AP-2 γ ^{wt/KO} Mox2 ^{Cre/Cre}	AP-2 γ ^{cKO/KO} Mox2 ^{wt/Cre}
AP-2 γ ^{cKO/cKO} X AP-2 γ ^{wt/KO} Wnt1 ^{Cre/Cre}	AP-2 γ ^{cKO/KO} Wnt1 ^{wt/Cre}

Die gewebespezifischen Defektmutante AP-2 γ ^{cKO/KO} Mox2^{wt/Cre} bzw. AP-2 γ ^{cKO/KO} Wnt1^{wt/Cre} trägt auf einem Allel die Cre-Rekombinase, welche das

4. Diskussion

Die AP-2 γ -Nullmutante zeigt schwere Defekte im Trophoblasten, hauptsächlich in Strukturen, welche für die Entwicklung des Labyrinths von Bedeutung sind. Deshalb soll im folgenden Abschnitt auf die Entwicklung der Plazenta und die Funktionen der Trophoblastensubpopulationen eingegangen werden.

4.1 Die Plazenta – Funktion und evolutive Aspekte der Plazentaentwicklung

Die Plazenta ist ein evolutionsbiologisch sehr junges Organ, welches als physiologische Verbindung zwischen zwei Individuen die Viviparie ermöglicht. Entsprechend vielfältig sind die Funktionen der Plazenta. Sie bewerkstelligt den Nährstofftransport, vermittelt den Gasaustausch und ermöglicht die Blutversorgung des Embryos. Die Plazenta kommuniziert aber auch mit dem maternalen Metabolismus, beeinflusst die Funktionen und das Wachstums des Ovars und steuert die Blutversorgung des Uterus (Cross, 2000). Ebenso vielfältig wie ihre Funktionen sind die strukturellen Unterschiede der Plazenta zwischen den verschiedenen Spezies. Allerdings besteht in der Evolution der Plazentatiere ein eindeutiger entwicklungsbiologischer Trend hin zur Reduktion der Zellschichten, welche den fötalen und maternalen Blutkreislauf voneinander trennen (Wooding & Flint, 1994). So gesehen nimmt die Plazenta beim Menschen und bei den Nagetieren die höchste Entwicklungsstufe ein, denn hier tritt das maternale Blut in direkten Kontakt mit dem Trophoblasten des Fötus. Aufgrund dieser evolutiven Gemeinsamkeit ist die Maus ein geeignetes Modell, um die molekularbiologischen Grundlagen der Plazentaentwicklung zu verstehen und die gewonnenen Kenntnisse auf das humane System zu übertragen (Cross, 2000).

konditionale AP-2 γ -Allel inaktiviert und so den gewebespezifischen Phänotyp induziert.

4.1.1 Aufbau der Plazenta – Die Trophoblastensubpopulationen

Die Entstehung der Trophoblastenzelllinien ist der erste Differenzierungsprozess in der Säugetierentwicklung. Diese Zellen vermitteln die Implantation und bilden die meisten extraembryonalen Gewebe. In der frühen Embryonalentwicklung der Maus existieren drei Trophoblastensublinien. Erstens die primären und sekundären Riesenzellen, welche den Embryo umschließen und sich in direktem Kontakt mit der maternalen Dezidua befinden.

Zweitens die Trophoblastenpopulation des ekto-plazentalen Konus. Drittens die ektodermale Zellschicht des Chorions oder auch extraembryonales Ektoderm - eine totipotente Stammzellpopulation mit uneingeschränktem Differenzierungspotential (Tanaka et al., 1998).

Bei den primären Riesenzellen handelt es sich um zunächst diploide Zellen, die in den Uterus einwandern und am Aufbau der Embryonalhöhle beteiligt sind. Während der Schwangerschaft bilden die Trophoblastenzellen des Chorions zusammen mit dem extraembryonalen Mesoderm der Allantois eine stark verzweigte Struktur, das sogenannte Labyrinth. Im Mesoderm entstehen Blutgefäße, die ein dichtes Kapillarnetz zwischen Fötus und Plazenta aufbauen und die Blutversorgung sicherstellen. Aus dem ekto-plazentalen Konus entwickelt sich zwischen der Labyrinthzone und der Dezidua der Spongiotrophoblast, und die sekundären Riesenzellen migrieren von proximal nach distal und umschließen, wie die primären Riesenzellen, den Embryo. Die nun voll entwickelte Plazenta bleibt bis zum Ende der Schwangerschaft erhalten (Cross, 2000).

4.1.2 Funktion der Riesenzellen

Die polyploiden Riesenzellen verhindern eine maternale Immunreaktion gegen den Konzeptus und unterstützen die Versorgung des Embryos mit maternalem Blut, indem sie eine Reihe verschiedener Zytokine exprimieren, welche die Angiogenese fördern und vasodilatorische Wirkung besitzen (Cross, 2000). Die basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren Hand1 und Mash2

übernehmen bei den Differenzierungsprozessen der Riesenzellen antagonistische Funktionen. Während Mash2 die Differenzierung der Riesenzellen inhibiert und gleichzeitig die Proliferation stimuliert (Guillemot et al., 1994), fördert Hand1 die Differenzierung der Riesenzellen (Riley et al., 1998; Scott et al., 2000). Dabei inhibiert Hand1 die Aktivität von Mash2 auf indirektem Weg (Scott et al., 2000). Neben den bHLH-Transkriptionsfaktoren gibt es noch weitere Transkriptionsfaktoren, welche die Differenzierungsprozesse der Riesenzellen steuern. Andere Gene wie Gata2/Gata3 regulieren die Riesenzellenhormone Proliferin und das plazentale Laktogen I (Ma et al., 1997).

4.1.3 Die Entstehung des Labyrinths

Wie bei vielen anderen Geweben auch, spielt bei der Entwicklung der Plazenta die konzertierte Interaktion verschiedener Zelllinien eine grundlegende Rolle. So fusionieren die Allantois und das Chorion zur Chorioallantois und entwickeln sich koordiniert weiter (vgl. Abb. 4.1).

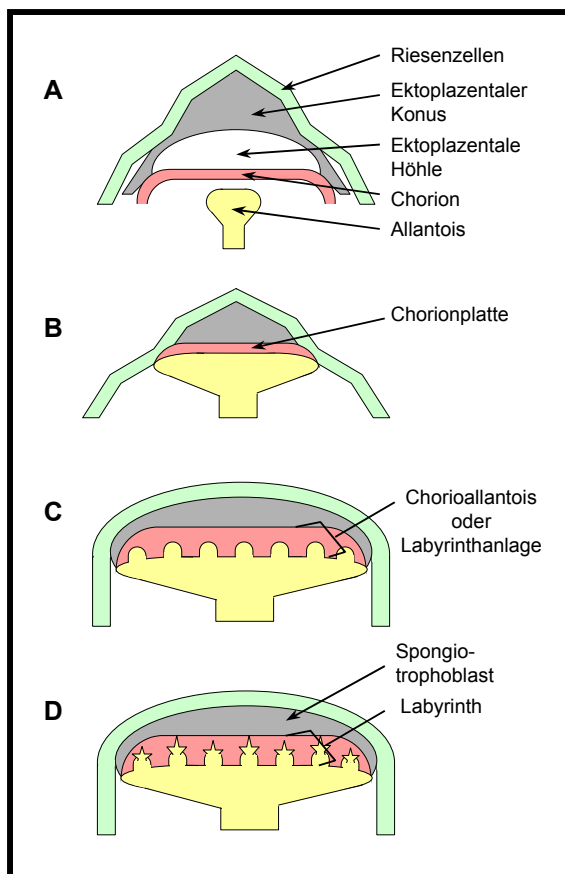


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Labyrinthbildung (verändert nach Anson-Cartwright, 2000).

A: Die Allantois wächst in Richtung des Chorions aus.

B: Die Allantois lagert sich an das Chorion an, wächst weiter und drückt das Chorion an den ektoplazentalen Konus, so daß die ektoplazentale Höhle verschwindet.

C: Bildung der Labyrinthanlage durch Fusion von Chorion und Allantois

D: Bildung des Labyrinths durch Verzweigung der Allantois und Vaskularisierung.

Deshalb führen Defekte in einem der beiden Komponenten zu einer Fehlregulation des Fusionsprozesses. So verursachen Mutationen in den Genen *itga4* (Yang et al., 1995) *fgfr2* (Xu et al., 1998) und *mrj* (Hunter et al., 1999) Defekte im Chorion, während *Vcam1* (Kwee et al., 1995; Gurtner et al., 1995), *Brachyury* (Gluecksohn-Shoenheimer, 1944) und *lim1* (Shawlot & Behringer, 1995) für die Entwicklung der Allantois wichtig sind.

An der Entstehung des Labyrinths ist eine Vielzahl verschiedener Gene beteiligt. Die Funktionen und Wechselwirkungen dieser Gene in einem so komplexen Gewebe wie dem Labyrinth, das ein Produkt aus Trophoblastenzellen, Mesoderm, Blutgefäßen und Gefäßderivaten darstellt, sind weitgehend ungeklärt. Klar scheint allerdings zu sein, daß die wichtigsten morphogenen Prozesse durch die Trophoblastenzellen gesteuert werden.

4.1.4 Initiation der Morphogenese der Chorioallantois

Das Mesoderm der Allantois und die sich darin entwickelnden Blutgefäße wachsen in das Chorion ein. Dieser Prozeß wird durch den Transkriptionsfaktor *Gcm1* gesteuert. Hohe *Gcm1*-Konzentration an definierten Stellen des Chorions (zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung auch als Chorionplatte bezeichnet) initiieren die Einfaltung des Chorions und das Einwachsen der Allantois (Anson-Cartwright et al., 2000). *Gcm1* wird nur so lange exprimiert, wie sich das Labyrinth durch wiederholte Verzweigung vergrößert (Basyuk et al., 1999).

4.1.5 Oberflächenvergrößerung der Chorioallantois.

Während *Gcm1* die Morphogenese der Chorioallantois reguliert, steuern andere Gene das Größenwachstum des Labyrinths, darunter Transkriptionsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und unterschiedliche Komponenten von Signaltransduktionskaskaden Labyrinths (Hemberger & Cross, 2001). Ein häufig beobachteter Phänotyp bei verschiedenen Mutanten ist ein unterentwickeltes Labyrinth. Genaue Studien dieser Phänotypen bestätigten die postulierten Signalkaskaden, die bislang meist auf biochemischen Daten beruhten. So spielt

die Aktivierung des Ras/MAP- Kinase-Signalweges durch die Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK) bei der Entwicklung des Labyrinths eine wichtige Rolle. Mutationen in diesen Rezeptoren führen zur Ausbildung eines zu kleinen Labyrinths (Hemberger & Cross, 2001).

4.1.6 Vaskularisierung des Labyrinths

Das Wachstum der Blutgefäße scheint durch Signale des Trophoblasten gesteuert zu werden. Die Signale sind weitgehend unbekannt, man hat jedoch gezeigt, daß Esx1, welches ausschließlich in den Trophoblastenzellen des Labyrinths exprimiert wird, bei diesen Prozessen eine zentrale Funktion übernimmt. Die Esx1-Nullmutante bildet ein vergrößertes Labyrinth, in dem eine verringerte Zahl von Blutgefäßen beobachtet wird (Li & Behringer, 1998).

4.1.7 Aufgabe des Labyrinths beim Nährstofftransport

Es gibt viele Mutanten, die anatomische Defekte bei der Plazentabildung zeigen, allerdings nur wenige, die einen spezifischen Defekt beim Nährstofftransport entwickeln. Bei der Esx1-Mutante wurde eine gestörte Nährstoffaufnahme nachgewiesen und als Folge davon ein retardiertes Größenwachstum des Fötus beobachtet (Li & Behringer, 1998). Ein weiteres für die Nährstoffversorgung wichtiges Gen ist Connexin 26 (Cx26), ein Protein der Kommunikationskontakte („Gap junctions“). Cx26-defiziente Embryonen sind stark wachstumsretardiert und sterben aufgrund eines Defekts im plazentalen Glukosetransport (Gabriel et al., 1998).

4.2 Defekte der AP-2 γ -defizienten Maus

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß AP-2 γ für die Embryonalentwicklung der Maus essentiell ist. Ein Verlust von AP-2 γ führt zu einem retardierten Wachstum des Embryos ab Tag 7,5 dpc. und zur Resorption des Konzeptus bis zum Tag 9,5 dpc.. Ich konnte nachweisen, daß die Proliferation im ekto-plazentalen Konus und im extraembryonalen Ektoderm der Nullmutante stark vermindert ist. Als Folge davon wird der Embryo nur unzureichend mit Nährstoffen versorgt und retardiert im Wachstum. Die Embryogenese ist gestört, darunter auch Prozesse, wie die Gastrulation. So führt der Proliferationsdefekt des Trophoblasten letztlich zum Absterben des Embryos. Eine weitere Erklärung für den Tod der Nullmutante wurde durch Experimente an kultivierten Blastozysten gewonnen. AP-2 γ -defiziente Blastozysten zeigen eine stark verringerte Expression von Adenosindeaminase, einem Enzym des Purinmetabolismus, welches den Abbau des Zellgifts Desoxyadenosin katalysiert. Wird zu wenig ADA exprimiert, dann akkumuliert Desoxyadenosin und die Zellen sterben ab (Goa et al., 1994; Wubah et al., 1996).

In den folgenden Kapiteln wird genauer auf die beobachteten Defekte der Nullmutante eingegangen und diese in den entwicklungsbiologischen Hintergrund eingebunden.

4.2.1 Proliferationsdefizienz im ekto-plazentalen Konus

Die frühe murine Embryonalentwicklung ist gekennzeichnet durch eine Vielzahl morphogenetischer Prozesse. Innerhalb weniger Tage von Tag 6,5 bis Tag 9,5 der Embryogenese steigert der Embryo sein Körpervolumen auf das 2000-fache. Ein derart rapides Wachstum basiert auf der konzertierten Entwicklung eines effektiven Versorgungssystems – der Plazenta. Deshalb beobachtet man am Tag 7,5 dpc. im ekto-plazentalen Konus des Wildtypkonzeptus eine massive Proliferation der Trophoblastenzellen. Der Verlust von AP-2 γ in der Nullmutante führt am Tag 7,5 dpc. zu einer starken Reduktion der Proliferation im ekto-plazentalen Konus (vgl. Abb. 3.16). Deshalb postuliere ich ein Modell, in

dem AP-2 γ als Induktor der Zellproliferation wirkt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Studien von Boshier et al. (1996), die eine Korrelation von AP-2 mit der Zellproliferation zeigten. So zeigen AP-2 α -defiziente Fibroblasten eine stark reduzierte Proliferation. Gleichzeitig wird eine verstärkte Expression von KLF-4 und p21 beobachtet (Schorle, unveröffentlichte Ergebnisse). KLF-4 inhibiert den Zellzyklus durch p21-Aktivierung (Zhang et al., 2000). Ein Verlust von AP-2 α führt vermutlich zu einer Derepression von KLF-4, wodurch p21 induziert und die Zellproliferation inhibiert wird (Schorle, unveröffentlichte Ergebnisse). Im Gegensatz dazu beschrieben frühere Studien AP-2 als Inhibitor der Zellproliferation, der die Zellzyklusprogression durch Inhibition der Cyclin D2-Expression oder durch Aktivierung der p21-Expression unterdrückt (Zeng et al., 1997). Diese Studien wurden jedoch *in vitro* an Krebszellen durchgeführt.

4.2.1.1 AP-2 γ -defiziente Tiere zeigen eine verminderte Riesenzellenbildung

Die primären Riesenzellen entstehen aus dem muralen Trophektoderm der Blastozyste und umgeben den Embryo nach der Nidation als meist einschichtige Zelllage. Die sekundären Riesenzellen werden von dem proliferierenden ekto-plazentalen Konus gebildet und wandern in distaler Richtung um den Konzeptus. Durch diesen Migrationsprozess entsteht um den Embryo eine mehrschichtige Zelllage von Riesenzellen. Die Nullmutante weist eine verminderte Zahl von Riesenzellen auf. Obwohl primäre und sekundäre Riesenzellen durch ihre Morphologie nicht unterscheidbar sind, sprechen zwei Gründe dafür, daß es sich bei den fehlenden Riesenzellen um sekundäre Riesenzellen handeln könnte: Erstens bildet die Mutante lediglich eine einschichtige Riesenzellage um den Konzeptus, und zweitens ist die Proliferation im ekto-plazentalen Konus, dem Bildungsort der sekundären Riesenzellen, stark reduziert (s. Abb. 3.17).

4.2.2 Die Nullmutante bildet kein Labyrinth

Das Labyrinth entsteht durch die konzertierte Interaktion von Chorion und Allantois. Die Fusion beider Gewebe ist ein präzise kontrollierter Vorgang, der sich nicht vollzieht, wenn bereits eine der beiden Komponenten fehlreguliert ist. Bei der AP-2 γ -Nullmutante wurde eine verminderte Proliferation im extraembryonalen Ektoderm nachgewiesen.

4.2.2.1 Bedeutung der Proliferationsdefizienz im extraembryonalen Ektoderm für die Entwicklung des Labyrinth

Die ekto-plazentale Höhle, wird durch das extraembryonale Ektoderm gebildet, welches proximal am ekto-plazentalen Konus anliegt (vgl. Abb. 4.2). Distal zur ekto-plazentalen Höhle befindet sich die Exozelomhöhle, welche durch das extraembryonale Mesoderm gebildet wird. Die Berührungsfläche beider Höhlen bildet das Chorion.

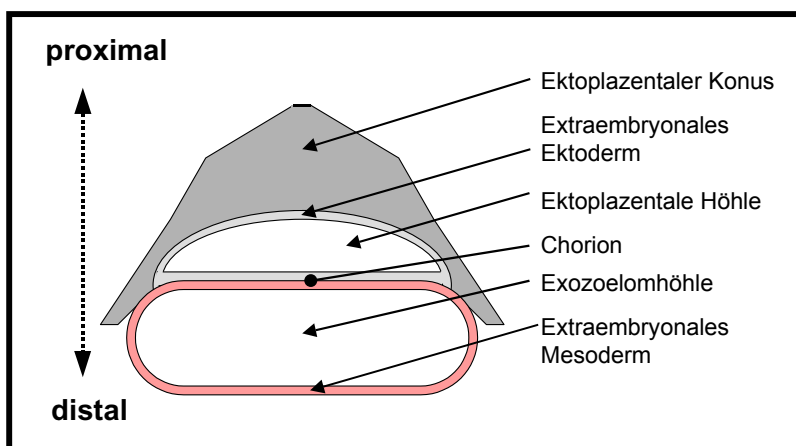


Abbildung 4.2: Der Aufbau des Chorions.

Die Berührungsfläche der Exozelom- und der ekto-plazentalen Höhle bildet das Chorion, eine Doppelzellschicht bestehend aus einer proximalen ektodermalen Komponente (extraembryonales Ektoderm, hellgrau) und einer distalen mesodermalen Komponente (extraembryonales Mesoderm, rot).

Das Chorion ist eine Doppelzellschicht, welche aus einer proximalen ektodermalen und einer distalen mesodermalen Komponente besteht. Das extraembryonale Ektoderm exprimiert AP-2 γ (Shi & Kellems, 1998). Meine Ergebnisse belegen, daß das extraembryonale Ektoderm der AP-2 γ -Nullmutante eine stark verringerte Zellproliferation aufweist, was eine mögliche Ursache für das Fehlen des Labyrinths während der weiteren Trophoblastenentwicklung sein könnte.

4.2.2.2 Die Embryogenese der Nullmutante ist gestört– Auswirkungen auf die Gastrulation

Durch den Proliferationsdefekt im Trophoblasten kann die Nährstoffversorgung des Embryos nicht mehr sichergestellt werden und der Embryo retardiert. Die Embryogenese ist gestört, wodurch entwicklungsbiologische Prozesse, wie die Mesodermbildung, beeinträchtigt werden. Die Allantois stellt die mesodermale Komponente des Labyrinths dar. Das Mesoderm entsteht bei der Gastrulation, wobei der mesodermale Marker *Brachyury* im Primitivstreifen exprimiert wird. Durch eine *in situ*-Analyse mit einer Brachyury-Sonde konnte ich zeigen, daß die AP-2 γ -Nullmutante nur unvollständig gastruliert. Als Folge davon könnte die Mesodermbildung gestört sein, was sich auf die Bildung der Allantois sowie des Chorion und letztlich auf die Entstehung des Labyrinths auswirken könnte.

4.2.3 Potentielle Vermittler der Defekte: AP-2 γ -Zielgene

Für die Analyse von AP-2 γ -Zielgenen etablierte ich ein Blastozystenkultursystem, in dem die Entwicklung von Blastozysten über mehrere Tage untersucht werden konnte. Der Vorteil dieses Kultursystem liegt in seiner geringeren Komplexität gegenüber den bisher durchgeführten *in vivo*-Studien. Der Trophoblast stellt die Verbindung zwischen Mutter und Fötus her, über die ein intensiver Stoffaustausch erfolgt. Diese Wechselbeziehung, könnte die Ausprägung eines potentiellen Defekts der Nullmutante abschwächen oder sogar vollständig kompensieren, was im Kultursystem ausgeschlossen wird.

