



**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 5647B

# **Die Genstruktur von CD44: Versuche zur Elimination der Funktion diskreter Isoformen**

**C. Tölg**  
Institut für Genetik

September 1995

---



Forschungszentrum Karlsruhe  
Technik und Umwelt  
Wissenschaftliche Berichte

FZKA 5647 B

Die Genstruktur von CD44:  
Versuche zur Elimination der Funktion diskreter Isoformen\*

Cornelia Tölg

Institut für Genetik

\*Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe  
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe 1995

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

© Forschungszentrum Karlsruhe, 1997. Alle Rechte vorbehalten. Nachdruck, Vervielfältigung und Verbreitung, auch auszugsweise, ist ohne schriftliche Genehmigung des Forschungszentrums Karlsruhe. Printed in Germany.

## Zusammenfassung

Der zellulären Oberflächenproteinfamilie CD44 wird eine zentrale Rolle bei der Leukozytenaktivierung, Hämatopoese und der Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe zugeschrieben. Zusätzlich weist die weitverbreitete Expression von CD44 während der Embryonalentwicklung auf eine Funktion bei der Entstehung embryonaler Strukturen hin.

Die verschiedenen Isoformen der CD44 Proteinfamilie unterscheiden sich durch die Insertion einer unterschiedlich großen Anzahl von Aminosäuren in die extrazelluläre Domäne der kleinsten CD44 Isoform, der CD44 Standardform (CD44s). Die zusätzlichen Aminosäuren bilden die sogenannte variable Region der extrazellulären Domäne der varianten CD44 Isoformen (CD44v). Durch einen Vergleich der cDNA Sequenzen verschiedener muriner CD44v Isoformen und der Charakterisierung der Genomstruktur der variablen Region des murinen CD44 Gens, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die Heterogenität der variablen Region durch differentielles Spleißen von mindestens 10, mit v1 bis v10 bezeichneten Exons entsteht. Diese 10 Exons sind über eine genomische Region von 25kB verteilt. Die Genomstruktur zwischen dem CD44 Gen der Maus und des Menschen stimmt sowohl was die Zahl der Exons als auch was die Länge der Introns betrifft weitgehend überein. Die Homologie der Aminosäuresequenz der variablen Region der größten CD44 Isoform beträgt zwischen Maus und Ratte 89% und zwischen Maus und Mensch 63%.

Die Expression der Isoform Meta-2 auf der Oberfläche von Tumorzellen der Ratte induziert die spontane Metastasierung dieser Zellen nach subkutaner Injektion in syngene Ratten. Die variable Region der Isoform Meta-2, der bisher kleinsten die Metastasierung von Tumorzellen induzierenden CD44 Isoform, wird von den Exons v6 und v7 gebildet. Um eine Grundlage für die Identifizierung und Analyse physiologischer Funktionen der an der Tumorphprogression beteiligten CD44v Isoformen zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Etablierung einer Mauslinie, die sich durch eine Deletion der Exons v6 und v7 auszeichnet, angestrebt. Dazu wurden die Exons v6 und v7 eines CD44 Allels durch zwei Selektionsmarker, dem viralen Thymidinkinasegen und dem bakteriellen Neomycinresistenzgen, in embryonalen Stammzellen (ES Zellen) durch die Technik des "gene targeting" ersetzt. Die Effizienz der homologen Rekombination zwischen dem CD44 Gen und dem v6/v7 Deletionskonstrukt betrug dabei 9,5%. Von den aus den heterozygoten ES Zellen durch Blastozysteninjektion etablierten Chimären wurden

jedoch keine heterozygoten Nachkommen erhalten, so daß keine, in der variablen Region des CD44 Gens mutierte, Mauslinie etabliert werden konnte. Eine mögliche Ursache dafür, daß die Mutation der variablen Region nicht in die Keimbahn der Chimären aufgenommen wurde, ist eine Inhibierung der Spermzellreifung durch die Expression der viralen Thymidinkinase im Testis. Das virale Thymidinkinasegen war in die variable Region integriert worden, um als Selektionsmarker für ES Zellen, bei denen eine Deletion der Selektionsmarker durch ein zweites homologes Rekombinationsereignis stattgefunden hat, zu fungieren. Die Deletion der Selektionsmarker erschien notwendig, da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die Selektionsmarker mit der Expression des mutierten CD44 Allels interferieren. Für die Deletion der Selektionsmarker wurde die sogenannte "tag-and-exchange" Strategie gewählt, bei der ein Austausch des homolog integrierten v6/v7 Deletionskonstrukts gegen ein tk/neo Deletionskonstrukt, das außer der Deletion der Exons v6 und v7 keine weiteren Veränderungen der variablen Region enthält, angestrebt wird. Es konnten zwar Ganzyclovir resistente Klone von den heterozygot mutierten ES Zellen etabliert werden, es hatte jedoch in keinem dieser Klone eine Deletion des Thymidinkinasegens durch homologe Integration des tk/neo Deletionskonstrukts stattgefunden. Es wurden daher keine heterozygoten ES Zelllinien erhalten, die für die Etablierung einer in der variablen Region des CD44 Gens mutierten Mauslinie geeignet gewesen wären.

## Abstract

### **The genomic structure of CD44: Experiments to eliminate discrete isoforms**

The CD44 family of surface proteins is associated with a central role during leukocyte activation, haematopoiesis and migration of leukocytes into inflamed tissue. In addition, the broad expression of CD44 during the embryonic development suggests a function of CD44 for the development of embryonic structures.

The different isoforms of the family of CD44 proteins are distinguished by an insertion of a different number of aminoacids into the extracellular domain of the smallest CD44 isoform, the CD44 standardtype (CD44s). The additional aminoacids form the so called variable region of the extracellular domain of the variant CD44 isoforms (CD44v). By a comparison of the cDNA sequences of different murine CD44v isoforms and the characterization of the genomic structure of the variable region of the murine CD44 gene, it was possible to show that the heterogeneity of the variable region originates from differential splicing of at least 10 exons, designated v1 to v10. These 10 exons are distributed over a genomic region of 25kb. The genomic structure between the CD44 genes of mouse and human is conserved concerning exon number and intron length. The homology of the aminoacid sequence of the variable region of the largest CD44 isoform is 89% between mouse and rat and 63% between mouse and human.

The expression of the isoform Meta-2 at the surface of rat tumor cells induced spontaneous metastasis formation of these cells after subcutaneous injection into syngenic rats. The variable region of the isoform Meta-2, the until now smallest CD44 isoform which is associated with metastasis formation, includes the exons v6 and v7. To create a base for the identification and analysis of physiologic functions of isoforms which are involved in the tumor progression, one aim of this work was the establishment of a mouse line which carries a deletion of the exons v6 and v7. The exons v6 and v7 of one CD44 allele were exchanged against two selection marker, the thymidinekinase gene of the Herpes Simplex Virus and the neomycinresistance gene by the technique "gene targeting" in embryonic stem cells (ES cells). The efficiency of homologous recombination between the CD44 gene and the v6/v7 deletion construct was 9.5%. The heterozygote ES cells were used for the generation of chimeric mice by injection into blastocysts. Unfortunately the chimeric mice did not pass the mutation to their offspring. It was therefore not possible to establish a mouse line which carries a deletion of parts of the variable region. One possible reason for this lack of germline transmission of the mutation is an inhibition of the sperm cell development by expression of the virale thymidinekinase in the testis. The thymidinekinase gene has been introduced into the variable region to be used as a selection marker for the isolation of stem cell clones in which a deletion of the selection marker occurred. The deletion of the selection marker was necessary to exclude an interference of

the selection marker with the endogenous CD44 expression. To delete the selection marker the so called "tag-and-exchange" strategy was used. This strategy is based on an exchange of the homologous integrated deletion construct against a tk/neo deletion construct which carries besides the deletion of the exons v6 and v7 no further changes of the variable region. It was possible to establish Gancyclovir resistant heterozygote ES cell clones but the selectionmarker were not deleted in any of these clones by homologous recombination. All together it was not possible to isolate an ES cell line which was suitable for the establishment of a CD44 mutant mouse line.



## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	ungefähr
CD	“Cluster of differentiation”
CD44s	CD44 Standardform
CD44v	CD44 Variante(n)
cDNA	complementäre DNA
Ci	Curie
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CTP	Cytosintriphosphat
d	Desoxy
dd	Didesoxy
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES Zellen	embryonale Stammzellen
EtBr.	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
FCS	Fötales Kälberserum
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
g	Gramm
G418	Geneticin
GMEM	Glasgow modified Eagle Medium
GPI	Glucose-6-phosphat Isomerase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Mensch, human

H <sub>2</sub> O <sub>bi.dest.</sub>	doppelt destilliertes Wasser
HEV	Venole mit hochprismatischem Endothel
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl Transferase
J	Joule
k	Kilo
kB	Kilobase
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
LH	Luteinizing Hormone
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	Maus, murin
mA	Milliampere
mCi	Millicurie
Mef	embryonale Fibroblasten der Maus
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MOPS	Morpholino-propan-sulfonsäure
mRNA	Boten RNA
MTT	Methylthiazoliumtetrazolium
mV	Millivolt
N	Normal
n	nano
N-CAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nt	Nukleotid(e)
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
p	Piko
p	Plasmid
p.c.	post coitum
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PEG	Polyethylenglykol
Pen.	Penicillin
pgk-1	Phosphoglyzeratkinase-1
Pgp-1	Phagozytisches Glykoprotein-1
PMS	Phenazine Methosulphate
r	Ratte
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	“reverse transcribed”-PCR
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
sek.	Sekunde(n)
STB	Standardtransformationspuffer
Std.	Stunde
Strep.	Streptomycin
SV 40	Simian Virus 40
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyl-Ethylendiamin
tk	Thymidinkinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Enzymeinheit
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
μ	Mikro

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b>	1
-Struktur von CD44 Proteinen und ihre Wechselwirkungen mit anderen Molekülen	1
-CD44 Expression während der Embryonalentwicklung der Maus	3
-Expression und Funktion von CD44 im immunologischen System	4
-Die Expression von CD44 Isoformen befähigt Tumorzellen zur Metastasierung	6
-Gezielte Mutation des CD44 Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (gene targeting)	7
<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	9
<b>Material und Methoden</b>	10
1.Bezugsquellen	10
2.Plasmide	11
3.Genbanken	11
4.Bakterienstämme	12
5.Zelllinien	12
6.Hybridisierungsproben	12
7.Oligonukleotide	12
8.Transformation von Bakterien	13
8.1.Herstellung kompetenter Bakterien	13
8.2.Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA	13
9.Infektion von Bakterien mit Bakteriophagen	14
9.1.Herstellung von kompetenten Bakterien "plating cells"	14
9.2.Infektion von Bakterien mit Lambda Phagen	14
10.Präparation von Nukleinsäuren	14
10.1."small scale" Präparation von Plasmid DNA	14
10.2."large scale" Präparation von Plasmid DNA	15
10.3.Präparation von Phagen DNA	15
10.4.Präparation von DNA aus Säugerzellen	15
10.5.Präparation von RNA aus Säugerzellen	16
10.6.Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	16
11.Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren	16
11.1.Restrictionsendonukleasen	16
11.2.Alkalische Phosphatase	17
11.3.T4 DNA Polymerase	17
11.4.T4 DNA Ligase	17
12.Elektrophorese von Nukleinsäuren	17
12.1.Analytische Agarosegelelektrophorese	17
12.2.Präparative Agarosegelelektrophorese	18
12.3.Analytische Polyacrylamidgelelektrophorese	18
13.Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	19
13.1.Markierung von DNA Fragmenten	19
13.2.Markierung von Oligonukleotiden	19
14.Analyse von Nukleinsäuren	19