Dazu wurden AP-2 γ -defiziente Blastozysten in Kultur gebracht. Bereits nach wenigen Tagen manifestierte sich der Phänotyp. Der Keimknoten der Nullmutante proliferierte und bildete mehrschichtige Zellagen, verlor jedoch seine kompakte Struktur. Die Trophektodermzellen der Nullmutante zeigten ebenfalls einen Verlust des epithelialen Charakters und wuchsen flächig aus, während die Trophektodermzellen im Wildtyp einen kompakten Zellverbund bildeten (vgl. Abb. 3.19). Diese Ergebnisse stützen den *in vivo* beschriebenen Befund einer Trophoblastendysfunktion. Somit ist die Blastozystenkultur ein

geeignetes System, um in der Mutante fehlregulierte AP-2 γ -Zielgene zu identifizieren.

4.2.3.1 Keine Fehlregulation der E-Cadherin-Expression in der Blastozystenkultur

Aus dem Verlust der epithelialen Struktur des Trophektoderms der Nullmutante, wurde auf eine mögliche Fehlregulation von Adhäsionsmolekülen geschlossen. E-Cadherin wurde als AP-2-Zielgen (Hennig et al., 1996) beschrieben und spielt bei der Kompaktierung der Blastozyste eine wichtige Rolle. Die E-Cadherin-Nullmutante bildet kein Trophektoderm und stirbt während der Implantation (Larue et al., 1994). Bei einer immunhistochemischen Analyse von E-Cadherin konnte ich aber keine Fehlregulation feststellen. Hier könnten durch eine RT-PCR-Analyse exaktere Aussagen über einen möglichen Unterschied der E-Cadherin-Expression zwischen Wildtyp und Mutante gewonnen werden.

Eine mögliche Erklärung für die unveränderte E-Cadherin-Expression der Nullmutante wäre die Kompensation des AP-2 γ -Verlusts durch andere Faktoren. Wie erklärt sich aber dann der Phänotyp der Mutante? Dafür könnten zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Erstens könnte AP-2 γ die Expression anderer Adhäsionsmoleküle regulieren, die bisher noch nicht als AP-2 γ -Zielgene identifiziert wurden, oder zweitens könnte es sich bei dem Verlust des epithelialen Charakters um einen sekundären Effekt handeln, der sich unabhängig von der Expression von Zelladhäsionsmolekülen manifestiert. Es gibt Hinweise, daß eine Akkumulation von toxischen Metaboliten den Phänotyp verursachen könnte. Diese Möglichkeit wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.2.3.2 Stark verringerte Expression von Adenosindeaminase

Adenosindeaminase (ADA) ist ein Enzym des Purinmetabolismus, welches die Umwandlung von Adenosin und Desoxyadenosin in Inosin bzw. Desoxyinosin katalysiert (Frederiksen, 1966). Desoxyadenosin ist ein Zellgift, das den

Desoxynukleotidmetabolismus und die zelluläre Transmethylierung stört. Adenosindeaminase verhindert die Akkumulation des Toxins, welches sonst Apoptose induzieren würde (Ullman et al., 1978). Die ADA- und AP-2 γ -Expression überlappt in den primären Riesenzellen und im proximalen Teil des ekto-plazentalen Konus (Blackborn, 1996). In der terminal differenzierten Plazenta wird ADA in allen Trophoblastenzellen detektiert, wobei die Zellen im Spongiotrophoblasten die stärkste ADA-Expression aufweisen. Im Embryo selbst wird ADA nicht exprimiert (Kellems et al., 1997; Shi & Kellems, 1998).

Neuere Untersuchungen identifizierten ADA als ein Zielgen der AP-2-Familie. Im ADA-Promotor wurde eine funktionelle AP-2-Konsensussequenz nachgewiesen (Shi et al., 1997). Deshalb untersuchte ich die ADA-Expression in der Blastozystenkultur. Meine Ergebnisse lassen auf eine Regulation der ADA-Expression durch AP-2 γ schließen, weil in AP-2 γ -defizienten Blastozystenkulturen in den Trophektodermzellen eine stark verringerte ADA-Expression nachgewiesen wurde. Die verringerte Expression führt möglicherweise in der Nullmutante zu einer erhöhten Konzentration des Zellgifts Desoxyadenosin und könnte somit die Ursache für den in der Kultur beobachteten Trophoblastenphänotyp sein. Außerdem kommt das Toxin auch als Ursache für die morphologischen Veränderungen des Keimknotens in Frage, denn Desoxyadenosin wird in das Interstitium abgegeben und kann durch Diffusion zum Keimknoten gelangen. Aus diesen Überlegungen wurde das folgende Modell der ADA-Wirkung entwickelt.

4.2.3.3 Modell des Wirkmechanismus von Desoxyadenosin bei reduzierter ADA-Aktivität

Wenn der Verlust von AP-2 γ die ADA-Expression im Trophektoderm der Nullmutante reprimiert, dann würde sich die Konzentration des Enzyms in den Trophoblastenzellen verringern, wodurch das toxische Stoffwechselprodukt Desoxyadenosin angereichert werden würde (vgl. Abb. 4.3). Das Zellgift könnte den Verlust des epithelialen Charakters der Trophektodermzellen induzieren und

nach der Diffusion durch das Interstitium einen ähnlichen Phänotyp im Keimknoten hervorrufen. Der kompakte Zellverbund des Keimknotens könnte so verloren gehen.

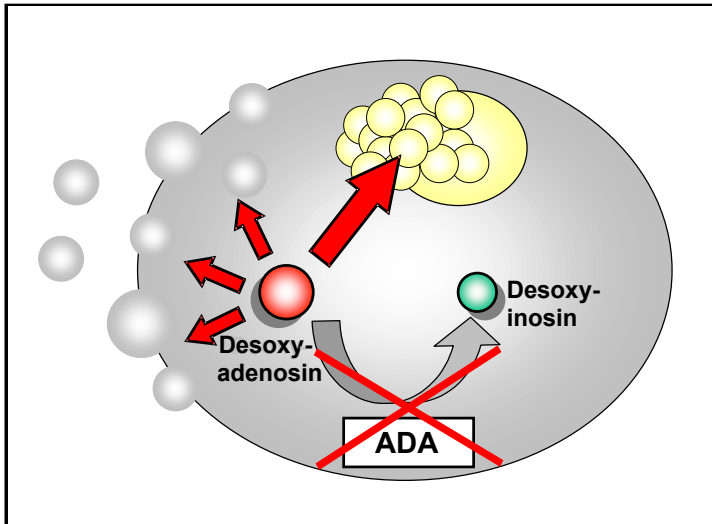


Abbildung 4.3: Diffusionsmodell des Wirkmechanismus von Desoxyadenosin durch reduzierte ADA-Aktivität in der AP-2 γ -defizienten Blastozystenkultur.

Der Verlust von AP-2 γ in der Nullmutante führt zur fehlenden Aktivierung der ADA-Expression im Trophektoderm (grau), was die Akkumulation des Toxins Desoxyadenosin verursacht. Das Zellgift diffundiert (rote Pfeile) in den interstitiellen Raum und bewirkt sowohl im Trophoblasten (grau) als auch im Keimknoten (gelb) den Phänotyp (Auflockerung des Zellverbandes).

Die postulierte indirekte Wirkung von Desoxyadenosin der Trophoblastenzellen auf den Keimknoten setzt voraus, daß der Keimknoten der Wildtypblastozyste selbst kein ADA exprimiert. Tatsächlich zeigten Shi und Kellems daß, ADA ausschließlich in der Trophoblastenlinie vorhanden ist (Shi & Kellems, 1998). Eine weitere Voraussetzung für die Richtigkeit des entwickelten Modells ist das Erreichen einer ausreichend hohen Desoxyadenosinkonzentration im Medium der Blastozystenkultur. Die Blastozysten wurden einzeln in sogenannten Mikrotropfen-Kulturen mit einem Volumen von jeweils 50 μ l kultiviert und das Medium während der gesamten Versuchsreihe nicht gewechselt. Somit wurde ein Auswaschen des Zellgifts verhindert. Dadurch konnte sich das Zellgift im Medium anreichern und die toxische Wirkung entfalten. Eine direkte Messung der Desoxyadenosin-Konzentration steht jedoch noch aus.

Kann das *in vitro* entwickelte Diffusionsmodell zur Erklärung des *in vivo* beschriebenen AP-2 γ -Knockout-Phänotyps herangezogen werden?

4.2.4 *In vivo*-Modell

Überträgt man das für die Blastozystenkultur entwickelte Wirkmodell auf die AP-2 γ -defiziente Maus, so würde man postulieren, daß der Verlust von AP-2 γ zu einer verminderten ADA-Expression führt und sich dadurch das Toxin Desoxyadenosin in den Riesenzellen anreichert. Über den interstitiellen Raum gelangt es schließlich in den Embryo und stört die entwicklungsbiologischen Vorgänge. Wenn dieses Modell richtig ist, dann müssen verschiedene Bedingungen erfüllt sein.

Erstens: Die Expressionsmuster von AP-2 γ und ADA müssen zumindest teilweise überlappen, um eine direkte Regulation von ADA durch AP-2 γ über die AP-2-Konsensussequenzen zu ermöglichen. Dies trifft für die Riesenzellen und den proximalen ektoplazentalen Konus zu.

Zweitens: Der ADA-Knockout sollte einen ähnlichen Phänotyp wie die AP-2 γ -defizienten Tiere besitzen. Tatsächlich wurde durch Knockout-Studien gezeigt, daß der Verlust von ADA in den Trophoblastenzellen zu einer perinatalen Letalität des Embryos führt (Migchielsen et al., 1995; Wakamiya et al., 1995). Die ADA-Nullmutante entwickelt kein extraembryonales Mesoderm und bildet deshalb kein Labyrinth. Einzelne Riesenzellen wurden zwar nachgewiesen, allerdings machten die Autoren keine Aussage darüber, ob deren relative Anzahl verringert ist (Blackburn et al., 1997).

Drittens: Applikation von ADA-Inhibitoren in Wildtyp-Tiere sollte eine Phänokopie des ADA-Knockouts induzieren. In der Tat verursacht die chemische Blockierung der ADA-Aktivität massive Störungen bei der Allantoisbildung und die Embryonen sterben ab (Airhart et al., 1996).

Das in der Kultur entwickelte Diffusionsmodell kann somit für die Erklärung des Phänotyps der AP-2 γ -defizienten Maus herangezogen und in ein übergeordnetes Modell integriert werden, das im folgenden Abschnitt dargestellt und diskutiert wird.

4.2.5 Entwicklung eines Modells für die Wirkmechanismen von AP-2 γ

Zusammenfassend läßt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit folgendes Modell für die Wirkmechanismen von AP-2 γ in der Maus ableiten (Abb. 4.4). Das Modell gliedert sich in zwei Teilbereiche: Die grau unterlegten Vorgänge im Trophoblasten und die weiß unterlegten Vorgänge bei der Embryogenese. Das Modell beschreibt die Wirkmechanismen von AP-2 γ über die Pfade 1, 2, 3 und 4.

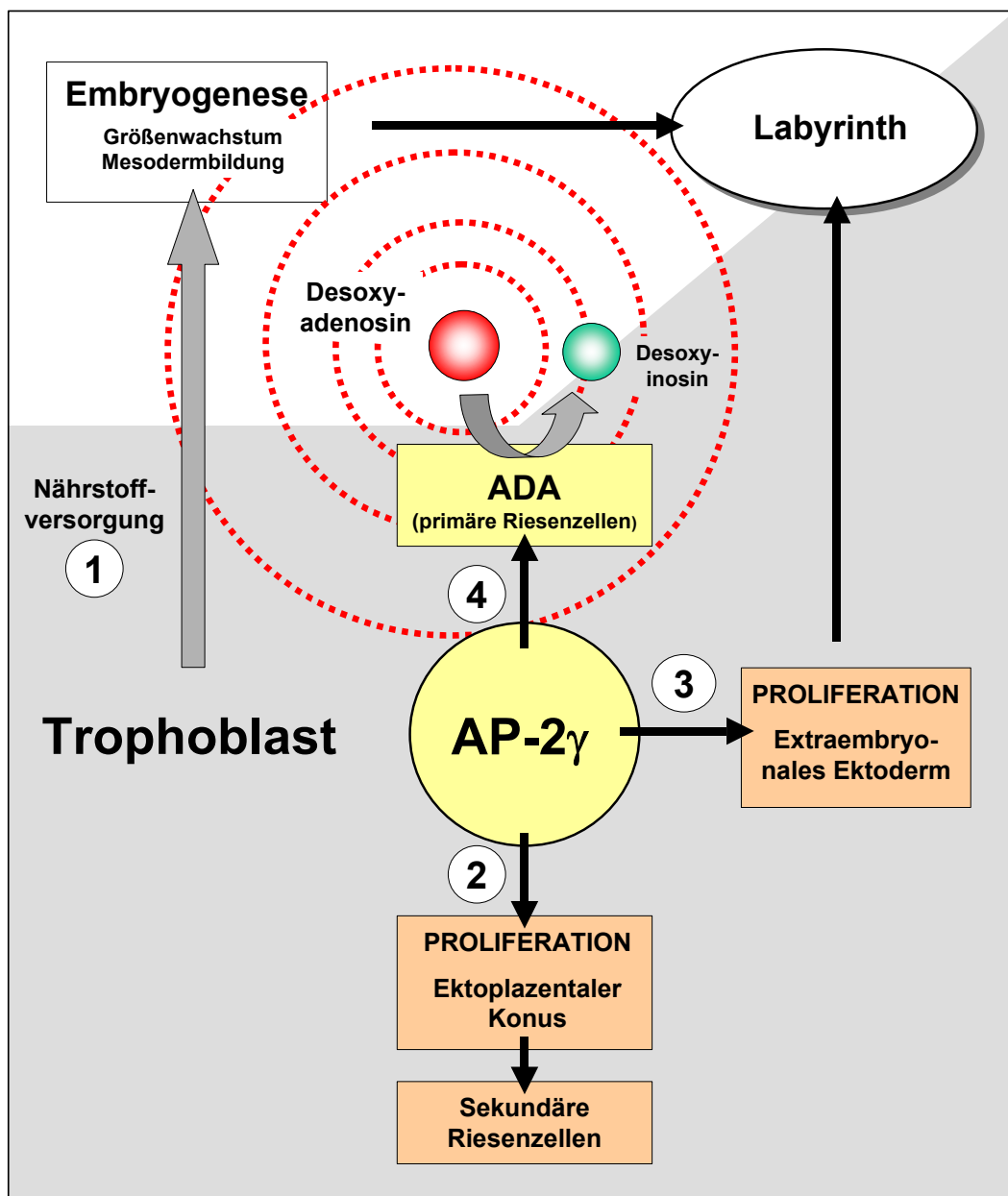


Abbildung 4.4: Modell der Wirkmechanismen von AP-2 γ

Das Modell faßt die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse zusammen und verdeutlicht die Zusammenhänge der durch AP-2 γ vermittelten Prozesse. Die Erklärung des Modells erfolgt im Text.

Pfad 1: Die zentrale Aufgabe des Trophoblasten ist die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen, um so die Embryogenese und die dabei ablaufenden morphogenetischen Prozesse wie die Mesodermbildung zu ermöglichen, welche ihrerseits die Bildung des Labyrinths sicherstellt. Kann der Trophoblast aufgrund eines Defekts, wie bei der AP-2 γ -Nullmutante diese Aufgabe nicht mehr erfüllen, stirbt der Embryo. Meine Ergebnisse zeigten, daß AP-2 γ eine zentrale Funktion bei der Entwicklung des Trophoblasten übernimmt.

Pfad 2: AP-2 γ ist für die Aufrechterhaltung der Proliferation im ekto-plazentalen Konus essentiell. Der ekto-plazentale Konus ist der Bildungsort der sekundären Riesenzellen, deren Zahl in der AP-2 γ -Nullmutante, durch die eingeschränkte Proliferation verringert ist.

Pfad 3: Weiterhin hält AP-2 γ die Proliferation im extraembryonalen Ektoderm aufrecht, welches seinerseits an der Entstehung des Labyrinths beteiligt ist.

Die Embryogenese wird über einen weiteren Mechanismus durch AP-2 γ beeinflusst. Pfad 4: AP-2 γ aktiviert die ADA-Expression in den primären Riesenzellen. ADA katalysiert als Schlüsselenzym des Purinmetabolismus den Abbau des Zellgifts Desoxyadenosin zu Desoxyinosin. In der AP-2 γ -Nullmutante ist die ADA-Expression stark verringert, wodurch sich das Zellgift in den Riesenzellen anreichert. Durch Diffusion erhöht sich die Desoxyadenosin-konzentration im gesamten System und wirkt unspezifisch sowohl auf die Embryogenese als auch die Prozesse im Trophoblasten. Dies führt letztlich zum Absterben des Embryos.

Meine Ergebnisse zeigen, daß AP-2 γ als ein zentraler Regulator unterschiedliche Prozesse im Trophoblasten steuert. Der Tod des Embryos ist somit auf eine Summe verschiedener Defekte zurückzuführen, die miteinander wechselwirken.

4.3 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde das dritte der nunmehr vier AP-2-Gene inaktiviert. Seit wenigen Tagen ist ein weiteres Mitglied der AP-2-Familie, AP-2 δ , bekannt. (Zhaho et al., 2001; im Druck). Es wird sehr interessant sein zu sehen, ob die im folgenden angestellten Überlegungen auch für das vierte Familienmitglied zutreffend sind.

Alle der bisher drei AP-2-defizienten Mauslinien zeigen Defekte in von einander unabhängigen Geweben. Während AP-2 α hauptsächlich für die kraniofaziale Entwicklung essentiell ist (Schorle et al., 1996; Zhang et al., 1996) und AP-2 β eine wichtige Rolle bei der Nierenentwicklung spielt (Moser et al., 1997), zeigen meine Ergebnisse, daß AP-2 γ die Entwicklung des Trophoblasten reguliert. Interessanterweise zeigen die AP-2 γ - und die AP-2 α -Nullmutante eine Reduktion der Proliferation in den betroffenen Geweben und die AP-2 β -Mutante eine erhöhte Apoptoserate. Nach einer in unserem Labor entwickelten Theorie, besitzen die AP-2-Gene während der Embryonalentwicklung die Funktion, Zellen im Zellzyklus zu halten. Dies erfolgt einerseits durch die Aktivierung von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (Ritzhaupt, unveröffentlichte Ergebnisse) und andererseits durch die Repression von Differenzierungsgenen (Pfisterer, unveröffentlichte Ergebnisse). Bemerkenswert ist, daß die Expressionsmuster der AP-2-Gene in vielen Geweben überlappen. Speziell im Trophoblasten wurden neben AP-2 γ auch AP-2 α und AP-2 β nachgewiesen (Shi & Kellems, 1998, eigene Versuche). Ebenso überlappen die Expressionsmuster von AP-2 α und AP-2 β bis Tag 9 dpc. im embryonalen Gewebe (Moser et al., 1997b). Daraus läßt sich schließen, daß die Funktionsspezifität der AP-2-Transkriptionsfaktoren nicht durch das räumlich-zeitliche Expressionsmuster erzielt wird, sondern durch die funktionellen Unterschiede der Transkriptionsfaktoren selbst. Diese Hypothese wird durch einen Befund in den Basalzellen der Haut gestützt. Obwohl alle drei AP-2-Transkriptionsfaktoren exprimiert werden, haben Analysen gezeigt, daß AP-2 γ mit der größten Affinität an den Cystatin A-Promotor bindet und die

Cystatin A-Expression in epidermalen Keratinozyten reguliert (Takahashi et al., 2000).

Die Erzeugung von Knockout-Tieren hat wesentlich zum Verständnis der Genfunktionen beigetragen. So konnte durch diese Arbeit ein entscheidender Beitrag zum Verständnis der Rolle der AP-2-Transkriptionsfaktoren während der Embryogenese geleistet werden.

Weitere Studien an der von mir produzierten konditional AP-2 γ -defizienten Mauslinie werden nach der Verpaarung mit der Mox2Cre-Mauslinie Einblicke in die Funktion von AP-2 γ bei der Entwicklung des Embryos selbst ermöglichen.

Die Mox2Cre-Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Mox2-Promotors, der die spezifische Aktivierung des Enzyms ausschließlich im Epiblasten vermittelt und somit AP-2 γ nur im Embryo selbst inaktiviert. Im Trophoblasten bleibt die AP-2 γ -Expression erhalten und verhindert den für die Nullmutante beschriebenen Trophoblastendefekt. So kann die Funktion von AP-2 γ im Embryo selbst analysiert werden. Schließlich kann geklärt werden, ob AP-2 γ bei der Gastrulation eine Rolle spielt, oder ob die Mesodermbildung in der Nullmutante ausschließlich sekundär durch die Wachstumsretardierung und die zytotoxische Wirkung von Desoxyadenosin gestört wird.

Das Einkreuzen der konditional AP-2 γ -defizienten Mauslinie in die Wnt1-Cre-Linie, welche die Cre-Rekombinase in der Neuralleiste exprimiert, wird die Analyse der AP-2 γ -Funktion in der Neuralleiste, sowie in deren Derivaten ermöglichen.

5. Literaturverzeichnis

Abremski, K., Hoess, R. H. und Sternberg, N. (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination : evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32 (4), 1301-11.

Aho, S., Rouda, S., Kennedy, S. H., Qin, H., Tan, E. M. (1997). Regulation of human interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) promoter activity by fibroblast growth factor. *Eur. J. Biochem.* 247(2), 503-10.

Airhart, M.J., Robbins, C.M., Knudsen, T.B. und Skalko, R.G. (1993). Occurrence of embryoletality in mouse embryos following in utero exposure to 2'-deoxycoformycin (pentostatin). *Teratology* 47, 17-27.

Albert, H., Dale, E. C., Lee, E. und Ow, D. W. (1995). Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *Plant J.* 7, 649-59.

Anson-Cartwright, L., Dawson, K., Holmyard, D., Fisher, S. J., Lazzarini, R. A., Cross, J. C. (2000). The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat. Genet.* 25(3), 311-4.

Argos, P., Landy, A., Abremski, K., Egan, J. B., Haggard-Ljungquist, E., Hoess, R. H., Kahn, M. L., Kalionis, B., Narayana, S. V., Pierson, L. D. et al. (1986). The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J.* 5 (2), 433-40.

Basyuk, E., Cross, J. C., Corbin, J., Nakayama, H., Hunter, P., Nait-Oumesmar, B., Lazzarini, R. A. (1999). Murine Gcm1 gene is expressed in a subset of placental trophoblast cells. *Dev. Dyn.* 214 (4), 303-11.

Batsche, E., Muchardt, C., Behrens, J., Hurst, H. C., Cremisi, C. (1998). RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2. *Mol. Cell Biol.* 18 (7), 3647-58.

Bauer, R., Imhof, A., Pscherer, A., Kopp, H., Moser, M., Seegers, S., Kerscher, M., Tainsky, M. A., Hofstädter, F. und Buettner, R. (1994). The genomic structure of the human AP-2 transcription factor. *Nucl. Acids Res.* 22, 1413-20.

Bauer, R., McGuffin, M. E., Mattox, W., Tainsky, M. A. (1998). Cloning and characterization of the Drosophila homologue of the AP-2 transcription factor. *Oncogene* 17 (15), 1911-22.

Berkowitz, E. A., Hecht, C. P., Azizkhan, J. C., Chen, X., Lee, D. C. (1997). Transcription factor AP2 is required for expression of the rat transforming growth factor-alpha gene. *Oncogene 14* (18), 2229-38.

Blackburn, M. R., Datta, S. K., Wakamiya, M., Vartabedian, B. S., Kellems, R. E. (1996). Metabolic and immunologic consequences of limited adenosine deaminase expression in mice. *J. Biol. Chem. 271* (25), 15203-10.

Blackburn, M. R., Knudsen, T. B. und Kellems, R. E. (1997). Genetically engineered mice demonstrate that adenosine deaminase is essential for early postimplantation development. *Development 124* (16), 3089-97.

Blackwell, T. K., Kretzner, L., Blackwood, E. M., Eisenman, R. N., Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science 250*, 1149-51.

Bosher J. M., Totty N.F., Hsuan J. J., Williams T. und Hurst H. C. (1996). A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma. *Oncogene 13*(8), 1701-7.

Byrne, C., Tainsky, M. und Fuchs, E. (1994). Programming gene expression in developing epidermis. *Development 120*, 2369-83.

Capecchi, M. R. (1989). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet. 5*, 70-6.

Chai, Y., Xiaobing J., Ito, Y., Bringas, P., Jr, Han J., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P. und Sucov, H.M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Dev. 127*, 1671-9.

Char, F. (1978). Peculiar facies with short philtrum, duck-bill lips, ptosis and low-set ears – a new syndrome? *Birth Defects Orig. Artic. Ser. 14* (6B), 303-5.

Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Decimo, D., Chambon, P. und Dolle, P. (1996). AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. *Mech. Dev. 54*, 83-94.

Cross, J. C. (2000). Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol. 11* (2), 105-13. Review.

Cross, J. C., Flannery, M. L., Blonar, M. A., Steingrimsson, E., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Rutter, W. J., Werb, Z. (1995). Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development. *Development* *121* (8), 2513-23.

Duan, C., Clemmons, D. R. (1995). Transcription factor AP-2 regulates human insulin-like growth factor binding protein-5 gene expression. *J. Biol. Chem.* *270* (42), 24844-51.

Eilers, M., Schirm, S., Bishop, J. M. (1991). The MYC protein activates transcription of the alpha-prothamosin gene. *EMBO J.* *10* (1), 133-41.

Epperlein, H., Meulemans, D., Bronner-Fraser, M., Steinbeisser, H., Selleck, M. A. (2000). Analysis of cranial neural crest migratory pathways in axolotl using cell markers and transplantation. *Development* *127* (12), 2751-61.

Evan, G. I. und Littlewood, T. D. (1993). The role of c-myc in cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *3* (1), 44-9.

Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. und Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* *69* (1), 119-28.

Evans, M. J. und Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* *292*, 154-6.

Fini, M. E., Bartlett, J. D., Matsubara, M., Rinehart, W. B., Mody, M. K., Girard, M. T., Rainville, M. (1994). The rabbit gene for 92-kDa matrix metalloproteinase. Role of AP1 and AP2 in cell type-specific transcription. *J. Biol. Chem.* *269* (46), 28620-8.

Firulli, A. B., McFadden, D. G., Lin, Q., Srivastava, D., Olson, E. N. (1998). Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. *Nat Genet.* *18* (3), 266-70.

Frederiksen, S. (1966). Specificity of adenosine deaminase toward adenosine and 2'-deoxyadenosine analogues. *Arch. Biochem. Biophys.* *113* (2), 383-8.

Frisch, S. M. und Morisaki, J. H. (1990). Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. *Mol. Cell Biol.* *10*, 6524-32.

Gabriel, H. D., Jung, D., Butzler, C., Temme, A., Traub, O., Winterhager, E., Willecke, K. (1998). Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell Biol.* *140* (6), 1453-61.

Garcia, M. A., Campillos, M., Marina, A., Valdivieso, F., Vazquez, J. (1999). Transcription factor AP-2 activity is modulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *FEBS Lett.* *444* (1), 27-31.

Garrido, C., Saule, S., Gospodarowicz, D. (1993). Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. *Growth Factors* *8* (2), 109-17.

Gaubatz, S., Imhof, A., Dasch, R., Werner, O., Mitchell, P., Buettner, R., Eilers, M. (1995). Transcriptional activation by Myc is under the negative control by transcription factor AP-2. *EMBO J.* *14*, 1508-19.

Gaynor, R. B., Muchardt, C., Xia, Y.R., Kliask, I., Mohandas, T., Sparkes, R. S. und Lysis, A. J. (1991). Localization of the gene for the DNA-binding protein AP-2 to human chromosome 6p22.3-pter. *Genomics* *10*, 1100-02.

Gille, J., Swerlick, R. A., Caughman, S. W. (1997). Transforming growth factor-alpha-induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *EMBO J.* *16* (4), 750-9.

Gluecksohn-Shoenheimer, S. (1944). The development of normal and homozygous *brachy* (*T/T*) mouse embryos in the extraembryonic coelom of the chick. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *30*, 134-40.

Goa, X., Blackburn, M. R. und Knudsen, T.B. (1994). Activation of apoptosis in early mouse embryos by 2'-deoxyadenosine. *Teratology* *49*, 1-12.

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by Tetracyclines in mammalian cells. *Science* *268*, 17666-9.

Greco, D., Zellmer, E., Zhang, Z., Lewis, E. (1995). Transcription factor AP-2 regulates expression of the dopamine beta-hydroxylase gene. *J. Neurochem.* *65* (2), 510-16.

- Guillemot, F., Nagy, A., Auerbach, A., Rossant, J., Joyner, A. L.** (1994). Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature* *371*, 333-6.
- Gurtner, G. C., Davis, V., Li, H., McCoy, M. J., Sharpe, A., Cybulsky, M. I.** (1995). Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev.* *9* (1), 1-14.
- Hamilton, D. L. und Abremski K.** (1984). Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J. Mol. Biol.* *178* (2), 481-6.
- Hemberger, M. und Cross J. C.** (2001). Genes governing placental development. *Trends in Endocrinology & Metabolism* *12* (4), 162-8.
- Hennig, G., Lowrick, O., Birchmeier, W., Behrens, J.** (1996). Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J. Biol. Chem.* *271*(1), 595-602.
- Hilger-Eversheim, K., Moser, M., Schorle, H. und Buettner, R.** (2000). regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell cycle control. *Gene*
- Hoess, R. H. und Abremski, K.** (1984). Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *81* (4), 1026-9.
- Hoess, R. H., Ziese, M. und Sternberg, N.** (1982). P1 sitespecific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *79* (11), 3398-402.
- Huang, S., Didier, J., Luca, M., Tainsky, M. A., Bar-Eli, M.** (1998). Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J.* *17* (15), 4358-69.
- Hunter, P. J., Swanson, B. J., Haendel, M. A., Lyons, G. E., Cross, J. C.** (1999). Mrj encodes a DnaJ-related co-chaperone that is essential for murine placental development. *Development.* *126* (6), 1247-58.
- Imagawa, M., Chiu, R., Karin, M.** (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction of two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* *51*, 251-60.
- Jean, D., Gershenwald, J. E., Huang, S., Luca, M., Hudson, M. J., Tainsky, M. A., Bar-Eli, M.** (1998). Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* *273* (26), 16501-8.

Jiang, M. S., Tang, Q.Q., McLennithan, J., Geiman, D., Shillinglaw, W., Henzel, W. J., Lane, M. D. (1998). Depression of the C/EBP α gene during adipogenesis: Identification of AP-2 α as a repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *95*, 3467-71.

Kilby, N. J., Snaith, M. R und Murray, J. A. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* *9* (12), 413-21.

Kwee, L., Baldwin, H. S., Shen, H. M., Stewart, C. L., Buck, C., Buck, C. A., Labow, M. A. (1995). Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* *121* (2), 489-503.

Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B. Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L. und Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *89*, 6232-6.

Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., Kemler, R. (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *91* (17), 8263-7.

Leask, A., Byrne, C., Fuchs, E. (1991). Transcription factor AP-2 and its role in epidermal-specific gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *88*, 7948-52.

Li, Y., Behringer, R. R. (1998). *Esx1* is an X-chromosome-imprinted regulator of placental development and fetal growth. *Nat. Genet.* *20* (3), 309-11.

Lohnes, D., et al. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* *120*, 2723-48.

Luo, J., Sladek, R., Bader, J. A., Matthyssen, A., Rossant, J., Giguere, V. (1997). Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. *Nature* *388*, 778-82.

Luscher, B., Mitchell, P. J., Williams, T., Tjian, R. (1989). Regulation of the transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev.* *3*, 1507-17.

Ma, G. T., Roth, M. E., Groskopf, J. C., Tsai, F. Y., Orkin, S. H., Grosveld, F., Engel, J. D., Linzer, D. I. (1997). GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo. *Development* *124* (4), 907-14.

Mansour, S. L., Thomas, K. R. und Capecchi, M. R. (1988). Disruption of the protooncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336, 348-52.

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 78, 7634-8.

Matsushime, H., Roussel, M. F., Sherr, C. J. (1991). Novel mammalian cyclins (CYL genes) expressed during G1. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 56, 69-74.

McPherson, L. A., Baichwal, V. R., Weigel, R. J. (1997). Identification of ERF-1 as a member of the AP2 transcription factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94 (9), 4342-7.

Michieli, P., Chedid, M., Lin, D., Pierce, J. H., Mercer, W. E., Givol, D. (1994). Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res.* 54 (13), 3391-5.

Migchielsen, A. A., Breuer, M. L., van Roon, M. A., te Riele, H., Zurcher, C., Ossendorp, F., Toutain, S., Hershfield, M. S., Berns, A. und Valerio, D. (1995). Adenosine-deaminase-deficient mice die perinatally and exhibit liver-cell degeneration, atelectasis and small intestinal cell death. *Nat Genet.* 10 (3), 279-87.

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

Mitchell, P. J., Wang, C., Tjian, R. (1987). Positive and negative regulation of transcription *in vitro*: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50, 847-61.

Mohibullah, N., Donner, A., Ippolito, J. A., Williams, T. (1999). SELEX and missing phosphate contact analyses reveal flexibility within the AP-2[α] protein: DNA binding complex. *Nucl. Acids Res.* 27 (13), 2760-9.

Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmonson, J. und Axel, R. (1996). Visualizing an Olfactory Sensory Map. *Cell* 87, 675-86.

Monge, I., Mitchell, P. J. (1998). DAP-2, the *Drosophila* homologue of transcription factor AP-2. *Mech. Dev.* 76 (1-2), 191-5.

Moser, M., Imhof, A., Pscherer, A., Bauer, R., Amselgruber, W., Sinowatz, F., Hofstädter, F., Schüle, R. und Buettner, R. (1995). Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 β . *Development* *121*, 2779-88.

Moser, M., Pscherer, A., Bauer, R., Imhof, A., Seegers, S., Kerscher, M. und Buettner, R. (1993). The complete murine cDNA sequence of the transcription factor AP-2. *Nucl. Acids Res.* *21*, 4844.

Moser, M., Pscherer, A., Roth, C., Becker, J., Mücher, G., Zerres, K., Dixkens, C., Weis, J., Guay-Woodford, L., Buettner, R., Fässler, R. (1997a). Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor Ap-2 β . *Genes Dev.* *11*, 1938-48.

Moser, M., Ruschoff, J., und Buettner, R. (1997b). Comparative analysis of AP-2 alpha and AP-2 beta gene expression during murine embryogenesis. *Dev. Dyn.* *208*, 115-24.

Mücher, G., Becher, J., Knapp, M., Buettner, R., Moser, M., Rudnik-Schoneborn, S., Somlo, S., Germino, G., Onuchic, L., Avner, E., Guay.Woodford, L., Zerres, K. (1998). Fine mapping of the autosomal recessive polycystic kidney disease locus (PKHD1) and the genes MUT, RDS, CSNK2 beta, and GSTA1 at 6p21.1-p12. *Genomics* *48* (1), 40-5.

Nakayama, H., Liu, Y., Stifani, S., Cross, J. C. (1997). Developmental restriction of Mash-2 expression in trophoblast correlates with potential activation of the notch-2 pathway. *Dev. Genet.* *21* (1), 21-30.

Ng, Y. K., George, K. M., Engel, J. D., Linzer, D. I. (1994). GATA factor activity is required for the trophoblast-specific transcriptional regulation of the mouse placental lactogen I gene. *Development* *120* (11), 3257-66.

Nottoli, T., Hagopian-Donaldson, S., Zhang, J., Perkins, A., Williams, T. (1998). AP-2 null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *95* (23), 13714-9.

Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Chazaud, C., Dolle, P., Chambon, P. (1996). AP-2.2: A novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* *225*, 338-47.

Perkins, N. D., Agranoff, A. B., Duckett, C. S. und Nabel, G. J. (1994). transcription factor AP-2 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J. Virol.* *68*, 6820-3.

- Riley, P., Anson-Cartwright, L., Cross, J. C.** (1998). The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat. Genet.* *18* (3), 271-5.
- Sadowsky, P. D.** (1993). Site-specific genetic recombination: hops, flips and flops. *FASEB J.* *7*, 760-7.
- Sapin, V., Bouillet, P., Oulad-Abdelghani, M., Dastugue, B., Chambon, P., Dolle, P.** (2000). Differential expression of retinoic acid-inducible (Stra) genes during mouse placentation. *Mech. Dev.* *92* (2), 295-9.
- Satoda, M., Zhao, F., Diaz, G. A., Burn, J., Goodship, J., Davidson, H. R., Pierpont, M. E., Gelb, B. D.** (2000). Mutations in TFAP2B cause Char syndrome, a familial form of patent ductus arteriosus. *Nat. Genet.* *25* (1), 42-6.
- Sauer, B.** (1993). Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. *Methods Enzymol.* *225*, 890-900.
- Sauer, B.** (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* *14*, 381-92.
- Sauer, B. und Henderson, N.** (1990). targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase. *New Biol.* *2* (5), 441-9.
- Schorle, H., Meier, P., Buchert, M., Jaenisch, R. und Mitchell, P. J.** (1996). transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* *381*, 235-8.
- Scott, I. C., Anson-Cartwright, L., Riley, P., Reda, D., Cross, J. C.** (2000). The HAND1 basic helix-loop-helix transcription factor regulates trophoblast differentiation via multiple mechanisms. *Mol. Cell Biol.* *20* (2), 530-41.
- Shawlot, W., Behringer, R. R.** (1995). Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature.* *374*, 425-30.
- Shen, H., Wilke, T., Ashique, A. M., Narvey, M., Zerucha, T., Savino, E., Williams, T., Richman, J. M.** (1997). Chicken transcription factor AP-2: cloning, expression and its role in outgrowth of facial prominences and limb buds. *Dev. Biol.* *188* (2), 248-66.
- Shi, D. und Kellems, R. E.** (1998). Transcription factor AP-2gamma regulates murine adenosine deaminase gene expression during placental development. *J. Biol. Chem.* *273*, 27331-8.

Silins, G., Grimmond, S., Egerton, M., Hayward, N. (1997). Analysis of the promoter region of the human VEGF-related factor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *230* (2), 413-8.

Sletten, L. J. und Pierpont, M. E. (1995). Familial occurrence of patent ductus arteriosus. *Am. J. Med. Genet.* *57*, 27-30.

Smith, A. J., De Sousa, M. A., Kwabi-Addo, B., Heppell-Parton, A., Impey, H., Rabbitts, P. (1995). A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nat. Genet.* *9*, 376-85.

Smith, J. L. und Schoenwolf, G. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci.* *20*, 510-7.

Smithies, O., Gergg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A. und Kucherlapati, R. S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature* *317*, 230-4.

Snape, A. M., Winning, R. S., Sargent, T.D. (1991). Transcription factor Ap-2 is tissue-specific in *Xenopus* and is closely related or identical to Keratin transcription factor 1 (KTF-1). *Development* *113*, 283-93.

Takahashi, H., Oyama, N., Itoh, Y., Ishida-Yamamoto, A., Kaneko, F. und Iizuka, H. (2000). Transcriptional factor AP-2gamma increases human cystatin A gene transcription of keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *278*(3), 719-723.

Talbot, D., Lorgin; J., Schorle, H. (1999). Spatiotemporal expression pattern of keratins in skin of AP-2alpha-deficient mice. *J. Invest. Dermatol.* *113* (5), 816-20.

Tallquist, M. D. und Soriano, P. (2000). Epiblast-restricted Cre expression in MORE mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function. *Genesis* *26*, 113-5.

Tanaka, M., Gertsenstein, M., Rossant, J., Nagy, A. (1997). Mash2 acts cell autonomously in mouse spongiotrophoblast development. *Dev. Biol.* *190* (1), 55-65.

Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A. K., Nagy, A., Rossant, J. (1998). Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* *282*, 2072-5.

Thaller, C. und Eichele, G. (1987). Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* 327, 625-34.

Torres, R.M. und Kühn, R.; (1997). *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*. Oxford University Press.

Trudel, M., D'Agati, V. und Costantini, F. (1991). c-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice. *Kidney Int.* 39, 665-71.

Ullman, B., Gudas, L. J., Cohen, A., Martin, D. W., Jr. (1978). Deoxyadenosine metabolism and cytotoxicity in cultured mouse T lymphoma cells: a model for immunodeficiency disease. *Cell* 14 (2), 365-75.

Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R., und Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229-40.

Wakayama, M., Blackburn, M. R. Jurecic, R. McArthur, M. J., Geske, R. S., Cartwright, J., Jr., Mitani, K., Vaishnav, S. Belmont, J. W., Kellems, R. E., Finegold, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Bradley, A. und Caskey, C. T. (1995). Disruption of the adenosine deaminase gene causes hepatocellular impairment and perinatal lethality in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92 (9),3673-7.

Wang, D., Shin, T. H., Kudlow, J. E., (1997). Transcription factor AP-2 controls transcription of the human transforming growth factor-alpha gene. *J. Biol. Chem.* 272 (22), 14244-50.

Wankhade, S., Yu, Y., Weinberg, J., Tainsky; M. A., Kannan, P. (2000). Characterization of the activation domains of AP-2 family transcription factors. *J. Biol. Chem.* 275, 29701-8.

West-Mays, J. A.; Zhang, J., Nottoli, T., Hagopian-Donaldson, S., Libby, D., Strissel, S. J., Williams, T. (1999). AP-2alpha transcription factor is required for early morphogenesis of the lens vesicle. *Dev. Biol.* 206 (1), 46-62.

Williams, T. und Tjian, R. (1991). Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev.* 5, 670-82.

Williams, T., Adamon, A., Luscher, B., Tjian, R. (1988). Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev.* 2, 1557-69.

Williamson, J. A., Boshier, J. M., Skinner, A., Sheer, D., Williams, T., Hurst, H. C. (1996). Chromosomal mapping of the human and mouse homologues of two new members of the AP-2 family of transcription. *Genomics* 35 (1), 262-4.