14.1.Southern Blot Analyse	19
14.2.Sequenzierung	20
14.3.Amplifikation von DNA Sequenzen durch PCR	21
15.Klonierung von Nukleinsäuren	21
15.1.Klonierung von cDNA verschiedener CD44 Isoformen	21
15.2.Klonierung von genomischen Sequenzen der variablen Region	22
15.3.Klonierung der Amplifikationsprodukte der genomischen Sequenzen	23
15.4.Klonierung der Targeting-Konstrukte	23
16.Kultur von embryonalen Stammzellen	24
16.1.Isolierung und Inaktivierung embryonaler Fibroblasten	24
16.2.Konditionierung von ES Zellkulturmedium	25
16.3.Subklonierung von ES Zellen	26
16.4.Analyse des Karyotyps	26
16.5.Elektroporation von ES Zellen und Klonierung	26
16.6.Injektion der ES Zellen in Blastozysten	27
16.7.GPI Analyse	28
<b>Ergebnisse</b>	29
-Die Heterogenität der variablen Region entsteht durch differentielles Spleißen von 10 Exons	29
-Gezielte Mutation der variablen Region des CD44 Gens der Maus durch homologe Rekombination in ES Zellen	44
-Deletion der Exons v6 und v7 in ES Zellen	44
-Injektion der heterozygoten ES Zellen in Blastozysten	54
-Deletion des integrierten Selektionsmarker durch homologe Rekombination	56
<b>Diskussion</b>	62
<b>Literaturverzeichnis</b>	69
<b>Lebenslauf</b>	75

## Einleitung

In mehrzelligen Organismen sind Interaktionen zwischen Zellen und zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix von zentraler Bedeutung. Diese Interaktionen werden von Adhäsionsproteinen, die sich aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne zusammensetzen, vermittelt. Die extrazelluläre Domäne dieser integralen Membranproteine tritt dabei in Wechselwirkung mit Proteinen auf der Oberfläche benachbarter Zellen oder Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Die zytoplasmatische Domäne ist verantwortlich für die Signalübertragung in das Innere der Zelle, wobei eine Bindung der zytoplasmatischen Domäne an das Zytoskelett beteiligt sein kann. Entsprechend ihrer zentralen Bedeutung an Vorgängen während der Embryonalentwicklung, der Immunantwort und für die Aufrechterhaltung der Gewebeorganisation mehrzelliger Organismen, ist die Expression von Adhäsionsproteinen strikt reguliert. Im Gegensatz dazu findet sich eine deregulierte Expression von Adhäsionsproteinen häufig während pathologischer Vorgänge. Beispielsweise konnte für einige Adhäsionsproteine nachgewiesen werden, daß eine Veränderung ihrer Expression in Tumorzellen eine Ursache für die Entstehung von Metastasen ist (Honn, K.V. und Tang, D.G.; 1992, Zetter, B.R.; 1993). Ein Beispiel eines Adhäsionsproteins, das während der Tumorprogression eine Rolle spielt, ist das Glykoprotein CD44 (Birch, M., et al.; 1991, Günthert, U., et al.; 1991).

### **Struktur von CD44 Proteinen und ihre Wechselwirkungen mit anderen Molekülen.**

Mit der Bezeichnung CD44 wird eine Familie von Glykoproteinen mit einem scheinbaren (gelelektrophoretisch ermittelten) Molekulargewicht zwischen 85 und 200 kD zusammengefaßt. Die allen Isoformen gemeinsame Grundstruktur setzt sich aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne zusammen und umfaßt im Falle des CD44 Proteins der Ratte 342 Aminosäuren, von denen sich 71 Aminosäuren im Zytoplasma befinden (Günthert, U., et al.; 1991, Herrlich, P., et al.; 1993). Die 90 N-terminalen Aminosäuren der extrazellulären Domäne weisen eine starke Homologie zum "Cartilage link protein" auf (Goldstein, L.A., et al.; 1989, Nottenburg, C., et al.; 1989, Stamenkovic, I., et al.; 1989, Zhou, D.F.H., et al.; 1989, Wolffe, E.J., et al.; 1990). Diese in einer Reihe extrazellulärer Proteine vorhandene Domäne ist verantwortlich für die Bindung von Hyaluronsäure, einem wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix (Aruffo, A., et

al.;1990, Miyake,K.,et al.;1990, Turley,E.A.;1992). Darüberhinaus konnten Wechselwirkungen zwischen CD44 und Kollagen sowie zwischen CD44 und Fibronectin nachgewiesen werden (Carter,W.G. und Wayner,E.A.;1988, Jalkanen,S. und Jalkanen,M.;1992, Lesley,J.,et al.;1993). Aufgrund der Wechselwirkung mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix wird CD44 auch als Rezeptor für die extrazelluläre Matrix bezeichnet. Das CD44 Protein der Maus trägt darüberhinaus die Bezeichnung phagozytisches Glykoprotein 1 (Pgp-1).

Die zytoplasmatische Domäne kann in einer an Serinresten phosphorylierten Modifikation vorliegen (Neame,S,J. und Isacke,C.M.;1992) und tritt über membranständige, zytoplasmatische Proteine in Wechselwirkung mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts (Lacy,B.E. und Underhill,C.B.;1987, Camp,R.L.,et al.;1991, Tsukita,S.,et al.;1994).

Neben Unterschieden im Ausmaß der N- und O-Glykosylierung (Herrlich,P.,et al.;1993, Rudy,W.,et al.;1993) ist die Heterogenität der Primär-Sequenz der extrazellulären Domäne eine Ursache für die Existenz unterschiedlicher CD44 Isoformen (Brown,T.A.,et al.;1991, Dougherty,G.J.,et al.;1991, Günthert,U., et al.;1991, Hofmann,M.,et al.;1991, Stamenkovic,I.,et al.;1991, Jackson,D.G., et al.;1992, Tölg,C.,et al.;1993). Die kleinste CD44 Isoform, die sogenannte CD44 Standardform (CD44s) wird von den allen CD44 Isoformen gemeinsamen 342 Aminosäuren der Grundstruktur gebildet. Größere, mit CD44v bezeichnete Isoformen entstehen durch die Insertion von Aminosäuren innerhalb der extrazellulären Domäne. Diese zusätzlichen Sequenzen bilden die sogenannte variable Region, die sich 23 Aminosäuren oberhalb der Transmembrandomäne befindet. Die extrazelluläre Domäne der größten bisher klonierte CD44 Isoform der Ratte enthält 414 Aminosäuren zusätzlich zu den Aminosäuren der CD44s Isoform. Weitere CD44 Isoformen entstehen dadurch, daß nur ein Teil dieser 414 zusätzlichen Aminosäuren in der extrazellulären Domäne enthalten sind. Beispielsweise enthält die variable Region einer als Keratinozytentyp bezeichneten CD44 Isoform des Menschen 339, und eine als Epithelialtyp bezeichnete CD44 Isoform des Menschen 131 zusätzliche Aminosäuren.

Die große Heterogenität der CD44 Proteinfamilie läßt vermuten, daß die Expression von CD44 eine Voraussetzung für eine Vielzahl unterschiedlicher physiologischer Vorgänge ist. Tatsächlich konnte durch die Verwendung von Antikörpern, die alle CD44 Isoformen erkennen, sogenannte (pan Antikörpern) nachgewiesen werden, daß CD44 an Vorgänge während der Embryonalentwicklung und der Immunantwort beteiligt ist.

### **CD44 Expression während der Embryonalentwicklung der Maus.**

Während der Embryonalentwicklung kommt der extrazellulären Matrix eine entscheidende Funktion zu, beispielsweise bei Vorgängen in denen Zellschichtungen beteiligt sind (Adams, J.C. und Watt, F.M.; 1993). So konnte die Gastrulation von Amphibienembryos durch die Injektion von gegen Bestandteilen der extrazellulären Matrix, z.B. Fibronectin, gerichteten Antikörpern inhibiert werden (Boucaut, J.C., et al.; 1984). Migrationsvorgänge während der Embryonalentwicklung, z.B. die Migration von Neuralleistenzellen und Zellen der glatten Muskulatur, sind häufig mit einer Anreicherung von Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix gekoppelt (Toole, B.P., et al.; 1989, Boudreau, N. und Rabinovitch, M.; 1991). Dies führte zu der Vermutung, daß die Interaktion zwischen CD44 und Hyaluronsäure eine zentrale Rolle während der Embryonalentwicklung spielt. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, daß die Expression von CD44 bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Embryonalentwicklung einsetzt. Pluripotente embryonale Zellen, sogenannte embryonale Stammzellen (ES Zellen), die aus dem Keimknoten von Blastozysten vor deren Implantierung in den Uterus isoliert wurden, exprimieren bereits die CD44 Isoform CD44s. Durch die *in vitro* Differenzierung dieser ES Zellen zu sogenannten "embryoid bodys", Blastozysten ähnlichen Strukturen, wird die Expression von CD44 Isoformen, die Sequenzen der variablen Region enthalten, induziert.

Die Expression aller CD44 Isoformen nimmt während der Embryonalentwicklung zu und ist mit der Entwicklung einzelner embryonaler Strukturen assoziiert (Wheatley, S.C., et al.; 1993). Beispielsweise konnte am Tag 8,25p.c. der Embryonalentwicklung eine Expression von CD44 im Endothel und dem Epimyokardium der Herzanlage sowie im präsomitischen Mesoderm nachgewiesen werden. Während der Entwicklung einzelner embryonaler Strukturen verändert sich das Muster der CD44 Expression. Beispielsweise exprimiert zu Beginn der Gliedmaßenentwicklung das gesamte den "limb bud" umgebende Ektoderm CD44. Zu einem späteren Zeitpunkt, Tag 9,5p.c., ist die CD44 Expression auf die ventrale Seite der Anlage und ab Tag 10,5p.c. auf eine definierte Region an der Spitze der Anlage, dem "apical ectodermal ridge" beschränkt.

Da diese Beschreibung der CD44 Expression mit Hilfe von pan Antikörpern durchgeführt wurde ist nicht bekannt welche CD44 Isoformen während der Embryonalentwicklung exprimiert werden und ob die Expression unterschiedlicher Isoformen mit der Entstehung definierter Strukturen gekoppelt ist. Es wurden daher *in situ* Hybridisierungen von Schnitten von Tag 12,5p.c. und Tag 14,5p.c. alten Embryonen mit Sequenzen der variablen Region durch-



geführt. Dabei zeigte sich, daß die Expression von CD44v Isoformen auf einige ektodermale Strukturen wie beispielsweise der Dentallamina beschränkt ist (Tölg,C.,nicht veröffentlichte Ergebnisse).

In adulten Mäusen bzw. Ratten wird CD44 von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen und Gewebe exprimiert. Der Anteil einzelner Isoformen an der CD44 Expression ist dabei zwischen verschiedenen Zelltypen unterschiedlich. Hämopoetische Zellen und Fibroblasten exprimieren hauptsächlich die CD44 Isoform CD44s. Epitheliale Zellen, wie z.B. Keratinozyten weisen dagegen eine starke Expression von größeren Isoformen wie dem CD44 Epithelialtyp oder dem CD44 Keratinozytentyp, zusätzlich zur Isoform CD44s auf (Brown,T.A.,et al.;1991, Dougherty,G.J.,et al.;1991, Günthert,U.,et al.;1991, Hofmann,M.,et al.;1991, Stamenkovic,I.,et al.;1991, Jackson,D.G.,et al.;1992, Screatton,G.R.,et al.;1993). Gewebe, in denen CD44 Expression nachgewiesen wurde, umfassen Knochenmark, Thymus, Milz, Lymphknoten, Gehirn, Lunge, Speicheldrüse, Dickdarm, Haut, Bindegewebe und glattes Muskelgewebe (Günthert,U.,et al.;1991, Heider,K-H.,et al.;1993, Screatton.G.R.,et al.;1993).

### **Expression und Funktion von CD44 im immunologischen System.**

Es konnte eine Beteiligung von CD44 vermittelten Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix an der Hämatopoese im Knochenmark, der Einwanderung von Lymphozyten in entzündetes Gewebe sowie der Proliferation von aktivierten Lymphozyten nachgewiesen werden.