Woodling, F.B.P. und Flint, A.P.F. (1994). Placentation. In *Marshalls's Physiology of reproduction* (4th edn) (Lamming, G. E., ed.), S. 233-460, Chapman & Hall.

Wubah, J. A., Ibrahim, M. M., Goa, X., Nguyen, D., Pisanom M. M. und Knudsen T. B. (1996). Teratogen-induced eye defects mediated by p53-dependent apoptosis. *Curr. Biol.* 6, 60-69.

Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R. I., Ornitz, D. M., Leder, P., Deng, C. (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* 125 (4), 753-65.

Yang, J. T., Rayburn, H., Hynes, R. O. (1995). Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* 121 (2), 549-60.

Zeng, Y. X., Somasundaram, K., El-Deiry, W. S. (1997). AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21^{WAF1/CIP1} expression. *Nature Genet.* 15, 78-82.

Zerres, K., Mücher, G., Bachner, L., Deschenes, G., Eggermann, T., Kääriäinen, H., Knapp, M., Lennert, T., Misselwitz, J., von Mühlendahl, K. E., Neumann, H. P. H., Pirson, Y., Rudnik-Schöneborn, S., Steinbicker, V., Wirth, W. und Schärer, K. (1994). Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen. *Nat. Genet.* 7, 429-32.

Zhang, J., Hagopian-Donaldson, S., Serbedzija, G., Elsemore, J., Plehn-Dujowich, D., McMahon, A. P., Flavell, R. A., Williams, T. (1996). Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381, 238-41.

Zhao, F., Satoda, M., Licht, J. D., Hayashizaki, Y. und Gelb, B. D. (2001). Cloning and characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2delta, with unique DNA binding and transactivation properties. (Im Druck)

6. Anhang

6.1 Humanes AP-2 β -Gen

1: Y09912

H.sapiens AP-2 beta gene

PubMed, Protein, Related Sequences, Taxonomy, OMIM, LinkOut

```
LOCUS       HSAP2B          32501 bp    DNA          PRI          30-OCT-
1998
DEFINITION H.sapiens AP-2 beta gene.
ACCESSION  Y09912
VERSION    Y09912.1  GI:1743255
KEYWORDS   AP-2 beta gene; transcription factor AP-2 beta.
SOURCE     human.
  ORGANISM Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
            Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE  1 (bases 1 to 32501)
  AUTHORS  Moser,M., Pscherer,A., Roth,C., Becker,J., Mucher,G.,
  Zerres,K.,
            Dixkens,C., Weis,J., Guay-Woodford,L., Buettner,R. and
  Fassler,R.
  TITLE    Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in
  mice
            lacking transcription factor AP-2beta
  JOURNAL  Genes Dev. 11 (15), 1938-1948 (1997)
  MEDLINE  97415318
REFERENCE  2 (bases 1 to 32501)
  AUTHORS  Buettner,R.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (09-DEC-1996) R. Buettner, University of
  Regensburg,
            Institute for Pathology, Franz-Josef-Stauss-Allee, D-93042
            Regensburg, FRG
FEATURES   Location/Qualifiers
  source   1..32501
            /organism="Homo sapiens"
            /db_xref="taxon:9606"
  mRNA     join(<7658..7705,12122..12580,17347..17406,
24530..24751,26702..26818,28883..29026,31821..32122)
            /gene="AP-2 beta"
  gene     7658..32122
            /gene="AP-2 beta"
  exon 1   <7658..7705
            /gene="AP-2 beta"
            /number=1
  CDS     join(7658..7705,12122..12580,17347..17406,24530..24751,
26702..26818,28883..29026,31821..31874)
            /gene="AP-2 beta"
            /codon_start=1
            /product="transcription factor AP-2 beta"
            /protein_id="CAA71047.1"
            /db_xref="GI:1743256"

/translation="MLWKLVENVKYEDIYEDRHDGVPSHSSRSLQLGVSQGPYSSAP
PLSHTPSSDFQPPYFPPPYQPLPYHQSQDPYSHVNDPYSLNPLHQPPQHPWGQRQRQE
VGSEAGSLLPQPRAALPQLSGLDPRRDYHSVRRPDVLLHSAHHGLDAGMGDSLHLGL
```

GHPGMEDVQSVEDANNSGMNLLDQSVIKKVPVPPKSVTSLMMNKDGFLLGGMSVNTGEV

FCSVPGRLSLLSSTSKYKVTVGEVQRRRLAPPECLNASLLGGVLRRAKSKNGGRSLRER

LEKIGLNLPAQRKAANVTLLTSLVEGEAVHLARDFGYICETEFPAKAVSEYLNROHT

```
DPSDLHSRKNMLLATKGNFVKNLRIYWRRTGHR"
intron      7706..12121
             /gene="AP-2 beta"
             /number=1
exon 2      12122..12580
             /gene="AP-2 beta"
             /number=2
intron      12581..17346
             /gene="AP-2 beta"
             /number=2
exon 3      17347..17406
             /gene="AP-2 beta"
             /number=3
intron      17407..24529
             /gene="AP-2 beta"
             /number=3
exon 4      24530..24751
             /gene="AP-2 beta"
             /number=4
intron      24752..26701
             /gene="AP-2 beta"
             /number=4
exon 5      26702..26818
             /gene="AP-2 beta"
             /number=5
intron      26819..28882
             /gene="AP-2 beta"
             /number=5
exon 6      28883..29026
             /gene="AP-2 beta"
             /number=6
intron      29027..31820
             /gene="AP-2 beta"
             /number=6
exon 7      31821..32122
             /gene="AP-2 beta"
             /number=7
```

BASE COUNT 9262 a 6657 c 7119 g 9364 t 99 others
ORIGIN

```
1 gagctccaga tacactgtgt ctccaatatt cagtctagtg aattattagc aaaaggaat
61 tagaacataa ggaattatct gttcttctctg aatccatgct agttctgaga tctcttcatt
121 cccttccaga attgactaac tgcacttttga caaactaaac tatcattttc ttagggaaac
181 aatagtatga ttccccatct gtagtttcta gtatccatct agtatcaccg nnttgtgttg
241 ttttnntttt agaccgagac tcactccgtc gccaggctg gagtgccttg gaatgatctt
301 ggctcactgc aacccccacc ccttgagttt gagcaactct catgcttcag cctcccaagt
361 agctggaaag ctggaattac aggtgggcac cacctcacct ggctaatttt tgnatntttg
421 tatttttagc agaaacaggg tttcaccatg ttggtcaagc tagtctccaa ctccggacct
481 ccaactccag acctcgnctg cctcagcctc ccacagtgct ggaattatag gcataagcca
541 ctgagcctgg ccttagtacc gctctttctg aagaatgaag tgttttccag cctttgctat
601 tggacattgg tttcactctg catactttat caaagattac taaccataat tgtcaagatt
661 ataactgcaa attccttttag tacattagat gttattcttg tagacataca tccttgaatt
721 tttcaaagtg cctattaagt actagtgact agttattaaa ataatttct cttccctcaa
781 gctatatcta tggcttgaat gtatgtgtcc ctccagaatt catatgttga aatccaactc
841 ttaatgtggt ggcattaaga aacgaggcct ttgggaggtg accaggtcag gagggcagag
901 tcctgggtgaa tgggattagc gcccttataa aagaagcctg agggctaggt acggcggctc
961 atgcctgtaa tcccagcagt ttgagagagc gaggcaggtg gatcacctaa ggttgagagt
1021 tcgagaccag cctgggtgaa atgggtgaaac cctgtctctg ctaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1081 tatatatata tatataagaa attagctggg catagtggaa ggcaccttca gtcctgctag
1141 tcaaggtggt tgaggaggag aatcgcttga acccaggagg tgaaggttgc agtgagctga
1201 gatcgcgcga cgcactcca gccctgggtga cagagcaaga ctccatcaa aaaaaaaaaa
1261 aaaaagcgtg agagcttgtt ggcccccttg gccttccac catgtgaggt aaccatctat
1321 tggaacaggc cctcaccaaa cactgaatct actggttaac taatcttgggt cttcccaacc
1381 tctagaactg tgagcaataa aatgggtgctg tttataaact acccattcta aggtattctt
1441 tttggccata cataaaaact tatttttatt gcaaacaac aaaaaagaag aagagaaaga
1501 gagaaaatgg tcagaaatac aacacataag attaggaatt taacagcatc ctacattctg
1561 tcctaattggc agcataatta ataggaatga atggctcatg tgcttcctgc cacagctggg
```


1621 aagtattttt tttatagcag ctccacaaaa ttaagacacg ggtttcttat cctgtctttg
1681 tttgctttct tctaagatcg tattcctaaaa aaatttttgt gattatcatt tactaaaaaga
1741 ttggaaccaa ttatttttann ctctctcaca ctctctcaca gagggctcca gaaagatgag ccttgctgca
1801 acatgctcag aaagaacact ttcatttataa tttttttggc tgggtcccagt gggtcacatc
1861 tgtaatctca gtgcttttggg agactgagga aggattgctt gaggtcagga gttcaagaca
1921 aacctgggtca acatagcaag accccgtttc tacaaaaata aaaatagaaa ttagctaggt
1981 gtggtggcat gcacctgtag toccagctac tgggggaggc tgaggtgga ggatttatg
2041 agcccaggag ggtgacgctg cagtggtcat gtgatcacgc tactgcactc cagcctggac
2101 aacagggtga gaccctgtct caaaagagta atatttataa taaaaaaatt aattaattac
2161 tacttgatgc ttttatcagt ttcataaagt ccattcctat ggaagaagct tgcatacac
2221 ctagtaaat ttcctttttt ttttttttgg ttatcctat nagacggaat ttgnttcta tccccaggc
2281 tggagtgcaa tggcgtgatc ttggctcact gcaaccacca cctcctagat tcaagcgatt
2341 ctccctgcctc agcttcccaa gtagctggga ttacaggcgt gcgctaccat gcccatgtaa
2401 tttngnctt ttagtagaga cgggggttca ccatgttagc caggctattc tcaaactcct
2461 gacctcaggt gaaacacca cctcagctc cgaagtgn aggattgca ttagctagctt
2521 ctggnccgat tctcctcatt ttatcaacga gaaaactgag atctggaaag gtcagaggac
2581 ttgcccagg gaataaact ggtaagtga aaactcatct tatgtcaaag aaataaaaa
2641 gaggcataaa atgaagatcc ttccctatt ttatcagaat gtcaaactcgt gaattttagg
2701 aagtagnctc aatataatgc taattttcc caaatgtccc ttgtattat tgtgcaaac
2761 agctctgatg ctatacattg tatgtgttta ttcattgctt aaaggttata tttctgctct
2821 acatctttca aagtctttat ttgcaaat ttttcctcac agatgtgtac tgggtcactg
2881 gntgcatgtt gaaaccaa tggtttagt tctcaccn caagatttct ccttcttaa
2941 agtaaatat ggaacacac cacaatgat aaagtacct tctcctgca tctcctgctg
3001 cagaggagac acacacctc cacattgtga gtgtgaaatg cccattggtg ttgaaaaca
3061 ttgttgcatg gctggttgca tcatgtgct cagcccctca tcttccctc cttaacctc
3121 ttacctcaa gagataggaa tttcaaaact gtccccttag ccacttcata cccccgtagt
3181 taacacgaaa agcttaagg gatcaggaca tctaaaactc ataatgaaa tactattgct
3241 cctcaaaagt cccagggaaa ggggtgagtt tcacagntac agntatttt attctcaaa
3301 gtgatttcaa ctccagatct tttacaaat tacaatgta ccatcaacta aatattatga
3361 ttaaagtaag aaatgctct tccctgttta gtgcttgct caatctcgat aattatgaag
3421 agtcagtcta aagataacc caccacatt tcatttttta aaaacactc tgtgcaaca
3481 ttagtccctc ctattttgt tctcataacc aagtactga aacctatag gtatcaaagc
3541 cctagaaatc tgaaggcagg tgcttaaat gtatgttcag acattcaaca gtatttgtt
3601 tccaaattga tgataaaaac acctactgaa tcttcccaa aaatataatc atgagaaagc
3661 ttaagacaga aacatggtag gaaaattagg agccagact caacagtaaa aaatggagct
3721 gtcattgttt atcattttt aacttatcaa gatctgttat atggatgctg tgtcttatta
3781 ttcaactcag nagncaataa tgcttctgat gggtaagagg tgggccaata tctgaggatg
3841 ctgaagtaag acagtttttc ctctctctc tcttctctt gcctactatc aaatccagga
3901 ctataaaaaa taaccctgga cataactcaat gatccaaaaa tactgtctc ttaactcag
3961 aaggaaagaa gtaagacagc atcatgagac tgtgggcaa gcggtgagta cacagtctga
4021 agacctatat tgggtttccc acctccact tctaaccagg agtttatgn aaatccctgg
4081 tttttagaag cctccactt cctgaccccc cgtaagtgt tttgagacaa tgataataag
4141 ttaaatgtt tatgaagcaa tagtaccac atatatttc atatatttc ccacagata tttttaata
4201 aattttcaca atcatttcca tttttagtt cagtgcactg aacctcaggc tattaatag
4261 cctgccccac cgcctagaat gagaaaggcc aggggtgcaa ctggcaca taatttcaat
4321 tcttgacttt tctaatttta ttatttttgg cggttgggta gatggaaagg ggaaccag
4381 ggagactgtg taatggaaaa agaaaagggtg gtacagtggm gtacagtggm catctgcaaa
4441 tcatggagtg ttaaccaca ggtgcaaagg tgagggctag tggaaagga gaantcaat
4501 aaatttagat aattcataat tagattttta gaagaaagat gaaagaagac atgaaagtgc
4561 tcttagttga ccttgattta ataagatgat ttttctgtac attttttaa aaacagctcct
4621 gaacatactc cgaaaatcac cagcagagg cctcatgctg ggtgcattt ggtgcattt
4681 tagactccga cattcttgcg ggaatagtt cctacgtca tgtgatgag tgataacgcg
4741 aaaggtaata gaaagtaaaa gcaagagagg taggttcaag ttagggaata attttctccg
4801 tagcggctga gcttttatt ctgagcttct tcgggcgttt gaactttta agatgtgga
4861 acggatcggt ctaaaattag taaatcatc aagaagtga ctttaaaaa gttcctc
4921 ataccaggtt ttcaagaac gaaagaacc tttgcccga aagaaatcaa ggagacttgc
4981 agggtttgcg tctataaaat tccgacagag ggcgctgtt cccgttcaat gacagggaa
5041 ggtccgtggg aacggtttac cttgcaatgt ctaggacttt tgcgaataacg cccaggttaa
5101 aaaaaataac taggatttta attatgtta tgtattttga aggtatttct ctatatat
5161 gtgtatattt ttaggtttat gcttcattct taataaaacc agatttgta ttttccaggt
5221 ttcctaaaga acttaattt taaccaata tctcaagata tttccactt aaaaaatacc
5281 taatactagc ataaaataa attacacata aaaagtgtga aattattct atataaggct
5341 ataaaatagt tatactaaca caataccta tattatttta atttatgtg aaaattatc
5401 cttgcagggt ttgttttgtt aaatctcaga gtttatttat tttagactg gcaataat
5461 ccccaaaaag atattaagag gtgttaaaag catttagaga aaaaaagtga gattttcca
5521 aatgcatttt atttgggtg taatgatct taggtaataa caatgacaga attattgat
5581 tgaaggagg aaaacaatta tttccattaa ttaaagtct tgtgcctgga gaactgaa
5641 ttccaagtct ataataatta tctttcagat tattgatctg gcaactgatt tagttctaga
5701 agtcaggggg tgtggaacc gtttcaagtc ccaccacaca ataagattaa gaaaaatccc
5761 ttctcatctc ctaactagct ctggaagcaa agaagaaat ctttgctgat gctcctagt
5821 aaaaatctgt atagattgtg tatgatttaa ggttaacatt tacaggggaa gaaaggatg
5881 gagagagaaa ggaaggaagg aaaagggaaa tgaaggaag aaaaaaggaa acaaaaaagg
5941 aggaagagga gaaaagaaa gacgaaacat aaaaaattca accggaata aggggttat
6001 ttctgaagt ccttctgaag caccttttt gtgttcttt ctttgactt atcttataa
6061 attaaatfaa aaatctgcag aattgtttt tctgcagtt atgaagctc tcttgggtt
6121 tgattgaatc gacgtccaac aagggtgtcc ggagccctgt actcaacag cgtccatccc
6181 tgttcgcgca gagctgcaca cagcagctct ggatttaaag acaatcacc tttggagatt

6241	cactctcacc	aggcttaata	acttccacc	caaattgccc	catccctcct	cggtccctcc
6301	tgggaatttct	tttctgtccc	agggcgagag	atcctcctct	ggggcgtctg	tccggctatg
6361	agaagctctc	cgcaccctga	aagggagtag	aaaaacagag	gggatgggaa	agggggaaaca
6421	ggggaacaga	tgagtattca	tttcatgata	aaattcagaa	tccctgcgcc	ttaaatggtg
6481	cccattttct	aagtctggtt	aatattgctc	ttgttgctga	tgatgttttc	ctttttaaaa
6541	actatatgaa	tcatcttatt	aagaaaaatt	atancaanca	ggagaagaaa	ctccacatgc
6601	actaaaatat	tttctactat	ctctttgaag	acattctgct	taaacccttt	caaagattcg
6661	ggtggccctt	tcttgactct	ccatgattaa	aaccacttac	aagtcataca	caacagatgc
6721	aaatataaaa	tgctccttggc	ctctgcaaaa	aaggctcaaa	attaaccttg	tctgaacgtg
6781	tgcgtagcgtt	gcttccaaca	tctgaaaaaa	acttgataaa	atgggagactc	cagccaagag
6841	gaatgggtgca	tggaatccgt	tgaaaatgca	tacaaacaac	acctaaaata	acaagcagca
6901	caaactgagg	tgtattttaag	tttccaaagg	ttttaggtaa	actgaccagc	aaatattaga
6961	gatgggtcatc	agcgggtggct	agcttttttg	ttctatgggtg	acagagataa	agttaaaaaga
7021	gggnnagatc	tgtagccatc	aacacagaga	tagtccttaa	aatccccctt	atccagcctt
7081	tcaaaaatct	ctcttccgga	acatacatga	ataggaggga	gcttttgtgt	ttaaaaactc
7141	tggtaaagtgt	ccccctttaa	aatctacata	gaaaaatagg	gactgatggc	ccctggtttc
7201	tcattatgaa	ttgcaaagac	ttcagttagt	ggcgacaatg	atgtgtcatt	ttcgatatag
7261	aaagtataaaa	atgtatataat	tatattaatc	accctgaaca	actctttgtt	aaatgcacat
7321	ttgggtgctg	cagactgtgt	agccagaggg	tgcttatata	actatatatg	ggtgctggg
7381	tgtaaatacgt	ggtttatgat	ttttatagta	tatatgtctg	tggttgcat	ctaactcctg
7441	tgtgtgcaat	aatgtttttt	ctctttgctg	aggcttactt	gtccagccta	ttgtttgaga
7501	caacagatat	aaagtgcgat	gggagagggag	cgctcgattt	ggtggtgatc	ccccatttcc
7561	aattatagat	ggatcattac	agcacagcga	gtcctgagaa	gccagacatc	tgctcctcac
EX1 7621	atgaatgcac	tcacctccta	gagaccaggc	tgccatcattg	ctctggaagc	ttgtggagaa
7681	tgtcaagtac	gaagatatct	atgaggtgag	tcgacacccc	cagatgcacc	ttagagcttt
7741	gcagatagag	aatttgagct	tcttgatacc	ccaaatgata	tatatnttta	agctattnac
7801	tcgnagcatt	tccggtcgg	tttctcagct	tcttctaac	tttttagaaa	agctggctag
7861	ggaagacttc	gctgctctga	aagggattta	gggtgaaatc	tgacaacttt	aatttaggaa
7921	tgtttttatt	tattttattt	ttctttccct	tttccctcgc	tccccccacc	ccacccacc
7981	cttttaagct	ctgatgggga	atgtgggtgt	actgaatgtg	ggcacgctct	cagagaaaaat
8041	cgagattctg	ataaagtcag	gggcttttct	cgttttaagt	gtggaagaga	attgggtttt
8101	caagcctcat	ttgtaacaga	ctcgggcttt	taatttttat	tttcaataaa	atctctgaaa
8161	ttgataacaa	atggttccac	gtagaggaca	gagaattagc	gggaaagaag	tagatggctg
8221	gagatattgga	tggatagagc	aaaatagaag	tcgtagcagt	ttattagttt	ctgttttctt
8281	gtgttttctg	tccttgagg	tcactgcctc	cgaacagaaa	tcgcagccgc	ctcctgtgtg
8341	ggcatctttc	acggaaattt	ctgcccacgt	tcaatgcgta	cggtctcta	gcaactgaggc
8401	tagctcaact	cttcggggca	ggagaagtgt	cgcccagcca	ggaggagcgc	agccgcctcc
8461	ggggcccgga	ccgcgctcgc	caaagccctt	ttcgggctcg	ggcgagggct	gacgcgccca
8521	gacggctcgc	ctactcgcgg	gcgaggcgga	ctaggcgagc	gaggcgctcg	gagggcgga
8581	ggtgggagag	gcnccgagg	cgggcgaggc	gcggggcgcg	cgggggcca	gactggggac
8641	cggggaagccc	gctgagcctc	gcttttaagc	ggaatggtct	gggacagccc	caggtggttt
8701	ccaggggaag	ggaggaaggg	aaggttcttc	tgagacgtcg	aggttgaaa	taaaaacttc
8761	ggaaaagcga	agcggattta	gaaaaggagg	gaactcgagg	cgggcgaaag	cgggcattgga
8821	gatttgctaag	aggaaaagt	ggagagaaaa	ggaaggaaga	gaagcagact	ccggggtggc
8881	gggcgcgggc	cgctaggtca	gacgaaaggt	ggagggatgc	agaggctccc	caaagagccg
8941	agaaagacac	gcgacccctc	cgatcgggga	cagctcctga	aaagccggtg	cagagccgcc
9001	tcgaagatcc	taagagtgg	cgactcacag	gcgcggccgg	caagctcctg	gggctcgg
9061	gctcggctga	gcacccacag	tcagcgcctg	gcgcccacac	ctccttcccc	ccccgaatcc
9121	taatgttggg	gtgtgtgtat	gtgtggaggt	atgtaggaga	gaggaggagg	agataagaga
9181	ggagagggag	aaaagcagga	gagagcgga	gagaacagag	aggagagaga	ttggcttgt
9241	tgctgaatga	tgcttgggt	ttctcttttc	cttttggtg	tggtatcga	ctgtaacgaa
9301	gagccgcgcc	tacgcgctg	gtggggattg	ttcgggtcg	ncctcctttt	ctttccttaa
9361	caggcgggat	aatgggtaag	tcgaagcgc	tagaactgtc	ctaaagaata	ttagcgccca
9421	aagtgggcat	gacattagca	agcacggggc	catggtgaaa	acagctcaag	ctatatgcac
9481	gcagagggcat	ttcagtggtt	ttcaaaaagt	aaccagggta	acattcgttc	tttacagaaa
9541	gtaaagtaag	ctaaatggaa	aaggaaggag	ggagagaaga	aaggaggagg	ggagagagga
9601	agagggaggg	gtggagtgga	agggagggaa	gagagaagag	aaaagagggg	agggagagag
9661	agaaagagaa	ataaacaggg	agagagaggg	aatattacag	gtggtcctat	ctgcctaaat
9721	ttctgctccc	aaaaacagaa	tccgcagctc	ggtggaagga	ncctatttaa	gtctggacta
9781	aggttgaact	ttaacagaaa	tggcagtcag	gccagttgaa	cggttctctg	aaacacccaa
9841	anggtttctg	ttccccctgg	cttttctctg	aaaaggataa	gtttagtgta	tntgaagatt
9901	gatggcgat	gtnttaaatt	gaggtaaaga	tcgcanacta	tgtgagcact	aaacagggna
9961	aggctgcaca	ggaatgaaaa	gcctccatct	cgcttctgtc	ctttaacaaa	tgagcataat
10021	cttccacatt	tagcaaaaagt	ctncnaaagt	caactgtaaat	aaccaggccc	nccaatttgc
10081	ctttctctcg	cnccaatgt	atgaagcaac	cctttttatn	ttgtttttgt	aatcctcaca
10141	caaagcacc	aagggcgacca	agtccctcgg	attaggaaag	tctctctcca	ggttaggaaga
10201	cacctccatt	ctatacaacc	tccagcact	gttctcctc	actgcctta	ccaaaggagc
10261	aggggctgct	ttactcgtgt	cnccggcaca	gttaattgaa	gttctgctc	tttctgcta
10321	aactttttcc	ccagtctgcc	nttgccagcc	ccctcgtctg	attacatcta	gtaatttctc
10381	actgaatgaa	cgtcatttac	aatagtaggg	gagctctgctg	ctcgtgctg	cttaccgctc
10441	catttgtcct	ccattctccc	tttaaagtac	tcgtgtaata	ttaatagtc	tgaatcaca
10501	ttattatgag	gcggtgtagc	caaacggagg	gaggaaggga	cgccgagca	gtctgaaccc
10561	aacttcgggt	gaaagaggac	tgcattcggga	ccccgnaga	acggcagnag	aaaagagccc
10621	cnaaagacan	cnagagaca	gatgaanagt	tctgtctgtg	tgtgacaggc	atccccatc
10681	ttgttgagg	ggggggcg	gtgtaaat	ttttttttt	tttttgatg	cttgtcctgg
10741	aaacacatca	agctcagctc	ctgtgtccag	ctcgcttctc	tgtggtgactc	cttattttt
10801	ttttaatcat	tgtttgattt	tgagcagtaa	ccaggctttt	ttttccagat	gttagtccac