Im Knochenmark erfolgt die Proliferation und Differenzierung pluripotenter hämopoetischer Stammzellen zu Vorläuferzellen der lymphozytären Linie wie z.B. T- und B-Zellen und Vorläuferzellen der myelozytären Linie wie z.B. Monozyten und Makrophagen. Die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen und der Zellen der einzelnen Differenzierungsstufen wird dabei durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie den Granulozyten und Makrophagen stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Interleukin 7 (IL-7) reguliert. Diese Faktoren werden von den Stromazellen des Knochenmark produziert.

Der Kontakt zwischen differenzierenden hämopoetischen Zellen und Stromazellen ist Voraussetzung für eine optimale Versorgung der hämopoetischen Zellen mit Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Die hämopoetischen Stammzellen, sowie ein Großteil der durch Differenzierung der pluripotenten Stammzellen entstandenen Vorläuferzellen exprimieren CD44 (Nikolic-Zugic,J.;1991, Law,C.L. und Clark,E.A.;1994). Daß CD44 an der Interaktion zwischen hämopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und Stromazellen beteiligt ist wurde dadurch deutlich, daß die *in vitro* Differenzierung von

hämopoetischen Stammzellen durch Kokultivierung mit Stromazellen, sogenannte "long-term bone marrow culture", durch Antikörper gegen CD44 inhibiert werden konnte (Miyake,K.,et al;1990).

Außer während der Hämatopoese im Knochenmark spielen Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen eine wichtige Rolle bei der Zirkulation von Immuneffektorzellen innerhalb des Blut- und Lymphgefäßsystems. Lymphozyten zirkulieren ständig zwischen dem Blutgefäßsystem, den sekundären lymphatischen Organen wie z.B. Lymphknoten, Milz und Mandeln sowie den Zellzwischenräumen der Gewebe. Der Übertritt der Lymphozyten von dem Blutgefäßsystem in das Lymphgefäßsystem erfolgt innerhalb der sekundären lymphatischen Organe an Stellen mit spezialisiertem Endothel, den sogenannten "high endothelial venules (HEV)". Diese Rezirkulierung der Lymphozyten aus dem Blutgefäßsystem in das Lymphgefäßsystem wird als "Lymphocyte homing" bezeichnet.

Die Extravasation aktivierter Lymphozyten und Monozyten in entzündetes Gewebe ist dem "Lymphocyte homing" sehr ähnlich. Von aktivierten Lymphozyten werden Faktoren sezerniert, die eine Ausbildung einer den "high endothelial venules" der sekundären lymphatischen Organe vergleichbare Region innerhalb des benachbarten Endothel induzieren.

Sowohl während des "Lymphocyte homing" als auch während der Extravasation von Leukozyten in entzündetes Gewebe wird die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel durch Adhäsionsproteine, die auf der Oberfläche der Endothelzellen und der Leukozyten exprimiert werden, vermittelt. Leukozyten, die durch Kontakt mit Antigen aktiviert wurden unterscheiden sich durch die Expression anderer Adhäsionsproteine von nicht aktivierten Leukozyten. Durch diese unterschiedliche Expression von Adhäsionsproteinen erhalten aktivierte und nicht aktivierte Leukozyten unterschiedliche Präferenzen in ihrem Extravasationsverhalten. Eines der Adhäsionsproteine das hauptsächlich auf der Oberfläche von nicht aktivierten Leukozyten vorhanden ist wird als P-Selektin bezeichnet. Demgegenüber wird CD44 erst nach Aktivierung durch Antigenkontakt von Leukozyten exprimiert (Budd,R.G.,et al.;1987, Camp,R.L.,et al.;1991, Bradley,L.M.,et al.;1993). Eine Erhöhung der CD44 Expression ist in CD8+ T-Zellen von einer Erniedrigung der P-Selektin Expression begleitet. CD8+ T-Zellen, die eine starke CD44 Expression und eine schwache P-Selektin Expression aufweisen zeichnen sich durch eine hohe zytolytische Aktivität aus und sind die hauptsächlichen Effektorzellen in Entzündungsvorgängen (Moblely,J.L. und Dailey,M.O.;1992). Daß die CD44 Expression eine Voraussetzung für die Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe ist, konnte in Mäusen bestätigt werden, bei denen durch

Injektion von Antikörpern gegen CD44 der Verlust des CD44 von der Oberfläche von einer Vielzahl von Zellen einschließlich der Leukozyten induziert wurde (Camp,R.L.,et al.;1993). Mäuse mit einer stark erniedrigten Expression von CD44 zeigen eine verzögerte Hypersensitivitätsreaktion nach Induktion mit einem Kontaktallergen. Demgegenüber war der Übertritt von Lymphozyten von dem Blutgefäßsystem in die sekundären lymphatischen Organe durch den Verlust von CD44 von der Zelloberfläche nicht beeinträchtigt. Das Adhäsionsmolekül CD44 ist daher nicht am "lymphocyte homing" beteiligt.

Eine weitere immunologische Funktion des CD44 scheint mit der Proliferation von Leukozyten in Zusammenhang zu stehen. Nach der Aktivierung durch Bindung eines Antigen erhöht sich die Expression von CD44 auf der Oberfläche von Lymphozyten und Makrophagen wobei neben der Isoform CD44s auch CD44v Isoformen induziert werden (Arch,R.,et al.;1992). Daß die Induktion der CD44 Expression mit der Proliferation von Leukozyten in Zusammenhang steht wurde dadurch deutlich, daß die intravenöse Injektion von gegen Sequenzen der variablen Region gerichteten Antikörpern zu einer Inhibition der durch Antigenkontakt *in vivo* induzierten Proliferation von Lymphozyten und Makrophagen führte (Arch,R.,et al.;1992).

### **Die Expression von CD44 Isoformen befähigt Tumorzellen zur Metastasierung.**

Im Gegensatz zu physiologischen Funktionen von CD44, die auf eine strikt regulierte Expression des CD44 beruhen, sind pathologische Vorgänge wie z.B. die Metastasierung von Tumorzellen die Folge einer Deregulation der CD44 Expression. Im Modellsystem der Ratte konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß die Expression von CD44 Isoformen, die sich durch Sequenzen der variablen Region in der extrazellulären Domäne auszeichnen, mitverantwortlich an der Progression eines Primärtumors zu einem metastasierenden, malignen Tumor ist (Günthert,U.,et al.;1991, Rudy,W.,et al.;1993). Aus einem spontan aufgetretenen Adenokarzinom des Pankreas der Ratte konnten zwei Zelllinie isoliert werden, die sich in ihrem Metastasierungspotential unterscheiden (Matzku,S.,et al.;1983). Nach subkutaner Injektion in syngene Ratten metastasiert die Zelllinie Bsp73ASML in die Lymphknoten und in die Lunge. Die Zelllinie Bsp73AS bildet demgegenüber lediglich einen nicht metastasierenden Primärtumor an der Injektionsstelle. Auf der Oberfläche dieser zwei Zelllinien sind unterschiedliche CD44 Isoformen vorhanden, wobei die Zelllinie Bsp73AS ausschließlich die Isoform CD44s exprimiert. Im Gegensatz dazu finden sich auf der Oberfläche von Zellen der Linie Bsp73ASML CD44v

Isoformen (Matzku,S.,et al.;1989, Günthert,U.,et al.;1991, Rudy,W.,et al;1993). Die zwei überwiegend exprimierten CD44v Isoformen wurden mit Meta-1 und Meta-2 bezeichnet, wobei "Meta" für "metastasis associated" steht. Die extrazelluläre Domäne der Isoform Meta-1 enthält 162 Aminosäuren der variablen Region. Die variable Region der Isoform Meta-2 umfaßt dagegen nur die 85 C-terminalen Aminosäuren der variablen Region der Isoform Meta-1. Beide Isoformen enthalten innerhalb der variablen Region das Epitop, das durch den monoklonalen Antikörper 1.1ASML erkannt wird. Die Fähigkeit zur Metastasierung ist an die Expression der CD44 Isoformen Meta-1 oder Meta-2 gekoppelt. Dies konnte dadurch nachgewiesen werden, daß Zellen der Linie Bsp73AS, in denen die Isoformen Meta-1 oder Meta-2 zur Expression gebracht wurden, nach subkutaner Injektion in syngene Ratten analog zu Zellen der Linie Bsp73ASML in die Lymphknoten und in die Lunge metastasieren (Günthert,U.,et al;1991, Rudy,W.,et al;1993). Demgegenüber führt eine Überexpression der Isoform CD44s in Bsp73AS Zellen nicht zu einer Veränderung des Verhaltens der Zellen im Metastasierungsassay. Die Metastasierung der die Isoformen Meta-1 oder Meta-2 exprimierenden Zellen der Linie Bsp73AS als auch die Metastasierung der Zellen der Linie Bsp73ASML kann durch intravenöse Injektion des monoklonalen Antikörpers 1.1ASML unterdrückt werden.

### **Gezielte Mutation des CD44 Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (gene targeting).**

Die Inhibierung der Proliferation von aktivierten Lymphozyten und Makrophagen durch die Injektion von gegen CD44v Isoformen gerichteten Antikörpern zeigte, daß diese Isoformen an anderen physiologischen Funktionen beteiligt sind als die Isoform CD44s (Arch,R.,et al.;1992). Es wird davon ausgegangen, daß die den Zellen durch die Expression von CD44v Isoformen verliehenen Eigenschaften zur Metastasierung von Tumorzellen führen. Die Expression von CD44v Isoformen während der Embryonalentwicklung weist darauf hin, daß diesen Isoformen zentrale Funktionen bei der Entstehung embryonaler Strukturen zukommen (Wheatley,S.C.,et al.;1993). Da jedoch eine Expression von Proteinen vorliegen kann, ohne daß eine funktionale Notwendigkeit dafür vorhanden ist, kann von einer Expression von CD44v Isoformen nicht auf eine Funktion dieser Isoformen rückgeschlossen werden. Eine Möglichkeit um physiologische Funktionen, z.B. während der Embryonalentwicklung, der CD44v Isoformen zu identifizieren, ist die Analyse von Mauslinien, die keine funktionale variable Region des CD44 Gens besitzen. Eine Mauslinie, in deren Genom die Sequenzen der variablen Region der

Isoform Meta-2 deletiert sind, würde die Analyse der physiologischen Funktionen von CD44 Isoformen, die an der Metastasierung von Tumorzellen mitverantwortlich sind, erlauben. Mauslinien, die sich durch gezielte Mutationen, z.B. einer Deletion von Teilen der variablen Region des CD44 Gens, auszeichnen, können durch die Technik des "gene targetings" etabliert werden (Robertson,E.J.;1987). Grundlage dieser Technik ist die gezielte Mutation eines Allels innerhalb des Genoms von embryonalen Stammzellen (ES Zellen) durch homologe Rekombination zwischen dem ES Zellgenom und einem die gewünschte Mutation tragenden v6/v7 Deletionskonstrukt (Thomas,K.R.und Capecchi,M.R.;1986, Thomas,K.R. und Capecchi,M.R.;1987, Mansour,S.L.,et al.;1988,). Daran schließt sich die Etablierung einer heterozygot mutanten Mauslinie durch *in vivo* Differenzierung der ES Zellen an (Bradley,A.,et al.;1984, Gossler,A.,et al.;1986). Diese Technik wurde durch zwei Eigenschaften von ES Zellen ermöglicht:

1. ES Zellen behalten, nachdem sie aus der inneren Zellmasse von Blastozysten isoliert und für einige Zellgenerationen kultiviert wurden, ihren pluripotenten Charakter. Werden diese Zellen in den Hohlraum von Blastozysten injiziert nehmen sie an der Embryonalentwicklung der in Ammenmäuse reimplantierten Blastozysten teil. Pluripotente ES Zellen besitzen die Fähigkeit zu einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen zu differenzieren und somit an der Entwicklung sämtlicher Gewebe teilzunehmen (Evans,M.J. und Kaufman,M.H.;1981, Martin,G.R.;1981, Gossler,A.,et al.;1986, Hooper,M.,et al.;1987).