10861 acctattcat ccatggtgag tttggattca cgtgttacca gaattgcatg ctccccctc
10921 tcactgtctc tctgtctctg cgtcctctgt gtgtgtgtgt gtctcacact ctctgtctct
10981 ctctgtcttc ctttgagcgc ctttgccctgt gtaathtagc accataatg gacgagctg
11041 cagctgcttc tctctgcatt gtgtgttctc cgtctgagct ccatgagtca gctgggaggg
11101 gagaggccga aaagaaaaac tttttatttc ccattgctgc ttggaaattt aggtgactat
11161 ttctgcaaaa agaacctagg ggagtttacc atgatgtttc cagagaagag agggagaanc
11221 aaagnccacc tocctcataa acacacctcc cccttcttct ttcacttagt tcacactcca
11281 gataggacca ggaataagtt gtctgggctt tttttcccc ccacccaac tttagttcct
11341 tcaattttcac atcctgagta taacagcatt agatatagaa aaacagctct agaaataact
11401 cctatgaacc acaactcaac ttaattcctc attggcttag gatagattt cgaatgagat
11461 ccattttcaat gaaacactat ttaagttatt taatttctcc tggagaggga ggagtgactg
11521 ggaactcaga ccagggtggat tcttgaggc tcttggaatg atcagggtgt gtggaaagct
11581 cctcctaatac agccagctgc atttccagcg aaggcagaag ttggttttaa atcaggggga
11641 gcagtacagc aaatactatg aagttttatt tgttgtgatt tgtacctctg gaagagttag
11701 aaaaagtag ttaaaaacac ccagaggagc aaacaccata tghtaagact ctacaatttt
11761 aattaaggca tttagaatct ccctccatac acactgttcc tgtaccctcg ccttgtggct
11821 gctttgcaat cccccaaaag cggctaaaat gttatagtta agtgggtgat tcctttcca
11881 ttttctcccc aagcctgggg tttgaaatg ctgaaatcat gtggccctct agtcaacttg
11941 ggggtcaag tttcagatcc ttgcttccct tgtcccggga agagcgtaca agagcggc
12001 ttctccattt gtcacttgta tttttttct tctctctgt actctctgtc tctctctgcc
12061 tctatctctc tttctctgtc tcttctctg gctctctcc ccttctctc tccgctcca
Ex2 12121 ggaccggcac gatgggtgac cgagccacag ctcgccgctc tcccagctgg gctcgggtgc
12181 ccaagggacc tactcgagcg ccccgccgct gtcccacacc cctgctcgg acttccagcc
12241 gccctacttc ccacccccct accagccgct cccctaccac cagagccagg acccctaact
12301 ccacgtcaac gacccctact cctgaaacc actgcaccag ccccagcaac atccctgggg
12361 gcaacggcag cggcaagaag tgggttcgga agccggctct ctccctgccc agcctcgggc
12421 cgccctgccc cagctctcgg gccttgcacc ccggaggagc taccactcgg tcccgccggc
12481 ggacgtgctg ctgcatctcg cgcaccacgg cctggacgag ggcattgggtg acagcctctc
12541 gctgcacggc ctcgcccatc ccggaatgga agacgtccag gtaaccacaa acaacaacaa
12601 aaacaaacaa aaaagaccac gaataaggaa tgccttctgga gggggggagg tcaggagagg
12661 gcagctctgt ctctttttgg ggagtgtgt cccatgttta gaacaggact agacagcat
12721 atagaactgt ttatgtgtgt ctgtatgat ggctctatag tggcgatttc cagaggtcta
12781 attatgatca tccaaaccac gagaaattaa atcttgaaga agaaaaatc gtatttctt
12841 tgatacetta agattattag aataaaggcg aatgcttttg tctgacctca gtcacctct
12901 cctgcataat ctctagtgtc ttgtggaagc cagcttggta ccccttctt accaacacac
12961 acaccccata gtggggctgt cctgctgact tggcaggatg agacctggct gcctagaggc
13021 tagagcttca gaatgaagt ccaggggct ctgtatgctc cagaggttgc tgctgaattt
13081 cgaaagattt tgctaagcat gacaatgagc tctgatcatc taagccaggt ctgttttga
13141 atgtctcata agccacagag ctttttcca agagatagt gcagctcta tctgagaaat
13201 agaataatg tgaaggagaa actcagaacg ccataattca ggagtcctat atggtagata
13261 ccatttttgg aattcttttc acttnttggg ttcatatag actgtatgt aatattctc
13321 acctccctct cctggcctcc gctatatta acactctct ctccccact ccatcatccc
13381 gagttgagag gcatcacgag tttatttctt aaaacaaaag gctcaaaaac cccccctac
13441 ccacccacta tcccatctgc agtctacaca atggagcctg atttgggtga gaatactgg
13501 ttaactaaa caaagaaaca tcaaagaaat gattcctaaa aactgttgg gtgattctga
13561 gcaggtctgc tttttcacc taagttaat agttggcaga aaagataaat atagtttaca
13621 ggtatgtaat tgacacttca gtttcatag catagttgta tttattatg tttattgac
13681 atacctctga agcaaaggaa aataaaatgg gaaagagaag aggggtgca agtcatctt
13741 ctgtaccttg ctgaaaaaaa atagttttaa acagntaaaa tgtggtgaca gcatcaaatg
13801 ctgtctgtgt gtgggtctat attgtttatt gttttaaaag aaattcagtt atttatttt
13861 ttaaaaaaga cggaattacc tgatttctgc ctggatttacc tgatagtag aagatgtag
13921 atggttttgt tgatttact gagcttgact gttcctggct agagatattg ctcatctctg
13981 aatatcatat gaaaaaggaa gtatttataa gnttttttt taatgcatg ggggtaatat
14041 gtgtctcgag ggaaaagttt ttaaattaac ctctctgagt atggttcaa gtgctggata
14101 atgaaatgg atcaactcat caccattact gttgatgat ctaatgcgg cctgttacc
14161 accaccctac aggcctagtg actctagcga aggaactcag aaatTTTTCC cccaaaagaa
14221 ggagcagttt tctttagtta aatgTTTTA aagaaataat tgagagaggt ctttttTGT
14281 ttgggtgaaat tcaaagtctg agagaaaaac agggccagat cagtgcacat ttgggagaat
14341 agtcttgtca aagcgtcggg aaggatttag tgtttatgtg aacggagcac ctcggggcca
14401 agttgttgct gtcgggaata cagaccacag aggtagagag ctgaaaggag aaaagcagca
14461 ggcagcacac cggagccact tgcaggctct ccaactcacc aacccccacc ctgttctctc
14521 cctgctttat ctcatctctg cacctgcctg gaggcccag ggacctctt gggacgacc
14581 ctatagtgca agggacacac cctgctctg tccctagagg tccctagagg gaaacagca
14641 ggtctctgcc tccgcggtga tgacagacct cccgaggcca ggggtgaagt gactgatgca
14701 gggcaggtga caaagaccag gggttatgt tccaggacca cagcctcgaa tccgaaggct
14761 tccaatcctc tgctcaacac agaaggatcc acttccagat taggaagctg ggggtcgggg
14821 gctaaagtta cacaagcagg ttgggatctc aacgctctcc ctacagctc cgaatgggtg
14881 gctgcaactg gtcagctctt taaaagggtc tgcactggctc cagtctttaa aaggaccaga
14941 gagtgcctag gcctggacct taaagtcact tgttccgat tcaaggacct cgtgtgtgt
15001 ccagatccc ttgagccagg gagctggcag acactgaggg tgctgcctct cctatgggtc
15061 gagggttttg tttgtgacc cagatgcacc acactcaggg ccacagccc caccatgaga
15121 gaagagaaag aggagagcta atccacaaa tgccttctaat attttttaa atgaaactat
15181 aaaaccctgt caatttctat ttcaatttcc tcacaggggc tattaacta gcaaatcgt
15241 gtttgggttc tgggtatgct acatttccc catttgcact ggcgcgcgc gcgcgcgcgc
15301 gcgtgtgtgt gtgtgtgtct agttggggag ggggctacaa gtgttaaaa ctcaggaaaa
15361 cacctacaga gagagagaca gagggagtga aaggacacct agtttgggat ttgtttagt
15421 gtcattgtaca cctcttttct tcttcccacc tttgctctct tacctcccat cacctctacc

15481 acccatgaat ataacatat aaggatgta agccaactcc ccccaaacac atacacacac
 15541 tcaaacacac ccgagtgctc taaagcaacc cctgggatca cttttaacta aagaagtcta
 15601 gtaattacga gtctgagttg ttttctgcg ctcccgcatg cagtccctaa taaatccta
 15661 cgatcctccc tgtggcgatt aagcgccagc atgctgcgtg aatatcctgg acaaaaaacc
 15721 cagcaggcgn ccgtaattag ataggaaatc agacaagagc cttctcatta actaccacaa
 15781 ctacccccag tcgctgatga ggcgtttata catatttacg tacaagagtg agggtaaggt
 15841 gtgagggctc ccgggtccag gccagtgtaa gtcagggtct ggctgcccac ggcacaggag
 15901 aatattttctg tcctgcctgg acacattgtc actgtataca catgatcata gaaaggtgtg
 15961 aatcgtgtgt gtttgtgtgt ggcagggtcc cctgaggagt tatgaacaag ttacatgaaa
 16021 tatttttaaa acaccttttt actatttcct aagatgtgca tggcatgttg cagcaaggat
 16081 aacaattcct atggagaata acaattgggg tcacttttct gagaacaaaa gagtgactat
 16141 taaaaatgaa aagaaacaaa ttaacatgcc ccctgtacga ttagatcatc tcattttctaa
 16201 agttttgggtt gtttggggta gacagtcctt ttctgtgat gacctcacac tgcgaggatg
 16261 cagcatgagt cgggtgtgag gtctgtaaac agctcctcac tctcaaggcc ctttgctttt
 16321 tactttctta taaagtgggt aacaatttgg tcccaactta ggttttgaa ggttggaaag
 16381 tagttgtaga ttttagaaa acctagcatt tattttcttt ggtaggnaa gaaagggat
 16441 ctactggcct ttggacggcc ctgggatgca cagccagaac tgttcatgtg tattctgaca
 16501 gtaagaaact tgctccaaca gctatttcct ctcagaagtg ctaccagtgc tcagagttga
 16561 aactttcctt ctctggaatg aaactgtggc tctgaagatg aacattcctt gagtactcat
 16621 aggtgctgac tgggaggatc tagacctttt gtgggtgtct cttgtctgta gttactgcct
 16681 tctaacaggy tttgctcctt gctgggaagc agcatcagca ggactgggag gaagacttta
 16741 aattgtgaag gttcctccaa gagactgtca ttgtcgtacg aagaagetca tagttaaaca
 16801 ggaacttctg atgggctgt a atgggtctc agtccatgat accttgcaaa accttgcta
 16861 ttttttgctt gtttgcatc cattccaaat tgctcagact ttaattaaaa tcccataatg
 16921 taaactatta tttatttgta aaatggctct ggggttaaga tgcactggga tagaatggaa
 16981 aacacaaatt ctcttactaa tattgttga tctgtcagct gttgccaatt tttacaattc
 17041 ataagagcaa ataataaaa ggtcttatc gtctaatac atgtttttat tatgttttat
 17101 aaccaatggt gcatcccaga tgtctctcaa agtttttctt tctccacttc tcccattgg
 17161 aaaaatttat aatttgagta aatttcattc tctatgtcta tttggagta ataataata
 17221 taaaacagcc ctttgtgaat taatataaat ggaataaca gaaactccag tttggaata
 17281 catgatattat gtgtgcaatt ctttaatatc ctgtcaattt gaatagtgat gtttttat
 Ex3 17341 tcacagtcag ttgaagatgc caataacagc ggcataatc tattggacca gtctgtcatt
 17401 aaaaaaggta tggataattc ccccaaaaa gtaagcaaa tctctcatg cattaacgtc
 17461 tttttgatga attttctct tgggggaatt cattatttga caagacata atgttttgt
 17521 cacaattata ggacaatggc tgtcagatta ggggaaaggy ccatgttgg aagatggaag
 17581 ttgggcccaag gaagaatgaa aacatcagac acaaatcag atgagtgaga cagactgttg
 17641 caattttcc gtggcatat ttgtagccat tottgataca tottaataa ttgagctatc
 17701 atcatgtgtg gaattggctg gtaaacactg gtttcaagaa ggtgctaca tttattcaat
 17761 gataactgga gtttgcctg ttaaagctt ttttattgag tgttattgag atagctctc
 17821 tatttgattt ttttgggtt aattttattc ccagttctct atgttttatg agttgtttnt
 17881 atttatttt tttttcattg agacaaatnt gttgntaaat atgcgcaccc tgagaagctg
 17941 agacagceta tgcacatttc taaatcttcc tacatatgca ttcatgattt agtgtgactg
 18001 tggaaaccacc ccatactgtt aaagggcctg tgatataaca aatgtttgca gtttattgta
 18061 cagctgtaag caaaataatt aactaattaa actaattaaa tgtaattaca atactcattt
 18121 tgggtgtatt gcagctgctt aatttttctt gcttttctct gacagtcact gagagaatgc
 18181 ctggcgatta gtgtagctgc taaaaggcct gaatgtcact caaatgccac aaatttagga
 18241 gtttaaatgt gtaaacatgt caatctttaa ttatcacag caactggcac ttgacgtac
 18301 agttttaata ctgtaaccct ttcttatgga tgtcgaagaa attctgtctc tatatttagt
 18361 gtcaacaatc ctcagcttcc aatcatttat gattcacttg agccacttga cattcaacaa
 18421 aaacaattaa aagaaaaaat tctttgggaa gtaattcatc cagactcaa tgggtagta
 18481 ggggtttgtt ggaataagga tcccaaacag ggtgaggtat tctaaattgt cttcttttac
 18541 aaagtcagga agagtagctt tgaaggtgg gtgggggag ctgtacttgc aatgatgcca
 18601 tttggccttg gaatgaatat cctaaagtat agtaaggttt ggggcataac tatttatttt
 18661 agtggttgct tcaaacatct ctctctctct ctcacttca aataaatatg ttttgctttt
 18721 taatgccagc ttttgggtt gctaggatc ccaggctcgg ctagcttca ttgcttaatt
 18781 ctgactgaca gctcactttt cctgttttct cttgggtctc ctctttcggg taattgtctg
 18841 ttgattaggy tggggtcggg gaggagcttc tccattggct tttttcagtt ttttttagtt
 18901 cctcctcctt tttcatggaa agctagaacc acttagctca gggttctgta tccatagca
 18961 atcatttggc ctggcagggg aacatgccca acagatgacc aatcagaaat gttattaata
 19021 gccagtcaa taaaaatatt tghtaacttag cttgcctagc aaaacagagc tgaagatttt
 19081 ccttagatgt gggatgcttt ggtttcagaa gcttgaatat gtttgctagt gaaatgtgaa
 19141 tattttatgt caaggtgtc tccagggat aagagatcac gaataatgac taaagtgtat
 19201 ggttctgttt ttggaaacag aagagtatcat tttatgtccc cccaaatgta cagcttttta
 19261 aaaaatgtgc agcttaaaat atttaagtag catcccagtt actttaattg attcagaggy
 19321 tgtggatgaa atagatgaa aatggtaggt cagttgcatt atttaatatt tgacatattt
 19381 gctttattac atgaagaaaa gatcctatgt cttttttctt ttagagacca taggcaaaat
 19441 aagaatacga ggttgattta cttttctaac tcagtataag ccactttaa tttgggtgag
 19501 ttcattagcc ccttcccctg caccctagtc tctttgctca ccatctcccc aattatgaga
 19561 gatgtttcca agagatgaa tttgtaaaag aggtgagaaa gtcttgtgaa ctaaatatc
 19621 taaatttcaa cacctagaag aaggcttagt ttcttaatat attttctat ggggttttag
 19681 gcacataaaa aaaaattcta cctcattagt aacagattgg caagtgtct aggtttgggy
 19741 gtctctgagt ctgtgtttat gaagctagaa gacttaggca taaatgatgc atgtctctat
 19801 ctctatgtct ctttctccag ttatggtaag gccccttcta aaatttaacc aatcctatct
 19861 tttcacctgt gtttatgttc accccatagc ttatgggtct cctctctgt tagttgtct
 19921 atctgggctc taggctgaca tttctgaagt aatttaaggt taagaggaa tgagttgtc
 19981 ccagtagaga gaggcaaac agtggagtga aggtagccag cgtgataaat ggctcttca
 20041 ttgagatctc cagagcctgt ttaccggctaa ttttctgtat tgccccctta cgtgtagcaa