2. ES Zellen weisen eine hohe Effizienz in der homologen Rekombination zwischen einem genomische Sequenzen enthaltenden Konstrukt und dem homologen Genomabschnitt auf. Eine Voraussetzung dafür ist, daß der Homologieabschnitt zwischen dem ES Zellgenom und dem Konstrukt mehrere Kilobasenpaare umfaßt (Mansour,S.L.,et al.;1988, Hasty,P.,et al.;1991a, Hasty,P.,et al.;1991b, Deng,C. und Carpecchi,M.R.;1992, te Riele,H.,et al.;1992, Thomas,K.R.,et al.;1992, Zhang,H.,et al.;1994).

Bei ES Zellen des Mausstammes 129 sind diese beiden Eigenschaften besonders gut ausgeprägt, daher werden diese Zellen nahezu ausschließlich für "gene targeting" Experimente verwendet.

Um aus den mutierten ES Zellen eine Mauslinie zu etablieren ist es notwendig die ES Zellen in ihre embryonale Umgebung zurückzubringen. Dies kann durch Injektion der ES Zellen in den Hohlraum von Blastozysten erfolgen (Robertson,E.J.;1987). Nach Reimplantierung in Ammenmäuse durchlaufen diese Blastozysten eine normale Embryonalentwicklung wobei die ES Zellen an der Entwicklung aller Gewebe teilnehmen. Da die Mäuse die aus diesen Blastozysten entstehen sowohl Zellen, die aus Zellen der Blastozyste

hervorgegangen sind, als auch Zellen, die aus ES Zellen hervorgegangen sind enthalten, werden sie als chimäre Mäuse bzw. Chimäre bezeichnet. Haben sich ES Zellen zu Keimzellen entwickelt wird die Mutation an die Nachkommen der Chimäre weitergegeben. Durch Kreuzung der Chimären mit Wildtyp Mäusen können heterozygot mutierte Mäuse und durch Kreuzung der heterozygoten Mäuse untereinander homozygot mutierte Mäuse erhalten werden.

### **Zielsetzung der Arbeit**

Die einzelnen CD44 Isoformen enthalten einen unterschiedlich großen Teil der 414 Aminosäuren umfassenden variablen Region der größten, bisher klonierten CD44 Isoform. Diese Sequenzunterschiede der extrazellulären Domäne zwischen verschiedenen CD44 Isoformen weisen darauf hin, daß die Heterogenität der CD44 Proteinfamilie durch differentielles Spleißen eines CD44 Transkripts entsteht. Da die Genomstruktur der variablen Region Klarheit über die Ursache und das Ausmaß der Heterogenität der Aminosäuresequenz der variablen Region verschaffen würde, sollte in der vorliegenden Arbeit die Genomstruktur der variablen Region des CD44 Gens der Maus charakterisiert werden. Die dazu etablierten genomischen Klone des murinen CD44 Gens sollten zusammen mit der Kenntnis der Exonkomposition der variablen Region der Isoform Meta-2 als Grundlage für eine Deletion der an der Tumorprogression beteiligten Sequenzen des CD44 Gens in ES Zellen verwendet werden.

# Material und Methoden

## 1. Bezugsquellen

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose (TypII)	Appligene, Heidelberg
Agarose NA	Pharmacia, Uppsala
Agarose vom "low melting"-Typ	Appligene, Heidelberg
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	Bio Rad, München
Ampicillin	Sigma, München
AMV-Reverse Transkriptase	Stratagene, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienplatten	Greiner, Nürtingen
BSA	Serva, Heidelberg
Chemikalien	Sigma, München
	Merck, Darmstadt
dNTP, ddNTP	Boehringer, Mannheim
DTT	Sigma, München
DMEM	Gibco, Eggenstein
Elektroporationsküvetten	Bio Rad, München
Elutip-Säulen	Schleicher u. Schüll, Dassel
Ethidiumbromid	Sigma, München
Filter Millex-GV, Millex-AA	Millipore, Eschborn
FCS	Gibco, Eggenstein
G418	Gibco, Eggenstein
Gancyclovir	Syntex, Aachen
Glyzerin	BRL, Neu-Isenburg
Glykogen	Boehringer, Mannheim
GMEM	Gibco, Eggenstein
Hühnerserum	Gibco, Eggenstein
Klenow Polymerase	Promega, Heidelberg
LIF	Gibco, Eggenstein
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
N,N'-Methylenbisacrylamid	Bio Rad, München
Nitrozellulosemembran	Schleicher u. Schüll, Dassel
Nylonmembran	Amersham, Braunschweig
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Polynukleotid-Kinase	Biolabs, Schwalbach

radioaktive Nukleotide	Amersham, Braunschweig
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim Promega, Heidelberg
RPMI 1640	Gibco, Eggenstein
Taq-Polymerase	Cetus, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	Amersham, Braunschweig
T4-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
TEMED	Sigma, München
Trypsin 2,5%	Gibco, Eggenstein
96-well Platten	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturplatten	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

## **2.Plasmide**

pBluescript SK: wurde bezogen von Stratagene, Heidelberg.

pT7T3S: Derivat des pT7T3-19 von Gibco BRL, Eggenstein (Günthert,U.,et al.;1991). Das Plasmid pT7T3S wurde von dem Institut für Genetik des Forschungszentrum Karlsruhe zur Verfügung gestellt.

pHA178: Das Plasmid enthält eine korrigierte Version des PMC1 Neo polA (Mansour,S.L.,et al.;1988) kloniert in den Vektor pSP72 (Stratagene, Heidelberg).

pGEM7(tk): Das Plasmid enthält das virale Thymidinkinasegen (Mansour,S.L.,et al.;1988) und Sequenzen der Promoterregion und des Polyadenylierungssignal des murinen pgk-1 Gens (Adra,C.N.,et al.;1987) in dem Vektor pGEM7 (Stratagene, Heidelberg).

Die Plasmide pHA178 und pGEM7(tk) wurden von der Abteilung molekulare Genetik des AVL Amsterdam zur Verfügung gestellt.

## **3.Genbanken**

Des Mausstammes GR: Genomische DNA von GR Mäusen war mit der Restriktionsendonuklease EcoRI partial fragmentiert und in die EcoRI Restriktionsschnittstelle des Phagen Charon 4A kloniert worden. Die Genbank wurde von dem Institut für Genetik des Forschungszentrum Karlsruhe zur Verfügung gestellt.

Des Mausstammes 129/ola: Genomische DNA von 129/ola Mäusen war mit der Restriktionsendonuklease Sau3A partial fragmentiert und in die aufgefüllte XhoI Restriktionsschnittstelle des Phagen Lambda GEM-12 (Stratagene, Heidelberg) kloniert worden. Die Genbank wurde von der Abteilung molekulare Genetik des AVL Amsterdam zur Verfügung gestellt.



#### **4. Bakterienstämme**

*E. coli* DH5 $\alpha$ : Dieser Bakterienstamm wurde für die Multiplikation von Plasmid DNA verwendet.

*E. coli* LE392: Dieser Bakterienstamm wurde für die Multiplikation von Phagen DNA verwendet.

Beide Bakterienstämme wurden von dem Institut für Genetik des Forschungszentrum Karlsruhe zur Verfügung gestellt.

#### **5. Zelllinien**

GR: Diese Zelllinie war aus einem MMTV induzierten Tumor des Mausstammes GR etabliert worden und wurde von dem Institut für Genetik des Forschungszentrum Karlsruhe zur Verfügung gestellt. Die Kultur dieser Zellen erfolgte unter Standardbedingungen in RPMI 1640 Medium.

BRL: Buffalo rat liver cells. Diese Zellen wurden für die Konditionierung von ES Zellmedium verwendet und wurden von der Abteilung molekulare Genetik des AVL Amsterdam zur Verfügung gestellt.

E14: Diese ES Zelllinie war aus Blastozysten des Mausstammes 129/ola etabliert worden (Hooper, M., et al.; 1987) und wurde von der Abteilung molekulare Genetik des AVL Amsterdam zur Verfügung gestellt.

#### **6. Hybridisierungsproben**

Der cDNA Klon Meta-2 (Rudy, W., et al.; 1993), sowie ein Fragment der unterhalb des Exon v10 lokalisierten Intronsequenzen, das bei der Identifizierung heterozygoter ES Zellklone verwendet wurde, wurden von dem Institut für Genetik des Forschungszentrum Karlsruhe zur Verfügung gestellt.

#### **7. Oligonukleotide**

- #1: CGATGTCAGCAGCGGCTCCACCATCGA
- #2: CTTTATCCGGAGCACCTTGGCCACC
- #3: GCCTCAACTGTGCACTCAAAAAGCC
- #4: GTAGTTGCACTCGTTGTGGGC
- #5: GATGACCACCCCTGAAACACC
- #6: GCATCTTCGTTGTTGTATGAAG
- #7: CGGAGTCAAATACCAACCCAAC
- #8: GTACTGGAGATAAAATCTTCATC
- #9: CCACGGGTTTCTGCCCGCACAGAAGACAACC
- #10: GCCATCCTGGTGGTTGTC
- #11: GACAGAATCAGCACCAG

#12: GTGCTTGTAGCATGTGGGG  
#13: CAGAAGCAGCAGCTACCCAGCAGGAGACGTGG  
#14: CCCTTCTGTCACATGGGAG  
#15: CGGCCCAACAACCATCCAAG  
#16: GATGACCTTGTCCCATTGGATGTGAGATTGGG  
#17: CAGACTCCAGTCATAGTACAACCC  
#18: GTTGTCACTGAAAGTGGTCC  
#19: CAGAGTCATTCTCAGAAC  
#20: CTAGATGGCAGAATAGAAG  
#21: GATGCAAGAAGAGGTGGAAGTC  
#22: GGTAAGGAGCCATCAACATTAAC  
#23: GTCACAGTGCGGGA ACTCC  
#24: GATGAGCCATTCTGGAATCTGAGG

## **8. Transformation von Bakterien**

### **8.1. Herstellung kompetenter Bakterien (Hanahan, D.; 1983)**

Eine Übernachtskultur des benötigten Bakterienstammes wurde in SOB (20g/l Bacto-Trypton, 5g/l Bacto-Hefeextrakt, 10mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 2,5mM KCl) 1:100 verdünnt und weiter bei 37°C inkubiert. Bei einer OD<sub>580</sub> von 0,3 wurde die Bakterienkultur auf Eiswasser abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (Heraeus Minifuge T, 10min., 2k Upm, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 1/2 Volumen der ursprünglichen Bakterienkultur in STB (100mM KCl, 45mM MnCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 3mM Hexa-Amino-Kobalt-Chlorid, 10mM K-MES pH 6,5, 15% Glycerin) suspendiert und 30min. auf Eiswasser inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation. Das Bakterienpellet wurde in 1/50 Volumen der ursprünglichen Bakterienkultur in STB suspendiert und in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### **8.2. Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA**

1/10 eines Ligationsansatzes bzw. 1ng Plasmid DNA wurden mit 200µl kompetenter Bakterien 1Std. bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Temperaturschock für 45sek. bei 42°C. Die auf 4°C abgekühlten Bakterien wurden abzentrifugiert (Heraeus Biofuge15, 1min., 3k Upm, 4°C) und anschließend in 1ml SOC (SOB + 20mM Glukose) suspendiert. Die phänotypische Expression des Resistenzgens erfolgte während 30min. bei 37°C. Die transformierten Bakterien wurden auf Ampicillin haltigen LB Platten (10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Bacto-Hefeextrakt, 5g/l NaCl, 1,5% Bacto-Agar, 100µg/ml Ampicillin) ausgestrichen oder in Ampicillin haltigem 2xTY Medium (20g/l Bacto-

Trypton, 10g/l Bacto-Hefeextrakt, 5g/l NaCl, 100µg/ml Ampicillin) üN bei 37°C inkubiert.