20101	cttcgaggac	cgtggccct	ctcctcttag	ctgccccatt	agagctccca	ttaagctgcc
20161	tagtctcaac	tccattggcc	ggagtnnnngn	gnggnagtaa	tgaaagggtgc	tttttaaact
20221	ctcctaact	aaaccggcag	agggtggtta	ataccatttg	aagggggctg	gtcaatgagc
20281	aatcaataaa	gtaataatga	gaaggattcg	gtacattaac	agtctaaaaa	tccaacgaga
20341	cattaataaaa	tcattcttaa	ctctcagttc	cattaagatt	agaaatctgg	gnngannaag
20401	agggtgtacc	agttaataaa	aatgatcact	ggcacgatca	tgttgctaac	tccaaaaaaa
20461	ggctgaacct	aaagctttaa	ggaaaaaggt	ttttgggtgca	ataagaaggc	caaatgcaa
20521	tctgtttaac	aaagcttagac	nggaagaaat	attctgggat	ttcttggaaa	ggctagcgtg
20581	gctggaatcc	aaggctctcga	aaatggttg	actgctgggg	aatccttttc	attggcttag
20641	gatatccatg	tttggttagt	ttcagtttca	tcttccattc	tctttnaatt	tctttcccgt
20701	tagttctggg	ccccttcccc	acataaacac	tttgactggt	gtggatttct	tcattgaaat
20761	aaagaaattc	cgaatttcta	ttacaattga	ttctgttggg	ttcttctgac	ctagaaggta
20821	aaatgctctg	agagctctgtc	agagctctctc	aacggatga	gtttcctctc	aaaagggaaga
20881	agttcccatt	tccagggttg	acttggatcc	caatagctat	ttatcaacta	gagaccctga
20941	gaaacctcgc	agccactctt	tcaagctcag	gtaggttaga	cattcttctt	caacactcca
21001	agtgctgaaa	ctgagagaga	caataaatga	ctttctcaag	gtcctataca	ccatgtaagt
21061	gatgagactc	aactcagttc	cagcctttta	gccttctaga	ctctgtccct	ataagatgcc
21121	aataactggat	gtttgagttt	tttaatatcc	ctgctttatt	tgtggaattt	atthttttcc
21181	ccacaatttc	agtccccaca	cttatacatg	cactatagt	gtggaataaa	atthttacat
21241	caggtacatg	aggaagtgtt	tagatctgag	gaaaggggtc	tttgctgggtg	agaaaaagag
21301	tgctaacttt	tagggggccac	tttgagtcaa	tgctaagcct	cctgggtgtt	tcccaatgtc
21361	atthtacctt	ttaggtcaag	agtgctttc	gaagggtactt	accttatgaa	tctataagat
21421	aggttcattt	cttcccctctc	ctcaccactg	gatagaatca	aatacaagat	tcattgaaat
21481	aattcacact	taagtttaaa	gannagagag	ttaaaaaac	ttaggcctga	ttaanagacg
21541	ctthtagctct	tctatagtca	actaatgat	agtattttct	ctaactattt	ttctttctctc
21601	tcttttaaat	aaaactccag	ccatgttaat	gaaatattga	tctgttttta	gccttttttt
21661	actttcccc	agcataatgc	nngcnaaaag	ggaggggaat	gagttttgtg	gagttttacat
21721	ccagaacttg	gccttgacac	cngncaactg	ggaactgaag	aggaaaaaaa	tacttctaact
21781	gtatgcacag	aaaattgtaa	acatgtaaag	aactgaaagc	ttcatgctga	gttttgccat
21841	gccccatttc	cttactattt	cctgctgtcg	ctttaaacct	atctcagtc	tctctgggtt
21901	ccatggcagc	gaacagtgtg	ctcataatta	ctaacaatc	aaccaggccc	tgttgagctc
21961	tgggtttatt	gataaactgg	aagaaagcag	aagggaaaag	acaaagaaag	taaaatatgg
22021	ggttaatcag	gtgaaactaag	caggtgtgaa	agtggaaggg	aaagtagatt	atgatggagt
22081	tatggatcta	aaggaaagt	gggacaagaa	atgtgtcaga	tctggctctag	gggacaatac
22141	taaggagaga	ggtttagaac	atgaggatag	gaggctggga	acacaattgt	gatacttaat
22201	tagaaaatgg	aaatatagtc	aaagcacatc	ttctgacatt	gtccttgctt	tgactggaag
22261	gggaaaaaac	aaaaacaaaa	acaaaaacaa	aaaccttccc	agagagggca	gtgtactgac
22321	agaagctgat	tggattgggg	gtatgcaggt	gataatgtat	atgcagaag	gtactcaacc
22381	catggcaggg	agcaatatac	attccccaaa	ggaaatagct	cttgtcgggt	gaatcaggca
22441	attaacaata	gtgaaattac	agggtgggtt	ataacatttc	tttaaaggcc	cggttttcc
22501	agaggttttag	cttctgggag	ggagaagcag	gtaagattcc	aatacacagt	gggtatttgg
22561	ttatccactg	tgggaagcca	ggaagtgaat	ttagtacttt	cagtccttag	tggagtgggt
22621	tatttaaaaa	aatattctaa	atagatttta	gagataaata	tgttgctaat	tatagaggtg
22681	agatthttat	ctaatttatt	tctataattc	atatcatggt	aaaattacaa	agggccatct
22741	atattttgga	aaataagttt	ttccaagttt	tcataatgcc	aactcccctg	attgtcaatt
22801	atthgttttt	anngccttca	ctatgagctc	gaattatgga	aatcgaagga	acacctctct
22861	atatagcccc	tgtccccgcc	catgacaggg	ccagaatatt	tacctctgtg	ttgcccaca
22921	tcaattcatc	catctgggac	aaggctctggg	ctctgtggac	agatccatag	atcctaaatg
22981	cctaccctggg	tagtagcaga	agggaatggt	tagtctcctc	atccactctt	gtaataaagc
23041	tcttttccac	aagggtgtttg	taaaggatct	aatgaaattc	atagtaata	aatattggag
23101	cacctgctct	aggagctctc	aacaactgtc	agaaagtata	ctggaatctg	tggtagagaa
23161	taactgtaga	gaaatacaca	gtattgggta	gtctgttcca	tagaaggatg	ttatgcatct
23221	gttgatatat	agggtttctag	gtcaccagaag	caacagaaac	agcctatctt	ttccccacac
23281	aattacaag	tgagatagaa	ctttatcaaa	taggttaggt	tgggaaacct	cttttttcaa
23341	caaccagatg	catgtttcca	tagatttttt	ggactggtga	atcgacaaat	accaattgaa
23401	gatttggagg	gcctcatatc	ccagtggaa	aaggcaaagt	tacagggaaa	gtcaggaggt
23461	atagccacct	gttttagggg	ctgtaaaacc	tacataaaga	aaatgggctt	aagcagtgaa
23521	gtccaaggg	aaatactgcc	agggaactgg	gagattgact	gttctcatt	ccagccttc
23581	tggttccact	gagcctagcc	tctttctgac	atgcagatga	cactgaaaca	caattaaagg
23641	agaaatacag	gctggagagg	ctgaatgcac	cagggtagca	gtggcaacca	gctgtcaact
23701	cttattaact	tctgcataaa	acataccttg	agtgcggtt	gttatcaatt	acttgccgaa
23761	agaacaac	tggggcaagg	caagaccgcc	gctcatatga	attagagtga	ttggttgatt
23821	gatcagggca	cctgttgtaa	atcataactg	ttccaaacaa	tcactagccg	gtgctttaat
23881	ttgtaacaa	aattcatgtc	actgcagaat	tgctttcact	gaagatgagc	atthgggttc
23941	ctttctaact	gaatctgttg	ttattatgta	gggaagaatg	gggcccnaag	ctactttaa
24001	gagatgagca	gctgthttgg	gcccagctcc	ccagctcaat	ggatattatt	gtctgttctt
24061	gggcatagta	tctgatgggg	tccacctcc	ttatgatagg	cattattact	cctcaggaga
24121	cagataagga	actgaggagg	ttcatccttt	ctagtgatga	ccatagatct	gggtccaata
24181	ggaaaggagg	aaggggtttc	attggaatta	ccatthttata	tcacagcact	gttgtgaaaga
24241	gtaagataac	tctggtttga	ttctttagtt	tgggtagtga	gcaggactgt	agcaaatgac
24301	actacatagt	ctacacacga	agtaagtttc	agaggaggta	tggctttgca	tctgttgtt
24361	tacagctctc	tgaactgcta	ctgcagttcc	ccactggaat	aaacacttcc	tccctcagct
24421	tctccactgg	tgthtctgtc	cgttgcctca	cacagagaca	cattctatca	gccggtcatc
24481	aggattcga	acttggttca	cttttatggc	aattttttct	ctctttctag	ttccagttcc
24541	tcccaaatcg	gtgacttctc	taatgatgaa	taaagacggc	ttcctgggag	gcagtgtctgt
24601	caacaccggc	gaggtgtttt	gtctcgtccc	aggcctgttg	tctctgctca	gttcaacttc
24661	gaagtacaaa	gtaactgtgg	gagaagtcca	gagacggctg	gcgcccctg	aatgcctcaa

Ex4

24721 **tgcatctctc** **ctcggcgag** **tcctcagaag** gtaacccac cacgaaaaac aaaaacaaaa
24781 acaaaaaaac aaacaaaaac ccaccagttt ttatttattg gacagtggag agaaggttcc
24841 acggaaaaac ccaatctcga gtctgacgca gttgcctagc aaccgggtcc ccgggacatt
24901 gctttcgcg agcgcttggg aggatccgcg gccgcntcat gctcgccaac aaactctagt
24961 gtccttgcac ccaggcctgc ccgcgccgpgc aagtcctacc gcagattttg ccgcccgggg
25021 aacctttcac tttcctggcc ctgcgctctg cgctctcttc ctgtcaccoc taggacatct
25081 cagggggcat totccagcct gagtacaacg cgggaactaac agccccoag cccccca
25141 aaaaacccca taagtttcat gaagcaactc tcttcatacc ttcagtgtac tctttcnttt
25201 taattgcatg ttttaaatgc agttggcacc cagtgaaatt ggtccttcaa cctgctgatg
25261 cactgtaacc ccagtttgat aaactctttt tctaaatttg tgacatccct ctttcaataa
25321 caccaccacc aataatgca ataatatcac tttagaagta tttatagta ttcctggag
25381 ccattcaggt gcttcacagt attccacagc ccagagactg actcctctcg ttggaaatgt
25441 gagagatgtg gattttatct taagatgtaa tgcctccttg aagttcctgc caatgcctga
25501 acacctttgg cgtgtcctga tatgaaagta tgtaataaac aaaatcatct acacagttcc
25561 agaacaagag gatcttccaa gttgaatttt tgnnggaaat aatatgaaa tacagtcaga
25621 tggttctaat ggctattgga ggaagatgca gaattttctc tagcatctag cttgtaggtc
25681 ttgagtttta attccatttg tatgggtgta atattatgat gctcctgtag agagttggt
25741 ttagaagatg gaatattaaa atatttaggc agcaaccatt aatcatcaca gttacagggc
25801 ttactctgg ccatttttaa ggcaaatgga actttgctga gacaaaaact tccaagatga
25861 acctctgggg gttgatagtc cttttcttct ctaaaagtga ctgtatgaat agtacagcaa
25921 aagagattac agtaactgag gatttttact tgtacttttg tccatacttt agcacataca
25981 aggagaactc tggggagaaat taaggggtg acccaggaac tttctcattt tgaatcctct
26041 tctctgncc toctttgat cagttttcaa gtgagtgctt tgagcctcag agtgtggaag
26101 ttttcaatca cccctgaac attaagcctg tataataaaa tttgcagaga tgaagtaaaa
26161 taatcaatat aaagtgtcta tcacataact acacttccaa aagtgtagt tttactgta
26221 ttaatgatcat caccatttcc atttcagtct gccctctcct ttaacataa cacatataca
26281 gtaactcttg accccttctg cacaaagccc acctgttgc gcaagtgcg cctctctct
26341 aagccactcg gctcttatcc tattttcagc aaggttgtgc ttgccagtt tctgctcacc
26401 tcaactaactc catgacaagg aaggaacatg cacgtgcatg tgcagcttct accttctcta
26461 gatttttttt tcttttctca caagataaaa aaagaactct cagttaaaaa aattctctgt
26521 attgcagaaa ttaagcaaac ctacagcaaac tatcagcaaac taaccaaaa gaagggggaa
26581 aaatgtgcta acctcaagtt aaaacctctt caagctccac tgggctttag attgctaagt
26641 ctaaaccttg tttcaggaac actctaaggt taatcagaat gttaatctct gcaatttcag
Ex5 26701 **agccaaatcg** **aaaaatgggg** **ggagatcttt** **gcgagaaagg** **ctagaaaaaa** **tcggtttgaa**
26761 **tttaccgcg** **ggcagggca** **aagcagcaaa** **tgccacgtta** **ctcacctccc** **tggtggaa**
26821 taagcaagac gtgtggccat ttcacgaagt ggctgagctt aactgtcggc tggaggctga
26881 cattttaaca catttcatga ttaactggaa atcgttgtga ttgttgtgct cttatgtgct
26941 gtagtcaag cggctgcttg agagaggttc aaaggccttt tacttagagg agcagcagtt
27001 gtagacaggg caggagattg agagtctgtg cctgaaaagtg ctcagtcagc tcagacaagc
27061 agggcataag tcaactccgtc tgtcacgtgc aggacatcct ctatgtgaac tcttgcaaga
27121 gtaactcttt aagcaataat tcattctata ccccttcacc ttgccagatt tgaattgtca
27181 gtagtaagaa acacattgca ttcattggaac cctaattggtt attttaaaa ttttgtcact
27241 cctagggccca aatctgcaga ttacctggga catgttgtta ttgaaatatt gatagctag
27301 taaggccaat gatagctagg ggaagatnnt gtaggagggg tgaagaaata tgtaggtag
27361 tcaggatata tcttcaatgt agattcatca atgttgaat tatagggtga taattgcaat
27421 aagttccact tataatttgt cctcatcagt ttgggtnggg gatgatattt atgggatgta
27481 ataacaamaa tcaatctcac agttccagaa caagaggatc caagaggatc ttccaagtgt aattttngn
27541 ggaataataa tgaattaca gtcagatggt tctaattggag gaagatgcag aattttctct
27601 agcatctagc ttgtaggtct tgagttttaa ttccatttgt atgggtgtaa tattatgatg
27661 ctctgtaga gagtgggttt tagaagatgg aatattaaaa tatttaggca gcaaccatta
27721 atcatcacag ttacaggcct tacaactggc tatacttggc catttttaaag gcaaagtgtc
27781 caccctccag aggcaggaat cactgaaatt tccagaccac acttactagt ggttgactct
27841 tagcctggag tttcacattt acccttcagg aattgctaat atcatagtcc tcatttggaa
27901 gcaatcaagg taaccttagc ctccaagaca gggatttcag ggcagaaggg aggaactgga
27961 accactaaa ttccaatatt tgatttggca gttttggttt gtgactctgt agcaccatgc
28021 ctgaagtctt ttgttgttat gataataatg attaaaaaag taaagtcatc ctccttaaaa
28081 aataatgtag ctatggggnt atttcttcat atctgttttt catgtatggg atctgtcctt
28141 gaaccccaaa aggctgtggt taaagggtaa taatgcttta cttgaaaggg gctttcacat
28201 aagctgagta atcctgaata ccccagttt ctgtagctgc ctgtagctct tgtgtcagt
28261 aaaagtctg aagtaggagg atgatgacca ggaaccttcc tgaagggcag aaacctgaaa
28321 ctgactagga ggaaaagtga caaggagaat tattatttca ttgtagatag aaatactctt
28381 tccatataca ttttataat agtgttat atatgtggac atataacac atgtggctgt
28441 tttatataat ttgttggaa acagttgtag caagatgat gtcactttta aattttattt
28501 aaagcaagtg tgacagatgc tttaaaaaga aagaggaaatc tgggctaata gtccagccaa
28561 atgtccaat tcaattataa ggtgggctct tgacaaaaaga ttagggtgta ggagaccocg
28621 gtagctattc aggggatgtc tagctaggag ttggccagg gagaggccag ggaaaaagag
28681 acaggaggca aagttggtcc caccaatttt aattatagct tgagaatcag ttttcttata
28741 ggcactctct acctttgctt tttgggctcc aacaggactt ggccttctct ggaaacta
28801 acaaagctga caagggaatg tctccgctct gggatattta gggcctgggt gctgtattat
Ex6 28861 **acctttactg** **ctgtctttt** **caggagaagc** **tgttcactta** **gctagggat** **ttgggtacat**
28921 **ttgcaaacg** **gagtttccg** **ccaaagcgt** **ctctgagtat** **ttgaaccg** **agcacacaga**
28981 **cccagtgac** **ctgcactccc** **gaaagaatat** **gctgttggcc** **accaagtgag** **tttattagac**
29041 tctgggccct catctcactc ccagctggct agggcaccog actttggagt aggtgtggg
29101 gaggggcaga gaaagaagcc agaggggtgt ctagacctaa atttagccag agatttacta
29161 ttttccctc tgagttgtag taaattttac aagtctgtg aagatgacaa acagcaactg
29221 tggaaacgga gtaattagag ctgtgggtag agatgggtac acgtgggttt tatagactcc
29281 ctgagcgagc acacatggct atgtggctac gacagagaga tagatgtgaa acccaagcag

29341 aaatatgcac cttcggatcc agggaagagc tggacaaga actccctcag aaaagatctg
29401 cctgacatcc ccagagtgat agaagagaat tgtaagaagg ctggattcgg attaacaaag
29461 ccaatthccc cagagaggac acctgtagc ccatcaactc tgcctacctt
29521 gcttgccaga gcgtgcaaat gctacttcta gagctcattt gaacttttac agtgggtttt
29581 ctatthattt gatttactcc tgtctttggc ttcgggtgca tattgttggg gttttatggc
29641 cggctcaggg tgcagtgggc ggcgctgcgt gcgcccagc tttctcttgc aggcgcggcc
29701 aaacagccgg ccatttattt agttgtttgg aggacgcggt ttgtccgtg acagcgtaat
29761 ttaaagaaat atatggaagg gctgaaaaat catttgctc aaatttgtcc agatgttttt
29821 gagacgtgat tggaaattga gttgcccctt tccggcaggg tcaaaaatat taatgtccca
29881 gaactthaat tgcttacaga ccctggtttg ggctttgaaa gaattthaaa atgtttgact
29941 ctaagcattt gttctcccca gttcagaatg tcttttttgg cacttttgta atgagtacaa
30001 acttaaggaa agactthacc catctctccc aatgatcaag tcgacgcctc caccctcttt
30061 gtggatggtc accacctgtt tcatcaacca gcagtatagt tgtttgtcgg cagaagattg
30121 ccctcctgcc ccttgcgctg gtgtctgggt gagcacaggg tgtgtgtgtg ggggggatca
30181 agtgctgctt aaaaagcga agggactttt agggaaaaaa ataaaacca actgtataaa
30241 tcagatagga cccaccaatg actctcaatt ctctaaggta ttcactaac taccactgt
30301 ccaagcactg tggcttctct taggccagca cttctgaacc tagggtatca gaatcaactg
30361 gtgaacttht tccagaaaaat tctgtatggg gctatcctcc aatcttctaa attggaatta
30421 ctaagagctg gggcctgga gtgtgtgttc gaacccaca ggtgtttcta aggtgtact
30481 cctaagagct taaaaacttc cccactttgg tcagaaccct taactatttc ttctgtgtg
30541 tgaggatgta tgtgtgtact tcaaaggag aatcgaggt gcctgttagt gttctctatc
30601 caccatctt aaaaccagca acagtttagc ttctgtgact ggggtggtatt cctcatcaga
30661 tttagcctt atcccaagt ggcagcacc taggaaagga tgcccagat tcttttagt
30721 ccaatcacct gccctgttta cctgtttgct aggccaggtg tggccaggtc tctgtgagt
30781 gggccaacc actgtgggtc taggactgga gtgctgtagg tttatthtt tcttaacc
30841 cacagacca taggctgggt acaaggcagg gtggacaatg agaaatctgc ccatctgtga
30901 aaagctgtyg cttttggat gctgtgtgtc tgcctgccag ccatttgta aagatttca
30961 gaaccatccc atccagctcc tatattaaaa tttctcaaat aagctcaatc cataggtagg
31021 cacgcaggat ttctaaggct gggagattcc tctaaattgt aggtggctg aggaaataaa
31081 aaccttcaac aaataaaaaat ctatcctccc tagtgtctta acagcctacc tttaggtttt
31141 atttaaaacta tatgggaatc cttttatatt gacaacagt ggtttataca aagatttca
31201 gtgccctaca cttggaagaa agaaaggagg gaaaggcaga aactagctcc ctccccaat
31261 actgcaggtg aacaggtttt tgctttgaaat ggaatcagca ttctctagaa taacagttt
31321 cttgccctgg gccatggaag gctccagcaa tctgcttcag tgccagggac aggcttgtgg
31381 ccgaggggccc taaatctttc agggcttttt gcgcctgat accaagaggt tggagaggtg
31441 ggagggggcgc gnggaaaca gctcaaaaaga aatgccaggt aagagctcaa tattatgaag
31501 tattaaaaat caaccgctaa agcctagcga atgtcccaaa gcgagctcag gcggtcccgg
31561 aatggagggg agaaaggatg aagtccgggg aaggcaaggc ttgggggtga aggggtgcat
31621 tacctcccca cccctttttt cctttcagtc ccagctgctc gagaaggag ggcctggga
31681 aaggaaacag agcggaatcg cccacattag cctcgtctt cggtgaccgc gcgctctgg
31741 gcttgtgtga gcgtctcctt tctaatgcca atgacaacga cactgaggt gattttctgt
Ex7 31801 gctcgcacca cccctttgca **ggcaactttg** **taaagaattt** **acggatctac** **tggcgcagga**
31861 **ccggacaccg** **atagggaaaca** **gccgaccag** **ccccatcctg** **gagccgggga** **tccagagctg**
31921 **cctcacgcac** **ttcagcctca** **tcacgcacgg** **cttcggcgcc** **ccggccattt** **gcgcccgcct**
31981 **cacggccctg** **cagaactatc** **tcaccgaggc** **gctcaaaaggc** **atggacaaga** **tgttcttgaa**
32041 **caacaccacc** **actaacaggc** **acacgtctgg** **ggaaggcca** **ggtagtataa** **ctggcgacaa**
32101 **ggaggagaaa** **cacaggaaat** **gaaaaatttt** **ttaaaaaaga** **aggaaaaatg** **ttttaatac**
32161 **aaaaggaaaa** **acagacaaaa** **atthaatttt** **agctthttaa** **atattggatt** **ggcttcggaa**
32221 **gaattatatt** **aggtagaata** **cacatacaat** **caaaatttaa** **aaaaaaaaag** **ctaaataact**
32281 **taaaaaaaaa** **ctgaggcgtg** **taacggagca** **acaatatcgg** **ttctcagttg** **ctatttcaag**
32341 **atacatttgg** **agacaaccgt** **ccggattttc** **cacttcggtt** **ctttcgagtt** **tagtaatact**
32401 **gataataaaa** **gaaaaccatg** **atthccctt** **ccctttggaa** **aataaacata** **agactaaaca**
32461 **tgaaaaaacc** **gctaacttat** **tggaaagaaa** **tccggaaaac** **g**