## **9. Infektion von Bakterien mit Bakteriophagen**

### **9.1. Herstellung von kompetenten Bakterien, "plating cells"**

Eine Übernachtskultur des Bakterienstammes LE392 wurde 1:100 in 50ml NZCYM Medium (10g/l NZ-Amin, 5g/l NaCl, 5g/l Bacto-Hefeextrakt, 1g/l Casaminsäuren, 2g/l MgSO<sub>4</sub>) ,dem 0,2% Maltose zugefügt wurden, verdünnt und bei 37°C inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde die Bakterienkultur auf Eiswasser abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (Heraeus Minifuge T, 10min., 2k Upm, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 15ml eiskaltem 10mM MgSO<sub>4</sub> suspendiert.

### **9.2. Infektion von Bakterien mit Lambda Phagen**

Für die Ausplattierung auf LB Platten wurde die Stammkultur der Phagen in SM Medium (0,1M NaCl, 5mM Tris/HCl pH 7,5, 0,01% Gelatine, 2g/l MgSO<sub>4</sub>) verdünnt. Die verdünnte Phagenkultur wurde mit 200µl kompetenter "plating cells" 15min. bei RT inkubiert. Der Infektionsansatz wurde mit 8ml 50°C warmer Topagarose (NZCYM Medium + 1% Agarose) gemischt und auf LB Platten (Ø 14,5cm) gegossen. Es folgte eine üN Inkubation bei 37°C.

Für die Herstellung eines Lysats wurden  $5 \times 10^8$  kompetente "plating cells" (OD<sub>600</sub> von 1 entspricht  $8 \times 10^8$  Bakterien/ml) mit  $5 \times 10^6$  Phagen 15min. bei RT inkubiert. Der Infektionsansatz wurde anschließend in 25ml NZCYM Medium, dem 0,2% Maltose zugefügt wurde, üN bei 37°C inkubiert.

## **10. Präparation von Nukleinsäuren**

### **10.1. "small scale" Präparation von Plasmid DNA (Birnboim, C., et al.; 1979)**

1,5ml einer Übernachtskultur in Ampicillin haltigem 2xTY Medium wurden abzentrifugiert (Heraeus Biofuge15, 10sek., 10k Upm, RT), und der Überstand anschließend verworfen. Für den Aufschluß der Bakterien wurde das Pellet in 100µl Lsg.1 (50mM Glukose, 10mM EDTA pH 8,0, 25mM Tris/HCl pH 8,0, 4mg/ml Lysozym) suspendiert und die Suspension mit 200µl Lsg.2 (0,2N NaOH, 1% SDS) vermischt. Anschließend an einer Inkubation auf Eis für 3min., wurde mit 150µl eiskalter Lsg.3 ( 5M K-Acetat pH 4,8) neutralisiert. Es folgte eine Inkubation für 10min. auf Eis. Das entstandene Proteinpellet wurde abzentrifugiert (Heraeus Biofuge15, 10min., 15k Upm, RT). Aus dem Überstand wurde die DNA mit 1ml 99% EtOH<sub>pa.</sub> präzipitiert und anschließend abzentrifugiert (Heraeus Biofuge15, 15min., 15k Upm, RT).

### 10.2. "large scale" Präparation von Plasmid DNA

250ml einer Übernachtskultur in Ampicillin haltigem 2xTY Medium wurden abzentrifugiert (Heraeus Minifuge T, 10min., 4k Upm, 4°C), und der Überstand anschließend verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 20ml Lsg.1 suspendiert und anschließend 5min. bei RT inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 40ml Lsg.2 vermischt und 10min. auf Eis inkubiert. Die Neutralisierung erfolgte mit 30ml eiskalter Lsg.3. Das entstandene Proteinpellet wurde abzentrifugiert (Heraeus Minifuge T, 30min., 4k Upm, 4°C), und die DNA aus dem Überstand mit 0,8 Volumen Isopropanol präzipitiert. Das DNA Pellet wurde in 8ml TE (100mM Tris/HCl pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0) suspendiert und mit 2ml einer EtBr.Lsg. (5mg/mlTE) versetzt. In 10ml dieser DNA Lsg. wurden 10g CsCl gelöst. Die DNA wurde durch zentrifugieren (Beckmann VTi50, 18Std., 47k Upm, 15°C) in Banden angereichert. Nach der Zentrifugation wurde die untere Bande mit einer Kanüle abgezogen. Anschließend wurde das EtBr. durch Extraktion mit CsCl und TE gesättigtem Isopropanol entfernt. Die Plasmid DNA wurde aus der CsCl haltigen TE Lsg. mit 99% EtOH<sub>pa</sub>. präzipitiert.

### 10.3. Präparation von Phagen DNA

25ml Lysat, wie unter 9.2. beschrieben hergestellt, wurden mit 250µl Chloroform versetzt und 15min. bei 37°C inkubiert. Die Zelldebris wurden abzentrifugiert (Heraeus Minifuge T, 15min., 4k Upm, 4°C) und die im Überstand enthaltenen Nukleinsäuren durch 2µg/ml RNase A und DNase 1 während 30min. bei 37°C abgebaut. Die im Überstand enthaltenen Phagen wurden mit PEG gefällt. Dazu wurden 10g PEG6000 und 5,85g NaCl /100ml Überstand gelöst und die Lsg. 1Std. auf Eis inkubiert. Die Phagen wurden anschließend abzentrifugiert (Heraeus Minifuge T, 30min., 4k Upm, 4°C). Das Pellet wurde in 1ml SM Medium suspendiert und das PEG durch dreimalige Extraktion mit 2ml Chloroform entfernt. Der Aufschluß der Phagen erfolgte durch zweimalige Extraktion mit 1ml Phenol, wobei die Suspension jeweils 1min. durch Vortexen gemischt wurde. Anschließend wurde die wässrige Phase mit Phenol/Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die DNA wurde mit 99% EtOH<sub>pa</sub>. präzipitiert.

### 10.4. Präparation von DNA aus Säugerzellen

Die von der Zellkulturschale abgelösten Zellen wurden abzentrifugiert (Heraeus Biofuge15, 5min., 3k Upm, RT). Das Zellpellet wurde in 1/2 Volumen der ursprünglichen Zellsuspension an PBS (120mM NaCl, 28mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3) gewaschen und erneut abzentrifugiert

(Heraeus Biofuge15, 5min., 3k Upm, RT). Das Zellpellet wurde anschließend in 1/5 Volumen der ursprünglichen Zellsuspension an PBS suspendiert und auf Trockeneis gefroren. Die Zellsuspension wurde mit 5 Volumen Lysierungspuffer (100mM Tris/HCl pH 8,0, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl, 100µg/ml Proteinase K) versetzt und üN bei 65°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit Isopropanol präzipitiert.

### **10.5.Präparation von RNA aus Säugerzellen**

Die Zellen wurden wie unter 10.4. beschrieben abzentrifugiert und in PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 Volumen der ursprünglichen Zellsuspension an Lysierungspuffer (6M Guanidinium Isothiocyanat, 5mM Na Zitrat pH 7,0, 0,1M β-Merkaptoethanol, 0,5% Sarkosyl) durch Vortexen suspendiert. In jeweils 2,5ml Suspension wurden anschließend 1g CsCl gelöst und diese Lsg. über 1,2ml 5,7M CsCl in 0,1M EDTA pH 7,5 geschichtet. Die RNA wurde durch Zentrifugation (Beckman SW50, 14Std., 35k Upm, 20°C) pelletiert. Das RNA Pellet wurde anschließend in 1ml TE, dem 1% SDS zugesetzt wurde gelöst und einmal mit 1 Volumen einer 4:1 Mischung an Chloroform : Isobutanol extrahiert. Die RNA wurde anschließend mit 99% EtOH<sub>pa</sub>. präzipitiert.

### **10.6.Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260nm liegt, kann durch Messung der Absorption bei 260nm gegen TE die Konzentration einer DNA oder RNA haltigen Lsg. bestimmt werden. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht einem DNA Gehalt von 50µg/ml, einem RNA Gehalt von 40µg/ml und einer Oligonukleotidkonzentration von 25µg/ml. Das Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> sollte für DNA 2,0 und für RNA 1,8 betragen.

Alternativ dazu wurde die Konzentration von DNA Lsg.en auf einem analytischen Agarosegel abgeschätzt. In einem EtBr. (0,5µg/ml EtBr.) haltigem analytischen Agarosegel ist die Leuchtintensität von DNA bei UV Bestrahlung direkt proportional zur DNA Konzentration. Die DNA Menge, die in einer EtBr. gefärbten DNA Bande enthalten ist, kann daher durch Vergleich mit der Leuchtintensität eines Längenstandards bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

## **11.Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren**

### **11.1.Restrictionsendonukleasen**

Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen in Bezug auf Salzkonzentration und Inkubationstemperatur eingehalten.

Es wurden maximal 1/10 Volumen des Reaktionsansatzes an Restriktionsendonuklease eingesetzt. Es wurden 1-5 U der Restriktionsendonuklease für die Fragmentierung von 1µg DNA verwendet, wobei die Einheit U als die Enzymmenge definiert ist, die 1µg DNA des Phagen λ in 1Std. vollständig fragmentiert. Die Inkubationszeiten betragen zwischen 2 und 18Std.. Bei DNA, die aufgrund der Präparationsmethode noch RNA enthielt, wurde der Reaktionsansatz mit 10µg DNase freie RNase A versetzt.

### **11.2. Alkalische Phosphatase**

Für die Entfernung der 5' Phosphatgruppe von DNA Fragmenten wurde aus Kälberdarm stammende alkalische Phosphatase verwendet (CIP) verwendet. Es wurde ca. 1µg DNA in 50µl 1x CIP Puffer (100mM Glyzin pH 10,5, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM ZnCl<sub>2</sub>) mit 10 U CIP 1Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das DNA Fragment durch präparative Agarosegelelektrophorese gereinigt.

### **11.3. T4 DNA Polymerase**

Um überhängende 5' Enden aufzufüllen wurde T4 Polymerase verwendet. 0,5-2µg des DNA Fragments wurden in 50µl 1x Reaktionspuffer (50mM Tris/HCl pH 8,0, 0,5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT), der jeweils 250 µM der vier dNTP enthielt mit 1U T4 Polymerase 30min. bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Phenolextraktion gereinigt und mit 99% EtOH<sub>pa</sub> präzipitiert.

### **11.4. T4 DNA Ligase**

Für die Verknüpfung von DNA Fragmenten wurden 0,1-0,5µg der Fragmente in 1x Reaktionspuffer (20mM Tris/HCl pH 7,6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM ATP) mit 1-5 U T4 DNA Ligase üN bei 15°C inkubiert. 1/10-1/2 des Reaktionsansatzes wurden anschließend wie unter 7.2. beschrieben in Bakterien transformiert.

## **12. Elektrophorese von Nukleinsäuren**

### **12.1. analytische Agarosegelelektrophorese**

Um DNA Fragmente entsprechend ihrer Größe aufzutrennen wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen an 10x Auftragspuffer (50% Glycerin, 0,01M NaP Puffer pH 7,0, 0,4% Bromphenolblau) versetzt und auf einem 0,6-1,5% Agarosegel aufgetragen. Für die Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE (40mM Tris, 20mM Na-Azetat, 1mM EDTA, pH 7,0)

durch Erhitzen gelöst und anschließend mit 0,5µg/ml EtBr. versetzt. Der Laufpuffer enthielt 1x TAE, 0,5µg/ml EtBr.. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 mA. Die aufgetrennten DNA Fragmente wurden unter UV Licht photographiert (Rotfilter, Blende 8, 1sek. Belichtung). Die Größenbestimmung erfolgte anhand des Laufverhaltens eines parallel zu den Proben aufgetragenen Längenstandards, wobei die Laufstrecke eines Fragments vom Logarithmus seiner Größe abhing.