6.2 Sequenzvergleich der murinen AP-2 β -cDNS mit der murinen AP-2 γ -cDNS

(Übertragung der Exongrenzen von AP-2 β auf AP-2 γ . Die Exongrenzen wurden farblich markiert.)

```

β   1   . . . . . GAATTCAAGCGTTTTTCTGTCTGCTGAGGCTTACTTCTCCAG
      |           ||           || | | |           |           | |
γ   1   GCTTCTCCGGTCCACGGCTGCGGCCTCTACACACCCACGGCGACCACATC

β   43  CCTATTGTTTGAGACAACAGATATAAGTTGCGATGGGAGAGGAGCGTCGG
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ   51  TCTGTGCACAGCCACCGATGCGCGTCCAGTGACTGGGACAGCAAGGCCGG

β   93  ATTTGGTGTGTATCCCCATTTCCAATTATAGATGGATCATTACAGACAG
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  101  CGCGCGCGGGCGGGGGCGGCGGCAGACGCCTGGCCACCGTGACCCCGATTG

β  143  CGGAGTCCTGAGAAACCAGACATCTGCTCCTCACATGAATGCACTCACCT
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  151  TGGATTTACCGCTCGGGGGTGGGGGGAGCCTGGATTAACTGGCGACTA

      Exon1 ->
β  193  CCTAGAGACCAGGCTGCGATCATGCTCTGGAAACTCGTGGAGAATGTCAA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  201  TTTTGGGGGACGCCGACGCCATGTTGTGAAAATAACAGATAATGTCAA
      <- Exon1 Exon2 ->
β  243  GTACGAAGACATCTATGAGGACCGGCACGATGGCGTCCCAAGCCATAGCT
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  251  GTATGAAGAGGATTGCGAGGATCGCCACGACTCGAGCAGTAATGGCAACC

β  293  CGAGACTCTCTCAACTGGGCTCTGTGTCCCAAGGACCCTACTCAAGCGCC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  301  CTCGCATCCCTCACCTCTCCTCTCCGGGACAACATCTCTACAGTCCCGG

β  343  CCGCCGCTGTCCACAC . . . GCCATCATCGCACTTCCAGCCACCCTACTT
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  351  CCGCCTCTCTCGCACACCGGGTTGCAGAGTACCAGCCGCCTCCTTACTT

β  390  TCCGCCCCCTACCAGCCGCTACCCTACCACCAGAGTCAAGACCCGTACT
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  401  CCCGCCGCCTTACCAGCAGGTGGTATACTCGCAGTCCGCCGACCATTACT

β  440  CCCACGTCAACGATCCCTA . . . . . CTCCCTGAACCCTCTGCATCAGCC .
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  451  CGCATCTGGGACAGGCTTACGCTGCCGCCATGAACCCCTGCACCAGCCT

β  483  . . . . . CCAGCAGCACCCGTGGGGGCAACGGCAACGCCAAGAAGT
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  501  GCGGCCACCGGCAGCCAGCAACAGGCCTGGCCGGTTCGACAGAGTCAGGA
  
```



```

β  522  GGGCTCAGAAGCCGGCTCTCTCCTGCCCCAGCCCCGGGCAGCCTTGCCCC
      |||||      | ||| | | |      |      |      | |||||
γ  551  GGGCTCTAGCCTGGCCTCGCACCACAGCCGCTCTGCAAGTCTAATACCCC

β  572  AGCTCTCCGGCCTTGA.....TCCCCGAAGGGACTACCACTCTGTCCGC
      | | | | | | | | | |      |      | | | | | | | | | |
γ  601  ATATTTTCAGGGCTGGAGGGGGGCTCGGTGAGCGCCCCGGCGGGAAGTCTAC

β  616  CGGCCGGACGTGCTGCTGCATTCCGCACATCACGGCCTGGACGCCGGCAT
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  651  CGCCGGTCCGACCTGCTGCTGCCTCACGCGCACGCCCTGGAAGCCGGCCT

β  666  GGGCGACAGCCTCTCGTTGCACGGCCTTGGGCATCCCGGCATGGAAGACG
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  701  GGCTGAGAACCTGGGGCTGCACGAGATGGCTCACCC...CATAGAGGAGG
      <- Exon2 Exon3 ->
β  716  TGCAGT CAGTTGAAGATGCCAATAACAGCGGCATGAACCTATTGGACCAG
      ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  748  TGCAGAATGTGGACGACGCGCA.....CTTGCTCCTACACGATCAG
      <- Exon3 Exon4 ->
β  766  TCAGTCATTAAAAAGTTCCTGTCCCTCCCAAATCTGTGACTTCTCTAAT
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  789  ACTGTCATTGCAAAGGACC...CATTTGATGACCAAGAACCCTTTGGG

β  816  GATGAATAAAGATGGCTTCTTGGGAGGAATGTCAGTCAACACCGGCGAGG
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  836  GCTCCCTTGCCAGAAGGACCTGGTGGGAGTGGTCATGAACCCAGTGAGG

β  866  TATTTTGCTCAGTCCCGGGCCGTTTATCTCTACTCAGTTCAACTTCAAAG
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  886  TCTTCTGCTCGGTCCCTGGAAGACTGTCCCTGCTCAGCTCCACGTCGAAG

β  916  TACAAAGTCACTGTGGGCGAAGTTCAGAGAAGGCTCTCGCCCCCTGAATG
      ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  936  TACAAAGTAACTGTGGCTGAGGTACAGAGGCGACTGTCACCACCGGAATG
      <- Exon4 Exon5 ->
β  966  CCTCAATGCATCTCTCCTGGGCGGCGTCTCAGAAGAGCCAAATCGAAAA
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ  986  CCTAAACGCCTCGCTCCTGGGAGGTGTGCTCAGAAGAGCAAAGTGCAAAA

β 1016  ATGGGGGGAGATCTTTGAGAGAAAGGCTAGAAAAAATCGGTTTGAATTTA
      ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ 1036  ATGGAGGCCGTCCTTGAGGGAGAAGTTGGACAAAATTGGATTGAACCTT

β 1066  CCCGCGGGCAGGCGCAAAGCAGCAAATGTCACGTTACTCACCTCACTGGT
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ 1086  CCGGCCGGGAGACGGAAAGCTGCCACGTCCTCCTCACGTCCTCTCGT
      <- Exon 5 Exon 6 ->
β 1116  AGAAGGGAAGCTGTTCACTTAGCTCGGGATTTCCGGTATATTTGTGAAA
      ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ 1136  GGAAGGTGAAGCCGTCCACCTAGCACGGGACTTCGCCTATGTCTGCGAAG

```

```

β 1166 CAGAGTTTCCTGCTAAAGCCGTGTCCGAGTATTTGAACAG...ACAGCAC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ 1186 CTGAGTTCCTAGTAAAGCGGTGGCTGACTATTTAACGAGACCACATCTT

β 1213 ACGGACCCAGTGACCTGCACTCCAGGAAGAATATGCTGCTGGCCACCAA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ 1236 GGGGGACGGAATGAGATGGCCACGCGGAAGAGTATGTTGTTGGCTGCACA
<- Exon 6 Exon 7 ->
β 1263 GCAACTTTGTAAAGAATTTACGGATCTGCTGGCTCAGGACAGGACACCGA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ 1286 GCAGGTGTGCAAGGAGTTCCTGACCTTCTCCATCAAGATCGGACACCCA

β 1313 TCGGAAACAGCAGGCCAGCCCCATCCTGGAGCCGGGCATCCAAAGCTGT
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ 1314 ACGGGAACAACAGGCCCGCCAGGTCTTGGAGCCGAACATACAAAGCTGT

β 1363 CTCACGCACTTCAGTCTCATCACGCACGGCTTCGGTGCCCCGGCCATTTG
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ 1386 TTGTCTCATTTCAGCCTGATAACTCATGGCTTTGGCAGCCAGGCCATCTG

β 1413 CGCTGCGCTCACGGCCCTGCAGAACTATCTCACCGAGGCGCTCAAAGGCA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ 1436 TGCGGCGGTCTCCGCAGTGCAGAAATTATATCAAGGAGGCTCTAATCGCCA

β 1463 TGGACAAGATGTTCTTGAAC.....AACACCACT
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ 1486 TCGATAAGTCCTACATGAACCCGGGGACCAGAGTCCGGCTGATTCCAGC

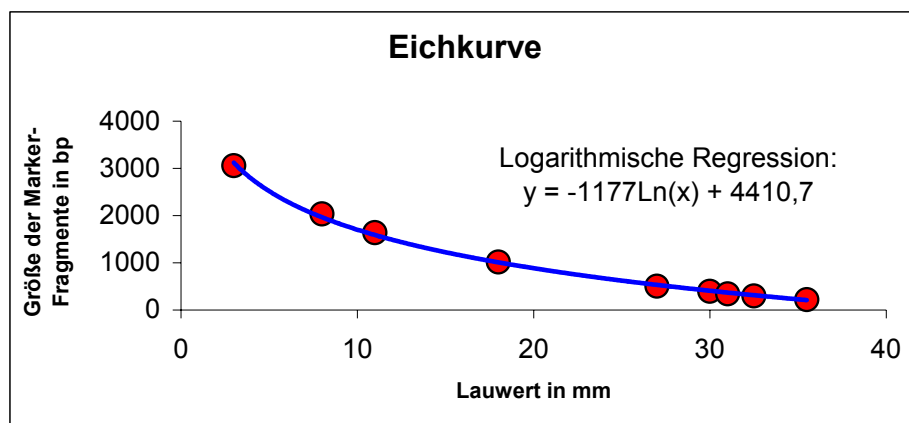
β 1492 AACAGGCACACGTCTGGGGAAGGCCAGGTTAGTAAAACCTGGCGACAAGGA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ 1536 AAGACGATGGAGAAAATGGAAAAGCACAGGAAGTAAAATGGCTGCAAGGA
      <- Exon 7
β 1442 GGAGAAACACAGGAAATGAAAAAAAAA.....
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
γ 1586 GGCCAGAGAGCAGAAGGAGAGGACCCAGGCCCTCCACTGGGGCAGCCCCG

```

6.3 Restriktionskartierung der PCR-Fragmente des murinen AP-2 γ -Gens

Fragment A

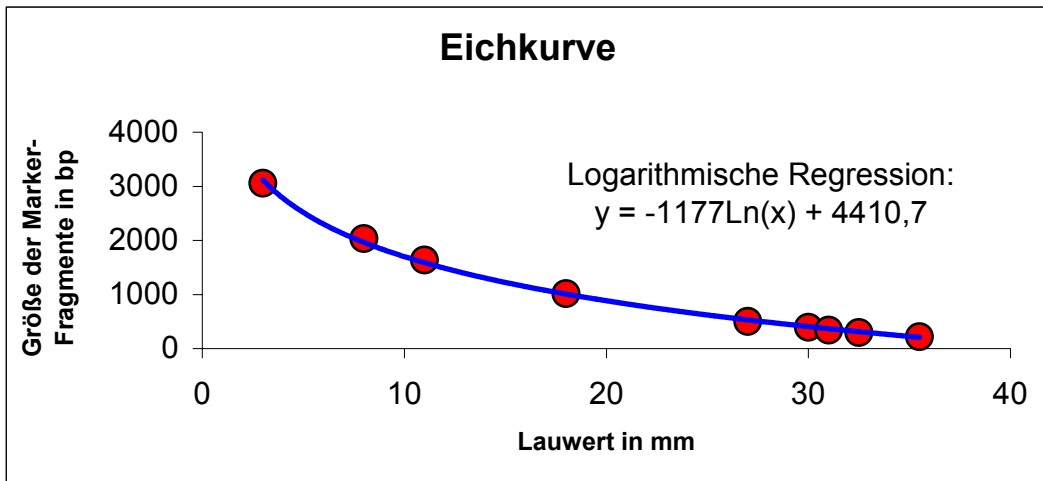
Marker-Fragment Nr.	Laufwert des Marker-Fragments in mm	Größe der Marker-Fragmente in bp
1	3	3054
2	8	2036
3	11	1636
4	18	1018
5	27	506
6	30	396
7	31	344
8	32,5	298
9	35,5	220



Restriktion	Anzahl der Schnittstellen	Laufwert der Restriktions-Fragmente in mm	Größe der Restriktions-Fragmente in bp
unverdaut	/	11	1588
BamHI	0	11	1588
DraI	0	11	1588
HindIII	1	14	1305
		31	369
PvuI	0	11	1588
SacI	1	13	1392
		35	226
XhoI	3	20	885
		28,5	468
		32,5	313
		48,5	158
Scal	1	16,5	1111
		25,5	599
Sall	0	11	1588

Fragment B

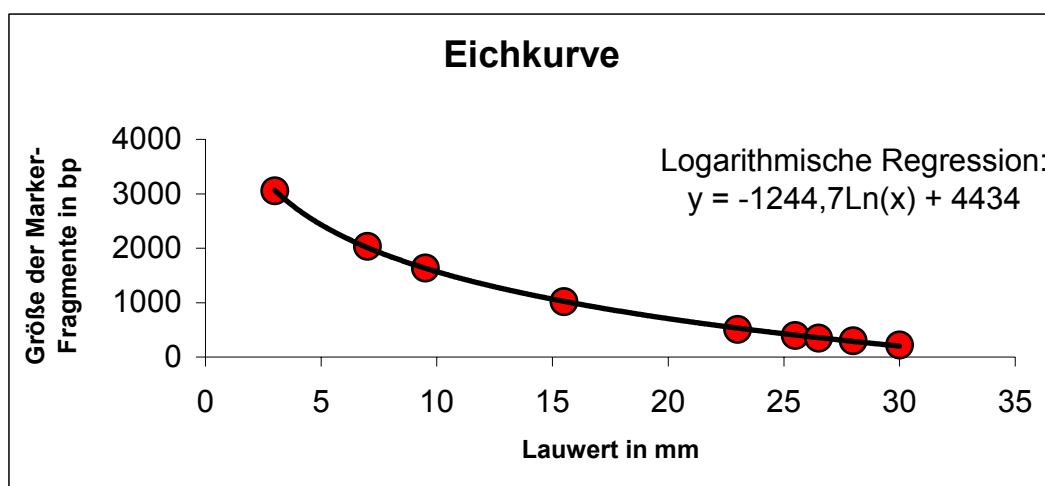
Marker-Fragment Nr.	Laufwert des Marker-Fragments in mm	Größe der Marker-Fragmente in bp
1	3	3054
2	8	2036
3	11	1636
4	18	1018
5	27	506
6	30	396
7	31	344
8	32,5	298
9	35,5	220



Restriktion	Anzahl der Schnittstellen	Laufwert der Restriktions-Fragmente in mm	Größe der Restriktions-Fragmente in bp
unverdaut	/	11	1588
BamHI	0	11	1588
DraI	2	11	1588
		30,5	388
		37,25	153
HindIII	0	11	1588
PvuI	0	11	1588
SacI	1	17	1076
		26	576
XhoI	0	11	1588
SalI	0	11	1588
Sall	0	11	1588

Fragment C

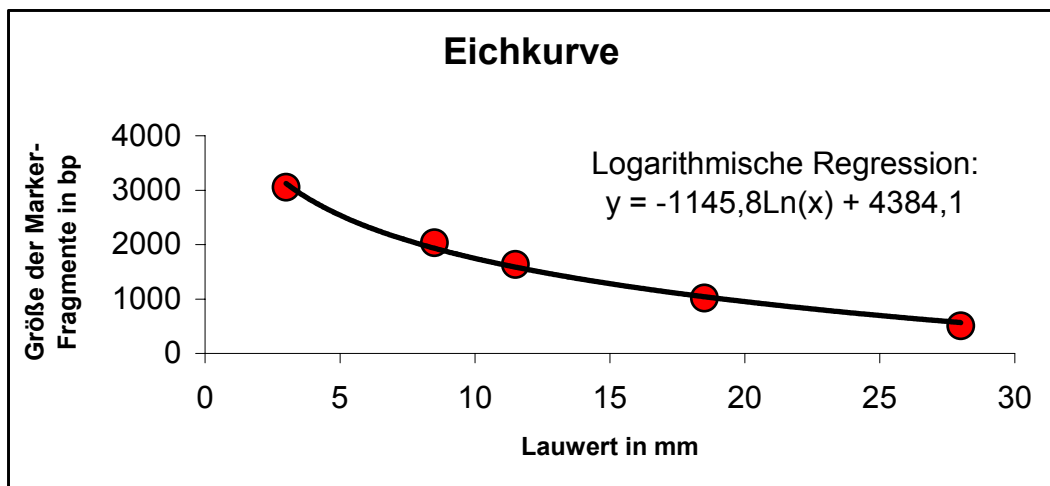
Marker-Fragment Nr.	Laufwert des Marker-Fragments in mm	Größe der Marker-Fragmente in bp
1	3	3054
2	7	2036
3	9,5	1636
4	15,5	1018
5	23	506
6	25,5	396
7	26,5	344
8	28	298
9	30	220



Restriktion	Anzahl der Schnittstellen	Laufwert der Restriktions-Fragmente in mm	Größe der Restriktions-Fragmente in bp
unverdaut	/	21	644
BamHI	0	21	644
DraI	0	21	644
HindIII	0	21	644
PvuI	0	21	644
SacI	0	21	644
XhoI	0	21	644
Scal	0	21	644
SalI	0	21	644

Fragment D

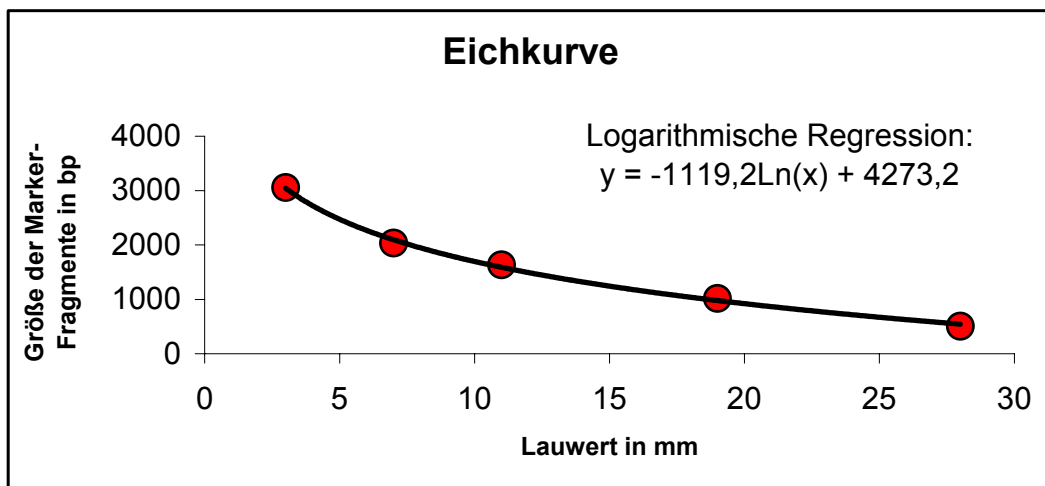
Marker-Fragment Nr.	Laufwert des Marker-Fragments in mm	Größe der Marker-Fragmente in bp
1	3	3054
2	8,5	2036
3	11,5	1636
4	18,5	1018
5	28	506