### 12.2.präparative Agarosegelelektrophorese

DNA Fragmente die für eine radioaktive Markierung oder Ligation vorgesehen waren, wurden durch Elektrophorese in "low melting" Agarosegele gereinigt. Für die Herstellung der 1% Gele wurde die entsprechende Menge "low melting" Agarose in 1x TAE gelöst und anschließend mit 0,5µg/ml EtBr. versetzt. Der Laufpuffer enthielt 1x TAE, 0,5µg/ml EtBr.. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 mA.

Um die DNA aus dem Gel zu isolieren wurde die entsprechende DNA Bande aus dem Gel ausgeschnitten und in 5ml "low salt" Puffer (200mM NaCl, 20mM Tris/HCl pH 7,4, 1mM EDTA) bei 65°C geschmolzen. Diese Lsg. wurde über eine, mit 1ml "high salt" Puffer (1M NaCl, 20mM Tris/HCl pH 7,4, 1mM EDTA) hydrierte und mit 5ml "low salt" Puffer äquilibrierte Elutip Säule gegeben. Die an das Säulenmaterial gebundene DNA wurde mit 3ml "low salt" Puffer gewaschen und anschließend mit 400µl "high salt" Puffer eluiert. Die DNA wurde anschließend mit 99% EtOH<sub>pa</sub>. präzipitiert.

### 12.3.analytische Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der radioaktiv markierten DNA Fragmente nach der unter 14.2. beschriebenen Sequenzierungsreaktion erfolgte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Für die Herstellung der 0,2mm dicken Gele wurde eine Lsg. von 6M Harnstoff, 7,75% Acrylamid, 0,25% Bisacrylamid in 1x TBE (90mM Tris, 90mM Borsäure, 2,5mM EDTA, pH 8,3) hergestellt. Die Polymerisierung wurde mit 300µl 10% APS und 30µl TEMED/30ml Gellösung gestartet. Um die Trennung der Glasplatten nach der Elektrophorese zu erleichtern wurde eine der Platten mit Repel-Silan (4% Dichlordimethylsilan in Tetrachlorkohlenstoff) behandelt. Die Proben wurden vor dem Auftragen 3min. bei 95°C denaturiert und auf Eiswasser abgekühlt. Der Laufpuffer enthielt 1x TBE. Die Elektrophorese erfolgte bei 1500V, ca. 20mM, ca. 60°C. Nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten voneinander getrennt, wobei das Gel auf der nicht vorbehandelten Platte haften blieb. Von dieser Platte wurde das Gel auf Filterpapier (Whatman 3mm)

übertragen und anschließend getrocknet. Die Exposition erfolgte unter Verwendung von Kodak XAR Filmen bei RT.

### **13. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren**

#### **13.1. Markierung von DNA Fragmenten**

Für die Markierung von DNA Fragmenten wurde das "Multiprime DNA labelling system" (Amersham) verwendet. 25-50ng des wie unter 12.2. beschrieben gereinigten DNA Fragments wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bi.dest.</sub> auf ein Volumen von 11,5µl gebracht und 10min. bei 95°C denaturiert. Die denaturierte DNA wurde auf Eiswasser abgekühlt und der Ansatz anschließend kurz zentrifugiert. Zu der DNA wurden 2,5µl "Multiprime buffer solution" (dATP, dTTP, dGTP in Tris/HCl pH 7,8, MgCl<sub>2</sub>, 2-Merkaptoethanol), 2,5µl "Primer solution" (Hexanukleotide in BSA), 50µCi α<sup>32</sup>P dCTP (3000Ci/mmol; Amersham) und 1µl "Enzyme solution" (1U/µl Klenow Polymerase in 50mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,5, 10mM 2-Merkaptoethanol, 50% Glycerin) pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde 1Std. bei 37°C inkubiert. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden über Elutip-Säulen entsprechend den Herstellerangaben abgetrennt.

#### **13.2. Markierung von Oligonukleotiden**

Die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden erfolgte durch Kinasierung mit γ<sup>32</sup>P ATP und T4 Polynukleotid Kinase. 100pmol des Oligonukleotids wurden in 1x Kinasepuffer (50mM Tris/HCl pH 7,6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 0,1mM Spermidin, 0,1mM EDTA) mit 150µCi γ<sup>32</sup>P ATP (3000Ci/mmol) und 10 U T4 Polynukleotid Kinase 1Std. bei 37°C inkubiert.

### **14. Analyse von Nukleinsäuren**

#### **14.1. Southern Blot Analyse**

Die wie unter 12.1. beschrieben auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennte DNA wurde durch einen Kapillarblot auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Um die DNA im Gel zu denaturieren wurde das Gel 1Std. bei RT in Denaturierungspuffer (0,2N NaOH, 0,6M NaCl) und anschließend 1Std. bei RT in Neutralisierungspuffer (1M Tris/HCl pH 7,5, 0,6M NaCl) geschwenkt. Der Blotaufbau wurde in Anlehnung an die Beschreibung in der Literatur (Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.; Molecular cloning; 1983) durchgeführt.

Der Transfer erfolgte üN bei RT, wobei 20x SSC (3M NaCl, 0,3M Tri-Na-Citrat pH 7,5) als Blotpuffer verwendet wurde. Anschließend an den Transfer



wurde die Nitrozellulosemembran mit 10x SSC gewaschen und mit UV Licht bestrahlt (Stratalinker, 120mJ).

Für die Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA Fragmenten, wurde die Nitrozellulosemembran in Plastikbeutel eingeschweißt. Die Vorhybridisierung der Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte in 50-100ml Hybridisierungspuffer (10x Denhardts: 0,2% Ficoll, 0,2% Polyvinylpyrrolidone, 0,2% BSA; 6x SSC, 0,1% SDS, 0,05% Na-Pyrophosphat, 100µg/ml denaturierte Heringsperm DNA) 4Std. bei 65°C.

Die radioaktiv markierte Hybridisierungsprobe wurde 5min. bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eiswasser abgekühlt. Die Hybridisierung der Nitrozellulosemembran erfolgte in 20-50ml Hybridisierungspuffer üN bei 65°C. Der Anteil der Hybridisierungsprobe, der nicht spezifisch an der Membran gebunden war, wurde durch 3x 30min. Waschen der Nitrozellulosemembran in 50-100ml 0,5x SSC, 0,1% SDS bei 65°C entfernt.

Die Hybridisierung mit Oligonukleotiden erfolgte bei 42°C. Das Waschen der Membran im Anschluß an die Hybridisierung erfolgte ebenfalls bei 42°C.

#### 14.2. Sequenzierung

Die Sequenzierung der klonierten PCR Produkte von cDNA bzw. genomischen Sequenzen der variablen Region erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchs durch Einbau von Dideoxynukleotiden (Sanger, F., et al.; 1977). Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, deren Bindungsstellen innerhalb der Exons der variablen Region bzw. innerhalb des Vektors pT7T3S lokalisiert waren.

Denaturierung: 5-10µg Plasmid DNA wurden in 20µl H<sub>2</sub>O<sub>bi.dest.</sub> gelöst. Die DNA Lsg. wurde mit 20µl 2x Denaturierungspuffer (0,4N NaOH, 0,4mM EDTA pH 8,2) gemischt und 5min. bei RT inkubiert. Die Neutralisierung erfolgte durch Zusatz von 4µl 3M NH<sub>4</sub>-Azetat pH 4,5. Die denaturierte DNA wurde mit 88 µl 99% EtOH<sub>pa.</sub> bei -20°C präzipitiert.

Bindung des Primers: Die denaturierte DNA wurde abzentrifugiert (Heraeus Biofuge15, 30min., 15k Upm, 4°C) und anschließend getrocknet. Das DNA Pellet wurde in 6µl H<sub>2</sub>O<sub>bi.dest.</sub> aufgenommen und mit 2µl 5x Sequenzierpuffer (200mM Tris/HCl, pH 7,5, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 250mM NaCl) versetzt. Nach Zusatz von 2µl des in TE (10mM Tris/HCl pH 7,5, 1mM EDTA) suspendierten Primers (0,5pmol/µl) folgte eine Inkubation für 3min. bei 68°C. Die Proben wurden anschließend bei RT auf 39°C abgekühlt und anschließend kurz zentrifugiert (Heraeus Biofuge15, 30sek., 15k Upm, RT).

Markierungs-Reaktion: Zu dem Reaktionsansatz wurden 2µl 1:5 verdünnter Markierungs-Mix (7,5µM dGTP, dCTP, dTTP), 2µl T7 DNA Polymerase

(1,5U/ $\mu$ l) und 1 $\mu$ l  $\alpha^{35}$ S dATP (10 $\mu$ Ci; 650Ci/mmol; Amersham) pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 3min. bei RT.

Terminationsreaktion: Jeweils 3,5 $\mu$ l des Reaktionsansatzes wurden mit 2,5 $\mu$ l der 4 Terminationsmische (320 $\mu$ M dNTP + 8 $\mu$ M ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP in 50mM NaCl) gemischt und 5min. bei 37°C inkubiert. Durch Zusatz von 4 $\mu$ l Stop-Puffer (95% Formamid, 20mMEDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylen-Cyanol) wurden die Reaktionen gestoppt. Die Auftrennung der radioaktiv markierten DNA Fragmente erfolgte durch analytische Polyacrylamidgel Elektrophorese, wie unter 12.3.beschrieben.

### 14.3.Amplifikation von DNA Sequenzen durch "Polymerase chain reaction"

1ng Plasmid DNA oder Phagen DNA bzw. 100ng genomische DNA wurden in 100 $\mu$ l 1x PCR Puffer, dem 1mM dNTP zugesetzt wurde, mit jeweils 250ng der 3' und 5' Amplifikationsprimer und 5U Taq Polymerase unter folgenden Bedingungen inkubiert:

Denaturierung: 45sek. bei 94,5°C

Annealing: 2-3min. bei 60-65°C

Synthese: 3min. bei 72°C

Um ein Verdampfen des Reaktionsgemisches zu verhindern, wurde der Reaktionsansatz mit Paraffinöl überschichtet. Nach 35 Zyklen (Coy Thermo-Cycler) wurden 10 $\mu$ l des Reaktionsansatz auf einem analytischen Agarosegel wie unter 12.1.beschrieben analysiert. Alternativ wurde der Reaktionsansatz auf einem präparativen Agarosegel, wie unter 12.2. beschrieben aufgetrennt.

## 15.Klonierung von Nukleinsäuren.

### 15.1.Klonierung von cDNA verschiedener CD44 Isoformen.

Um cDNA Sequenzen verschiedener CD44 Isoformen zu klonieren, wurde aus Zellen der Linie GR wie unter 10.5.beschrieben isolierte RNA revers transkribiert. Anschließend wurden cDNA Sequenzen der variablen Region durch "Polymerase chain reaction (PCR)" amplifiziert und in den Vector pT7T3S kloniert.

reverse Transkription: 10 $\mu$ g RNA wurden in 13 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bi.dest.</sub> 5min. bei 64°C denaturiert und anschließend auf Eiswasser abgekühlt. Der Reaktionsansatz wurde mit 2 $\mu$ l 10x Reaktionspuffer (500mM Tris/HCl pH 8,0, 60mM MgCl<sub>2</sub>, 400mM KCl, 10mM DTT), 2 $\mu$ l 15mM dNTP, 1 $\mu$ l RNasin, 20pmol OligodT (20pmol/ $\mu$ l) und 20 U AMV Reverse-Transkriptase (20 U/ $\mu$ l) versetzt und 1Std. bei 41°C inkubiert. Anschließend wurde die reverse Transkriptase durch 3min. bei 65°C inaktiviert und das Volumen des Reaktionsansatz mit H<sub>2</sub>O<sub>bi.dest.</sub> auf 200 $\mu$ l erhöht.

Amplifikation der cDNA Sequenzen der variablen Region: 10µl des verdünnten Reaktionsansatzes der reversen Transkription wurden wie unter **14.3.** beschrieben durch PCR amplifiziert. Dabei wurden Oligonukleotide verwendet, deren Bindungsstellen 104bp oberhalb und 127bp unterhalb der Insertionsstelle für Sequenzen der variablen Region bei Position nt880 der cDNA Sequenz der CD44 Standardform (Zhou,D.F.H.,et al.; 1989) lokalisiert sind. Um die Klonierung der Amplifikationsprodukte zu erleichtern, enthielt der 5' Amplifikationsprimer eine Schnittstelle der Restriktionsendonuklease EcoRI.

Klonierung der Amplifikationsprodukte: Die Amplifikationsprodukte wurden durch eine Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform, Chloroform/Isoamylalkohol und anschließender Präzipitation mit 99% EtOH<sub>pa.</sub> gereinigt. Anschließend erfolgte eine Fragmentierung der Amplifikationsprodukte mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI, wobei sich die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease BamHI bei Position nt2178 der cDNA Sequenz der CD44 Standardform befindet. Die fragmentierten Amplifikationsprodukte wurden wie unter **12.2.** beschrieben auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und die DNA anschließend aus dem Gel isoliert. Die Klonierung der EcoRI-BamHI Fragmente erfolgte, wie unter **11.4.** beschrieben, in den ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI fragmentierten Vektor pT7T3S.

### **15.2.**Klonierung von genomischen Sequenzen der variablen Region.

Die Klonierung genomischer Sequenzen der variablen Region erfolgte aus Genbibliotheken der Mausstämmen GR und 129/ola im Phagen Lambda. Pro Genbibliothek wurden  $2 \times 10^6$  Phagen auf Agarplatten, wie unter **9.2.** beschrieben, mit einer Dichte von 25000 Phagen/Petrischale (Ø 14,5cm) ausplattiert. Nach einer 12h Inkubation bei 37°C wurden die Phagenplatten durch 10min. bei 4°C abgekühlt. Auf die Phagenplaques wurde eine Nylonmembran (Amersham) aufgebracht. Nach 5min. bei RT wurde die Nylonmembran entfernt und mit der umgekehrten Orientierung auf ein, mit Denaturierungspuffer (0,4N NaOH, 0,6M NaCl) getränktes Filterpapier für 5min. bei RT gelegt. Anschließend wurde die Nylonmembran zweimal auf ein, mit Neutralisierungspuffer (1M Tris/HCl pH 7,5, 0,6M NaCl) getränktes Filterpapier für 10min. bei RT gelegt. Danach wurde die Nylonmembran kurz mit 20x SSC gespült. Die getrocknete Nylonmembran wurde 1 1/2 Std. bei 80°C gebacken. Um Phagen zu identifizieren, die Sequenzen der variablen Region enthalten, wurden die Nylonmembranen mit den Sequenzen der variablen Region des größten CD44 cDNA Klons der Maus, wie unter **14.1.** beschrieben,

hybridisiert. Dazu wurden die Sequenzen der variablen Region als EcoRI-BamHI Fragment von den Vektorsequenzen abgetrennt. Die Regionen der Phagenplatten, die mit der verwendeten Probe hybridisierten, wurden aus den Phagenplatten ausgestochen und in SM Medium suspendiert. Eine Verdünnung dieser Suspension wurde erneut ausplattiert und die Plaques anschließend mit der bereits beschriebenen Hybridisierungsprobe der variablen Region der Maus hybridisiert. Einzelne Plaques, die mit den Sequenzen der variablen Region der Maus hybridisierten, wurden aus den Phagenplatten ausgestochen und in SM suspendiert. Daran anschließend erfolgte die Isolierung der DNA dieser Phagenklone, wie unter 10.3. beschrieben.

### 15.3. Klonierung der Amplifikationsprodukte der genomischen Sequenzen.

Ausgehend von Phagen DNA bzw. genomischer DNA von Zellen der Linie GR wurden die Intronsequenzen der variablen Region, wie unter 14.3. beschrieben, durch PCR amplifiziert. Als Amplifikationsprimer wurden Oligonukleotide verwendet, deren Bindungsstellen in benachbarten Exons der variablen Region lokalisiert sind. Die Enden der Amplifikationsprodukte wurden, wie unter 11.3. beschrieben, durch T4 Polymerase aufgefüllt. Die aus einem präparativen Agarosegel isolierten Amplifikationsprodukte wurden in die EcoRV Restriktionsschnittstelle des Vektors p7T3S, wie unter 11.4. beschrieben, kloniert.

### 15.4. Klonierung der Targeting-Konstrukte.

Die genomischen Sequenzen des v6/v7 Deletionskonstrukts bzw. des tk/neo Deletionskonstrukts setzen sich aus einem 7,2kB großen EcoRI Fragment und einem 2,8kB großen NotI-HpaI Fragment zusammen. Das EcoRI Fragment hybridisierte mit Oligonukleotiden, deren Bindungsstellen in den Exons v8, v9 und v10 lokalisiert sind. Das NotI-HpaI Fragment hybridisierte mit Oligonukleotiden, deren Bindungsstellen in den Exons v4 und v5 liegen. Beide Fragmente wurden durch präparative Agarosegelelektrophorese von, mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI bzw. NotI und HpaI fragmentierter DNA der genomischen Phagenklone der variablen Region, isoliert. Das EcoRI Fragment wurde in die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease EcoRI des Vektors pBluescript SK kloniert. Das dabei entstandene Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease XhoI linearisiert und die Enden durch T4 Polymerase aufgefüllt. Dieses Fragment wurde mit dem 2,8kB großen NotI-HpaI Fragment, dessen Enden ebenfalls durch T4 Polymerase aufgefüllt worden waren, ligiert. Bei der Ligation von aufgefüllten XhoI und NotI Restriktionsschnittstellen entsteht erneut eine Schnittstelle der Restriktions-

endonuklease XhoI. Das entstandene Plasmid wurde als tk/neo Deletionskonstrukt eingesetzt.

Um das Thymidinkinasegen des Herpes Simplex Virus mit dem bakteriellen Neomycinresistenzgen als Selektionsmarker zu kombinieren, wurden das Plasmid pGEM7(tk) und pHA178 fusioniert. Das Plasmid pGEM7(tk) enthält das virale Thymidinkinasegen, sowie die Promoterregion und das Polyadenylierungssignal des murinen pgk-1 Gens. Das Plasmid pHA178 enthält das bakterielle Neomycinresistenzgen, sowie die Promoterregion und das Polyadenylierungssignal des viralen Thymidinkinasegens und eine Duplikation des SV40 Enhancers. Das Plasmid pGEM7(tk) wurde mit der Restriktionsendonuklease BamHI linearisiert und mit dem, den Selektionsmarker enthaltenden XhoI-HindIII Fragment des Plasmids pHA178, ligiert. Die Fusion des viralen Thymidinkinasegens und des bakteriellen Neomycinresistenzgens wurde in Form eines XhoI-SalI Fragments, in das mit der Restriktionsendonuklease SalI linearisierten tk/neo Deletionskonstrukt, kloniert. Das dabei entstandene Plasmid wurde als v6/v7 Deletionskonstrukt eingesetzt.

## **16. Kultur von embryonalen Stammzellen (ES Zellen).**

Allgemein wurden die in der Literatur beschriebenen Methoden verwendet.

Die ES Zelllinie E14 war von Hooper, M. und Mitarbeiter aus Blastozysten des Mausstammes 129/ola isoliert worden (Hooper, M., et al.; 1987).

### **16.1. Isolierung und Inaktivierung embryonaler Fibroblasten (Mef).**

Die Kultur der ES Zellen erfolgte auf einem Monolayer von embryonalen Fibroblasten, die durch  $\gamma$  Bestrahlung inaktiviert wurden.

Tag 14 p.c. alte Mausembryos wurden aus dem Uterus isoliert und in PBS gewaschen. Die Organe und der Kopf wurden entfernt und der restliche Körper erneut in PBS gewaschen. Die Embryos wurden in Trypsin/EDTA Lsg. (2ml/Embryo) mit Hilfe von Pinzetten fein zerteilt und 30min. bei 37°C inkubiert. Die Gewebeteile wurden anschließend mit Hilfe von Pasteur Pipetten weiter suspendiert. Die Suspension wurde 3min. bei RT in einem 15ml Falcon Gefäß stehen gelassen, so daß größere Gewebeteile auf den Gefäßboden sinken konnten. Der Überstand wurde mit 25ml Mef Kulturmedium (GMEM, 2mM L-Glutamin, 1mM Na-Pyruvat, 1x Nicht-essenzielle Aminosäuren, 10<sup>-4</sup>M 2-Mercaptoethanol, 1x Pen/Strep, 10% FCS,) gemischt und in 162cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (1Embryo/162cm<sup>2</sup>) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O gesättigte Atmosphäre, inkubiert. Nachdem die Mef einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden sie in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren (81cm<sup>2</sup>/Gefäß).

Um die Mef durch  $\gamma$ -Bestrahlung zu inaktivieren, wurden die Zellen erneut auf  $162\text{cm}^2$  in Mef Kulturmedium unter Standardbedingungen kultiviert und zweimal 1:5 passagiert. Die  $25 \times 162\text{cm}^2$  konfluenten Monolayer wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA Lsg. ( $4\text{ml}/162\text{cm}^2$ ) 5min. bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit Mef Kulturmedium ( $4\text{ml}/162\text{cm}^2$ ) neutralisiert und die Zellen wurden abzentrifugiert (Heraeus, 5min., 1,2k Upm,  $4^\circ\text{C}$ ). Das Zellpellet wurde in 25ml Mef Kulturmedium suspendiert und bei  $4^\circ\text{C}$  mit 2500 rad bestrahlt. Die bestrahlte Zellsuspension wurde mit 25ml Mef Kulturmedium, dem 20% DMSO zugefügt worden war gemischt und in 1ml Aliquots in flüssigem  $\text{N}_2$  eingefroren.

Um einen Monolayer inaktiverter Mef für die Kultur von ES Zellen zu präparieren, wurde die Oberfläche von Zellkulturschalen mit 1% Gelatine/ $\text{H}_2\text{O}$  bedeckt und 30min. bei RT inkubiert. Die inaktivierten Mef wurden aufgetaut und nach abzentrifugieren (Heraeus, 5min., 1,2k Upm, RT) in Mef Kulturmedium suspendiert. Die Gelatine Lsg. wurde von den Zellkulturplatten abgesaugt und die Mef Suspension auf die Oberfläche von  $80\text{cm}^2$  verteilt. Nach mindestens 4Std. bei Standardkulturbedingungen wurde das Mef Kulturmedium abgesaugt und eine Suspension von ES-Zellen in ES-Zellkulturmedium (GMEM, 2mM L-Glutamin, 1mM Na-Pyruvat, 1x Nicht-essenzielle Aminosäuren,  $10^{-4}\text{M}$  2-Mercaptoethanol,  $10^3\text{U/ml}$  LIF, 10% FCS) auf den Mef Monolayer verteilt. Um die ES-Zellen zu passagieren, wurde ein 50-80% konfluenter ES Zell Monolayer mit PBS gewaschen und mit 10x TVP (PBS, 1mM EDTA, 1% Hühner Serum, 0,25% Trypsin) bedeckt. Nach 10min. bei  $37^\circ\text{C}$  wurde das 10x TVP mit dem gleichen Volumen an ES-Zellkulturmedium neutralisiert und die ES Zellen zu Einzelzellen suspendiert. Die ES Zell Suspension wurde auf einen Monolayer inaktiverter Mef verteilt.