Restriktion	Anzahl der Schnittstellen	Laufwert der Restriktions-Fragmente in mm	Größe der Restriktions-Fragmente in bp
unverdaut	/	8	2001
BamHI	1	15	1281
		24,5	719
DraI	0	8	2001
HindIII	/	keine DNA	
PvuI	0	8	2001
SacI	1	11,5	1586
		nicht sichtbar	
XhoI	0	8,5	1932
Scal	0	8	2001
Sall	0	8	2001

Fragment E

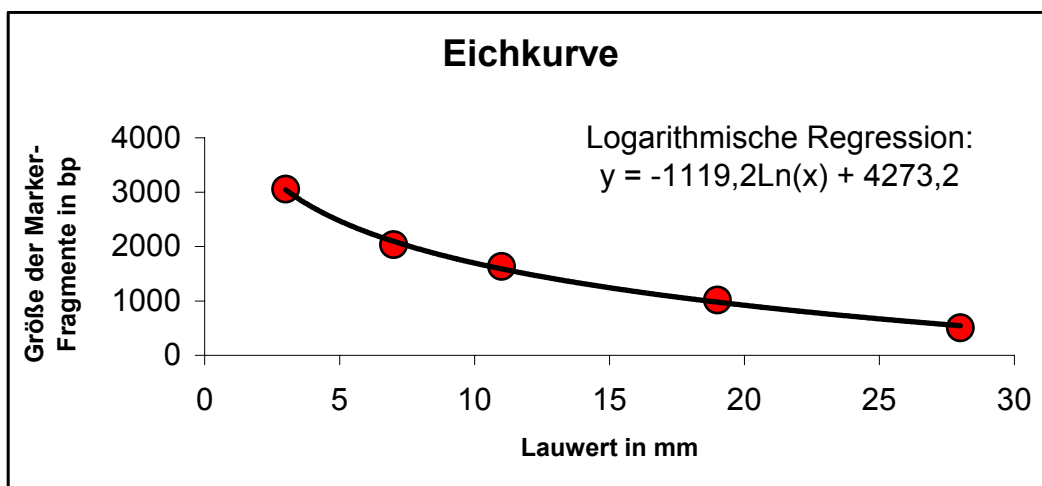
Marker-Fragment Nr.	Laufwert des Marker-Fragments in mm	Größe der Marker-Fragmente in bp
1	3	3054
2	7	2036
3	11	1636
4	19	1018
5	28	506



Restriktion	Anzahl der Schnittstellen	Laufwert der Restriktions-Fragmente in mm	Größe der Restriktions-Fragmente in bp
unverdaut	/	19	978
BamHI	1	21	866
		36	263
DraI	0	19	978
HindIII	/	19	978
PvuI	0	19	978
SacI	0	19	978
XhoI	0	19	978
ScaI	0	19	978
SalI	0	19	978

Fragment F

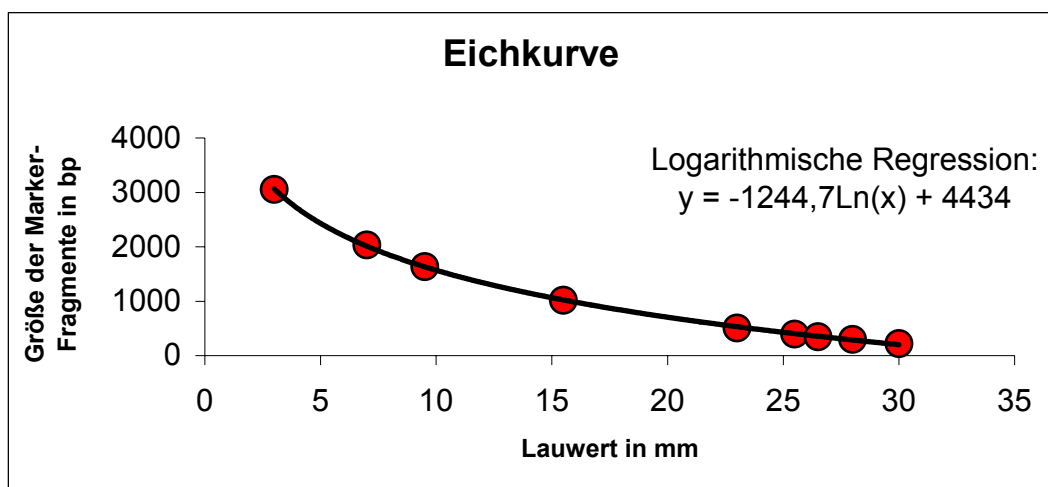
Marker-Fragment Nr.	Laufwert des Marker-Fragments in mm	Größe der Marker-Fragmente in bp
1	3	3054
2	7	2036
3	11	1636
4	19	1018
5	28	506



Restriktion	Anzahl der Schnittstellen	Laufwert der Restriktions-Fragmente in mm	Größe der Restriktions-Fragmente in bp
unverdaut	/	7	2095
BamHI	0	7	2095
DraI	0	7	2095
HindIII	1	9,5	1754
PvuI	0	nicht sichtbar keine DNA	
SacI	1	12	1492
		21	866
XhoI	2	19,5	949
		24	716
		28,5	524
SalI	1	11	1589
		25	671
SalI	1	9	1814
		nicht sichtbar	

Fragment G

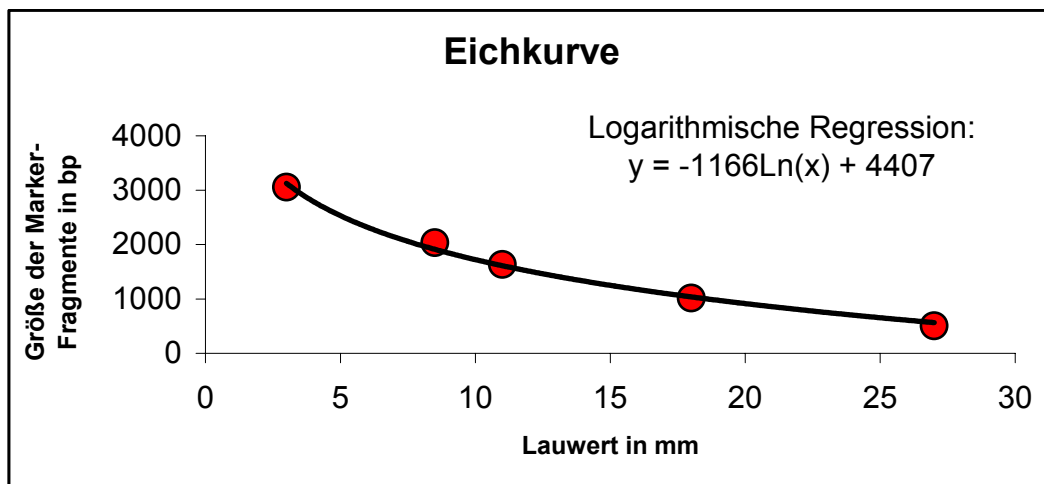
Marker-Fragment Nr.	Laufwert des Marker-Fragments in mm	Größe der Marker-Fragmente in bp
1	3	3054
2	7	2036
3	9,5	1636
4	15,5	1018
5	23	506
6	25,5	396
7	26,5	344
8	28	298
9	30	220



Restriktion	Anzahl der Schnittstellen	Laufwert der Restriktions-Fragmente in mm	Größe der Restriktions-Fragmente in bp
unverdaut	/	11	1449
BamHI	0	11	1449
DraI	2	11	1449
		30,5	180
		37,25	69
HindIII	0	11	1449
PvuI	0	11	1449
SacI	1	17	907
		26	379
XhoI	0	11	1449
SalI	0	11	1449
Sall	0	11	1449

Fragment H

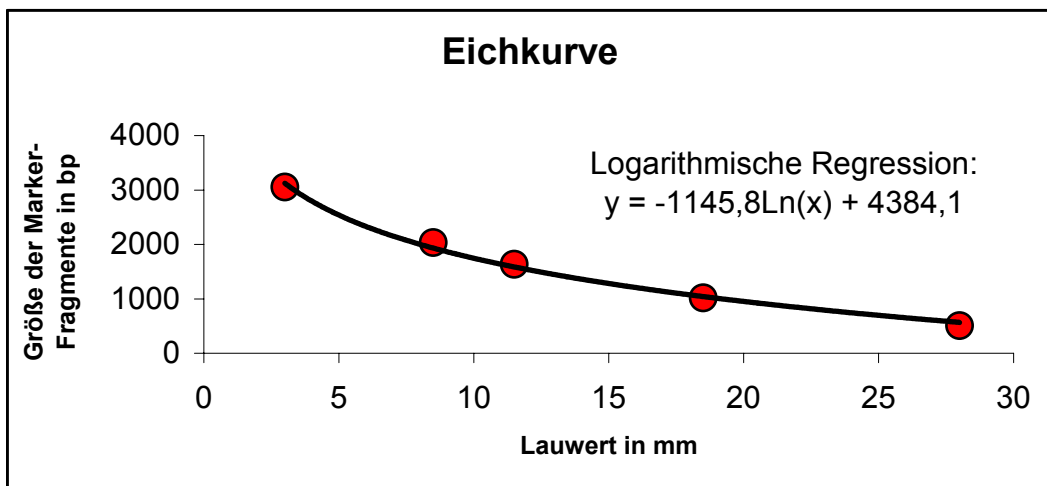
Marker-Fragment Nr.	Laufwert des Marker-Fragments in mm	Größe der Marker-Fragmente in bp
1	3	3054
2	8,5	2036
3	11	1636
4	18	1018
5	27	506



Restriktion	Anzahl der Schnittstellen	Laufwert der Restriktions-Fragmente in mm	Größe der Restriktions-Fragmente in bp
unverdaut	/	5	2530
BamHI	1	14,25 14,75	1309 1269
DraI	0	5	2530
HindIII	1	9 24	1845 701
PvuI	0	5	2530
SacI	1	11,25 19,75	1585 929
XhoI	1	5,5 nicht sichtbar	2419
SalI	0	5	2530
Sall	0	5	2530

Fragment I

Marker-Fragment Nr.	Laufwert des Marker-Fragments in mm	Größe der Marker-Fragmente in bp
1	3	3054
2	8,5	2036
3	11,5	1636
4	18,5	1018
5	28	506



Restriktion	Anzahl der Schnittstellen	Laufwert der Restriktions-Fragmente in mm	Größe der Restriktions-Fragmente in bp
unverdaut	/	8	2001
BamHI	0	8	2001
DraI	1	17,5	1105
		22	842
HindIII	0	8	2001
PvuI	0	8	2001
SacI	1	16	1207
		20	952
XhoI	0	8	2001
ScaI	0	8	2001
SalI	0	8	2001

6.4 Partielle Intron-Sequenzen des murinen AP-2 γ -Gens

Intron-Sequenz S1

1	GGGAGGAGTT	ATGATAATTT	CCTTCCCATT	AAGGCGTTCG	GGTCGTATCG	
	CCGGGACACA	CTGTGAGGGT	GAGGCTTCTC	CGGTCCACGC	TGCGGCCTCT	100
101	ACACACCCAC	GGCCACCACA	TCTCTGTGCA	CAGCCACCGA	TGCGCTCCAG	
	TGACTGGGAC	AGCAAGGCCG	TGGCGCGCGG	CGGGGGCGGC	GCAGACGCCT	200
201	GGCCACCGTG	ACCCCGATTG	TGGATTTACC	GCTCGGGGGG	TGGGGGGAGC	
	CTGGATTTAA	CTGGCGACTA	TTTTGGGGGA	CGCCGGACGC	C	291

Intron-Sequenz S2

1	GAGGTCGCCG	CACGCCAGGC	CCTGGGGCAC	GGGTAACCGG	ACTGTCGGGG	
	AACGCGCTCT	TGGCACCTCC	AAGCGACGCA	GCGCGGGAAC	CTTCGCCAGA	100
101	GGGCTCGAAG	GATTCGTCCC	CTCAGGTCTT	AGACCGATAG	GCTCACAACG	
	AAGTCCGGGG	AGCTCATTGT	CCCCGGGGG	TCTCGGGCTC	TGGGGCGGAT	200
201	CGAGACGGGT	GGTGCAGCT	TGGTGGGGCG	CATAGGTGCC	CCTCTCCTGG	
	CTTGCTTGTT	CGCTGTAGCA	GGGTTTCGTA	CTAACCGGGT	CTCTCCTGTT	300
301	TCTCTCCCA					309

Intron-Sequenz S3

1	GTGAGCAGCG	GGGGGGAGGC	TGGGGGTGGG	ATGGGGGTTC	TACCTTACCC	
	TCCAGCCTTT	CCACCTTCCT	CCAAACTTAA	AAGAAATTGT	CATTTCCCCC	100
101	C					101

Intron-Sequenz S4

1	GTAAACACTG	ACTCTTTCCG	CTTGTGTCTT	AACACGTGGC	TCTGACCAGT	
	GAAGTTGCC	CTTTTCTGCA	AAGGCTGGGG	TATTAAGTGG	CCAACACGGC	100
101	TCACGTAGTG	GAGAAGACCA	CGCTTGAACG	AAAGTCAGTT	CCTGGCCTGA	
	ACGAAAAGAA	CTCTCAGGAG	CTGTGATTTT	TAAAAGATTG	GGTTTTTTTG	200
201	TTGTGTGTGT	TGTTTTTTGG	AGTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTGTTA	
	GTGGCCATAT	TTTTTTGAAT	CAAATGTTTC	AGTCTGTAA	TCAGAGTGGC	300
301	CTTGAATTCC	TTGTAAGCCT	CCTGGCTCAA	CCTCCCTAGT	CGTGGCATT	
	CAGGTGGGAA	ATACAATTTA	ACTTAAAAAC	GGGGTGGGGG	TGGGGTGGGA	400
401	GATCAGAATA	GTACCTT				417

Intron-Sequenz S5

1	ATAGTCAATA	CAGGTTACAT	GTTTGAGGAA	TGATCTGTAA	TTACAGCAGT	
	TATGTTCTTG	AGATTGTCGA	GCTATTAGTG	GATTGGAGAG	GTTGGAGAGG	100
101	AAACTGAAAG	GAAACAGTTT	CTGAGTAGAC	TAAGCAGATC	TGGCTAATCT	
	GTATTTCTGA	ATTCTGGTGT	TCAGCTCGAC	TGAAGGTCTG	GCGATGATCT	200
201	CCCGTGGCTT	CAGTTCATCT	TGGAGGGGAG	GGGAGGATGC	CGTTTATTTT	
	GTATTGAAGC	GGTTTTTCTG	AAAGCAAATG	CTTTAATTAA	ACAGATTACC	300
301	ATGGTGGCCT	GGAACAGAGA	GAGAGAGAGA	GAGAGGGAGA	GGGAGGGAGG	
	AGAGAGAGAA	ACAACCTTTC	ATGGAATCTT	AACTAATTAA	GGTCTGGAGG	400
401	TGTTAACTCA	TGATTCCAGA	CTCCAGTCTT	TCAAGAAAGG	ATACGGCTTT	
	TAAAAGGACT	TGCAAGAAGC	AAGGAGTTTT	CTGGAGGCAG	ACCTCAGCTT	500
501	TGGTTTGCCC	TTTTGTAAAG	GTCTCTCTGC	CCCATCCGTT	TCTAATGGCC	
	AACCTATTCT	GTCCCTAC				569

Intron-Sequenz S6

1	GTGACACTTG	TTCAGGGCCC	CCTGGGTTGG	GTAGTTGAAG	GTGACTATGT	
	ACGAGGGCCT	GGAGGTATTT	TTAACATTTA	TGTAACTTTT	ATATCTTAAC	100
101	GCTGAATTCT	AATCTGTGTT	AAGAGAGCTT	TTTAGTGCGT	ATCTTCTTCT	
	TGAAAGTGCC	AAATGCAGAA	TGTGCTAAAA	CAGCAGTAAC	AGGTTATCAT	200
201	TTGGTTGGGA	TTAAGAGGCA	GCAGCTGCAT	GGAGGGGGGG	GGCTTCTAGT	
	GTTTGGTCCC	CCCAGGGAGT	TACTGCTGC	AGTCATGAGT	GAAGATTTTT	300
301	CTGCACCCCT	ACTAGAGGAT	TCTGAGATTG	GTGGGGGTGG	GGGTCTGGTT	
	TGTTTGTTTG	TTCGTTTGAT	TGTTTTGCAA	GTCGCTAACT	TTCCCTCTCC	400
401	ATGCAG					406

Intron-Sequenz S7

1	CCGTGCGGTT	TGTCCTCAG	AAAGCCATGT	TACCAAAGCT	TTCACTTTTC	
	TGGACCTATG	AGGTCACGCG	GGAGTTGGCA	AACTTTCCC	ATGACGTGAG	100
101	CTAGCTTTTG	AAAGATTCCG	TCCATCAAGG	ATGGGCCCGG	CCATGAGGAG	
	GCAGAATGGC	CATTTTTCTG	GTTGTGGGGT	ATCTGGTTGT	GTTCGTTGTA	200
201	CACAATGGGC	ACTGGCTTAG	TTCACCATTT	CTCCCTTCC	ATCAAAGGCC	
	GGCGTGGGT	GGGGGAAAT	GAAACCCATG	GTCCACAAAT	GAGCTCCTTC	300
301	TCCAATCTG	AGGGCGTACG	TGTGTCAGTC	CATTTTAATG	GGACCGTCCC	
	AGTCTGAAGT	AC				362

Intron-Sequenz S8

1	TGAGATATTT	GCTCTCTACA	GTCCCTGGGG	CTCCAAACCC	GGAAGCTACT	
	GTGGTGGGCG	ACGGCAGAGC	TTTGCAGCGT	CTTTCGTCCT	TCGCAGCAAC	100
101	CTCTAGTAGT	GTTTAGAGGA	GGGCATTGCT	CCATCCCAGG	TGGCGAGGGG	
	CCTGCTAACA	CCACTCACAG	CAGGCACAGC	CCCTGTTTAT	TGCCTTTGGG	200
201	TATGTGTAAG	AATTTGTGTA	GCTCAGTTAG	TAGGGTTTGC	CTAGTATCGA	
	TGAAACTAGG	CAACATCCTC	AGCTACACAT	AAAGCCAAGC	ATGGTGGTAT	300
301	ATGCCTGTAA	CGCCACGATT	CGAGACGAAG	ACTGAGTCGA	TCATCTCAGC	
	TACAAGTAGT	CAGCACTGCT	CAATAATGTC	TCATGACTAC	GAGTACGGCT	400
401	CACCACA					407

Intron-Sequenz S9

1	GCTGGCATA	ATGTAAGCAC	CAGATTTGGT	CCTTAGTGCT	GCATAAATCA	
	AGAGTAGAGG	TGAATACTGT	TGTGATCTTG	TATGGGGAGG	TAGAGGCAGT	100
101	AATAAAACCA	AGGTCATTCT	TGGGTATATA	GTAATTTTGA	GGCCATTTG	
	GAGACTGTCT	CAGAAGTGAA	TGTAAATTCT	CCTTTCTGAG	CCTGCCTATC	200
201	CTAATAGGAT	CCGGGTGGG	GGTAGGGGTG	GGGGTGGGAG	TGGGGTGGG	
	GGTAGGGGTT	TATTCGGTCA	AGAGCTGAGT	AACAGTCACC	AACTGTGTTC	300
301	ACAGG					305

Intron-Sequenz S10

1	GAGGACCCAG	GCCCCTCCAC	TGGGGCAGCC	CGGGAAGTGT	CCAGAGCAGC	
	AGCAGCAGCA	GCAGCAGGGA	AGCAGTTACA	ACCCGCCCGC	CCACACCACA	100
101	CTCTGGACCT	GCCCTCTTGG	AGTCTTTGTG	ACTTTTCCAT	TTAACCCCTGG	
	ACATGCTATC	CTGAAGCCAC	TTGGTTTGGT	TCTTTTATTC	ATTAAACATG	200
201	TGTGTTTTTT	TTTTTTAAAT	CCGTTCCCTC	TCTTGAAAGG	TGCTACGAGT	
	TTTAGAACCC	TTTGTAAGAA	CTCCCTGGGC	AGACAAGAAA	CTCCACGCTT	300
301	AGCTGCTAAC	ACAGCAGGTC	GATGGGAGTC	GTCAGATAAA	GGGATCGATC	

```
AATCATAACT TATTTCTTTT CAGTGTTAAG ATAATAGCTG GCTTTATGTC 400
401 CACTAAATAT TATCTAAAAA AATAGTATTA TCTAGTTTCC ACACTTGTCA
TCACACTTCT GTAGAGCAAT CAAATGCCTT ACAGCACTAC TACATGTATT 500
501 AA 502
```