### 16.2. Konditionierung von ES Zellkulturmedium.

BRL Zellen wurden in Standardkulturmedium (GMEM, 2mM L-Glutamin, 1mM Na-Pyruvat, 1x Nicht-essenzielle Aminosäuren, 10% FCS) in  $162\text{cm}^2$  Kulturflaschen zu einem konfluenten Monolayer unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 3 Tagen wurde der Monolayer mit 60ml Standardkulturmedium bedeckt. Nach weiteren 7 Tagen wurde das Kulturmedium durch 0,8mm Millex-AA Filter filtriert. Um konditioniertes 60% ES Zellkulturmedium herzustellen, wurden 150ml konditioniertes Medium mit 100ml Standardkulturmedium, 1,5ml 200mM L-Glutamin, 250 $\mu\text{l}$  0,1M 2-Mercaptoethanol,  $10^3\text{U/ml}$  LIF versetzt und durch 0,22 $\mu\text{m}$  Millex-AA Filter filtriert.

### 16.3. Subklonierung von ES Zellen.

Eine 96well Zellkulturplatte wurde, wie unter 16.1. beschrieben, mit Monolayern von teilungsinaktiven Mef versehen. 50 ES Zellen einer, in ES Zellkulturmedium verdünnten Zellsuspension, wurden in 20ml ES Zellkulturmedium auf die Mef Monolayer verteilt (200µl/well). Die Einzelklone wurden bis zu einer Oberfläche von 4cm<sup>2</sup> kultiviert. 2cm<sup>2</sup> wurden in ES Zellkulturmedium, dem 10% DMSO zugesetzt wurde, in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Aus den restlichen 2cm<sup>2</sup> wurde, wie unter 10.4. beschrieben, genomische DNA präpariert.

### 16.4. Analyse des Karyotyps.

2cm<sup>2</sup> einer 50% konfluenten ES Zellkultur wurden mit 0,5ml ES Zellkulturmedium, dem 0,05µg/ml Colcemid zugesetzt worden war, 2-2,5Std. unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Die ES Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und mit 10x TVP von der Schalenoberfläche abgelöst. Das Trypsin wurde mit Standardkulturmedium neutralisiert und die Zellsuspension abzentrifugiert (Heraeus, 5min., 1,2k Upm, RT). Der Überstand wurde bis auf ca. 50µl verworfen. Das Zellpellet wurde in den restlichen 50µl suspendiert und vorsichtig mit 1ml 0,075M KCl versetzt. Nach 7min. bei RT wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (Heraeus, 5min., 1,2k Upm, RT). Der Überstand wurde bis auf ca. 50µl verworfen und das Zellpellet in den restlichen 50µl suspendiert. Die Zellen wurden anschließend in 1ml Methanol:Essigsäure 3:1 während 5min. bei RT fixiert und anschließend erneut abzentrifugiert (Heraeus, 5min., 1,2k Upm, RT). Die Fixierung wurde zweimal wiederholt. Das Pellet wurde in ca. 300µl Methanol:Essigsäure suspendiert. 25µl wurden aus einem Abstand von ca. 30cm auf einen Objekträger getropft. Nach dem Trocknen wurde der Objekträger für 1min. in 70% Essigsäure behandelt. Der trockene Objekträger wurde mit 30µl DABCO/DAPI und einem Deckgläschen bedeckt. (DABCO/DAPI: 2g DABCO in 90ml Glycerin bei 60°C lösen. 10ml 1M Tris/HCl pH 8,0 zufügen und auf RT abkühlen. 100µl 20% Thimerosal und 7,5µl DAPI 1mg/ml zufügen.) Die Chromosomen konnten bei UV Licht ausgezählt werden.

### 16.5. Elektroporation von ES Zellen und Klonierung.

Die DNA des v6/v7 Deletionskonstrukts bzw. des tk/neo Deletionskonstrukts wurde mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und NotI fragmentiert. Dadurch werden die Vektorsequenzen von den genomischen Sequenzen der Konstrukte getrennt. Die fragmentierte DNA wurde auf einem präparativen Agarosegel aus 1% Agarose NA in 1xTAE, 0,5µg/ml EtBr. aufgetrennt. Das

14kB bzw. 10kB große XhoI-NotI Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und in einem Dialyseschlauch elektroeluiert. Der Puffer war während der Gelelektrophorese und der Elektroelution 1xTAE. Die DNA haltige TAE Lsg. wurde 10min. auf 65°C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde die DNA mit Phenol, Phenol/Chloroform, und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und anschließend mit 99% EtOH<sub>pa</sub>. präzipitiert. Nach Abzentrifugieren (Heraeus Minifuge T, 30min., 4k Upm, 4°C) wurde das DNA Pellet mit 80% EtOH<sub>pa</sub>. gewaschen und anschließend getrocknet. Für die Elektroporation wurde die DNA in PBS gelöst. Die ES Zellen wurden mit 10xTVP von den Zellkulturschalen während 10min. bei 37°C abgelöst und nach Neutralisierung des Trypsin mit ES Zellkulturmedium zu Einzelzellen suspendiert.  $5 \times 10^7$  ES Zellen wurden abzentrifugiert (Heraeus, 5min., 1,2k Upm, RT) und anschließend in der DNA/PBS Lsg. suspendiert. Die Elektroporation (Biorad Genepulser) erfolgte mit 60-120µg DNA in 600µl PBS bei 0,8kV, 3µF, RT. Nach 10min. bei RT wurden die Zellen in 60% konditioniertes ES Zellkulturmedium suspendiert und auf gelatinebehandelte Zellkulturschalen verteilt. Nach der Elektroporation mit dem Targeting-Konstrukt wurde dem Kulturmedium 24Std. später 200µg/ml G418 zugefügt. Nach der Elektroporation mit dem tk/neo Deletionskonstrukt wurden die ES Zellen 3 bzw. 4 Tage später in Gancyclovir (0,2µM) haltigem Kulturmedium weiter kultiviert. Alternativ dazu wurden die Zellen nach 9 Tagen 1:100 passagiert. Nach weiteren 3 Tagen wurde dem Medium Gancyclovir zugefügt. Die G418 bzw. Gancyclovir resistenten ES Zellklone wurden 8-10 Tage nach der Elektroporation bzw. dem letzten Passagieren von den Zellkulturschalen isoliert. Dazu wurden die Zellklone einzeln mit einer Pipette in 25µl 1xTVP überführt und 5min. bei 37°C inkubiert. Nach Neutralisierung mit 25µl ES Zellkulturmedium wurden die ES Zellklone zu Einzelzellen suspendiert und in 200µl ES Zellkulturmedium auf einem Mef Monolayer verteilt. Nach 3-5 Tagen wurden die ES Zellklone 1:3 auf 96well Platten passagiert. Nach weiteren 3-5 Tagen wurden die ES Zellen einer 96well Platte in ES Zellkulturmedium, dem 10% DMSO zugefügt worden war, bei -80°C eingefroren. Die übrigen zwei 96well Platten wurden zur Präparation von genomischer DNA verwendet.

#### **16.6. Injektion der ES Zellen in Blastozysten.**

Um eine ausreichend große Menge an Blastozysten isolieren zu können, wurden Weibchen des Stammes C57BL/6 durch Hormoninjektionen superovuliert. Dazu wurde am Tag 1 das Hormon FSH, und am Tag 3 das Hormon LH injiziert. Anschließend erfolgte die Befruchtung durch ein



C57BL/6 Männchen. Weibchen, die am Tag 4 einen Befruchtungsplug aufwiesen, wurden am Tag 7 getötet und der Uterus mit Standardkulturmedium ausgewaschen. In die Blastozysten wurden jeweils 10-15 ES Zellen injiziert. Jeweils 10-15 Blastozysten wurden in den Uterus einer pseudo-trächtigen (Tag 2,5p.c.) Ammenmaus reimplantiert.

#### 16.7.GPI Analyse.

Ein kleines Stück eines Gewebes wurde in 30µl PBS suspendiert und die Gewebedebris anschließend abzentrifugiert (Heraeus Biofuge15, 10min., 15k Upm, RT). Jeweils 8µl des Überstandes wurden auf eine zuvor in Laufpuffer (Supre-Heme Puffer: 1,46g/l Tris/Borsäure pH 8,2-8,6) angefeuchtete Zelluloseazetat Platte aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Zip Zone Kammer (Helena Laboratories) mit 300V, 3mA. Für den Nachweis des Enzyms GPI wurden 9ml einer 1% Agaroselösung mit jeweils 200µl Fructose-6-phosphat (57mg/ml), NADP (10mg/ml), PMS (1,8mg/ml), MTT (10mg/ml) bei 55°C gemischt. Nach Zusatz von 200µl Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (50U/ml) wurde die Lsg. über die Gelplatte gegossen und die Platte anschließend vor Licht geschützt. Nach einigen min. konnten die Banden fotografiert werden.

# Ergebnisse

## **Die Heterogenität der variablen Region entsteht durch differentielles Spleißen von 10 Exons**

Eine Ursache für die verschiedenen Isoformen der CD44 Proteinfamilie der Ratte sind Unterschiede in der Größe und Sequenz der variablen Region. Die Sequenzen der variablen Region der verschiedenen CD44 Isoformen sind Bestandteil der 414 Aminosäuren umfassenden variablen Region der größten bisher klonierten Isoform. Dies weist darauf hin, daß die Heterogenität der Sequenzen der variablen Region durch differentielles Spleißen eines CD44 Transkripts entsteht. Eine Gegenüberstellung der Sequenz der variablen Region verschiedener CD44 Isoformen und der Genomstruktur der variablen Region sollte einen Aufschluß über die Anzahl der differentiell gespleißten Exons und das Ausmaß der dadurch entstehenden Heterogenität ermöglichen. Da ein weiteres Ziel die Deletion einzelner Exons der variablen Region in ES Zellen war, wurden cDNA und genomische Klone der variablen Region des CD44 Gens der Maus etabliert und analysiert.

Als Quelle für Transkripte verschiedener CD44 Isoformen der Maus wurden epitheliale Zellen der Linie GR verwendet. Zellen dieser, aus einem durch genomische Integration von Sequenzen des MMTV induzierten Mammarkarzinom des Mausstammes GR etablierten Linie, exprimieren ein breites Spektrum unterschiedlich großer CD44 Transkripte. Das Größte durch Northern Blot Hybridisierung mit Sequenzen der variablen Region der Isoform Meta-1 nachweisbare Transkript umfaßt 5kB, was dem größten bisher klonierten CD44 Transkript der Ratte entspricht. Es war daher zu erwarten, daß in den Zellen der Linie GR eine zu der CD44 Proteinfamilie der Ratte vergleichbare Variabilität der Sequenzen der variablen Region analysiert werden kann.

Der Vergleich von zuvor klonierten CD44 Isoformen von Mensch und Ratte zeigt, daß die Insertionsstelle der variablen Region zwischen verschiedenen CD44 Isoformen und verschiedenen Spezies konserviert ist. Dementsprechend ist die Insertionsstelle von Sequenzen der variablen Region innerhalb muriner CD44 Transkripte bei der Position 879 der cDNA Sequenz der murinen CD44 Isoform CD44s (Zhou,D.F.H,et al.;1989) zu erwarten. Für die Amplifikation verschiedener, in dieser Position inserierter Sequenzen, wurde RNA aus Zellen der Linie GR wie unter 15.1. beschrieben vom Poly-A Ende ausgehend revers transkribiert. Die Amplifikation der cDNA erfolgte wie unter 14.3. beschrieben durch PCR zwischen zwei Oligonukleotiden deren Bindungsstelle 104bp 5´

bzw. 127bp 3' der Insertionsstelle von Sequenzen der variablen Region lag. Die Produkte dieser Amplifikation wurden auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt. Nach Färbung dieses Gels mit Ethidiumbromid war ein Amplifikationsprodukt mit einer Größe von 330bp sichtbar. Der Southern Blot dieses Gels wurde mit Sequenzen des cDNA Klon Meta-2 hybridisiert. Das Autoradiogramm dieser Hybridisierung ist in Abb.1 dargestellt.

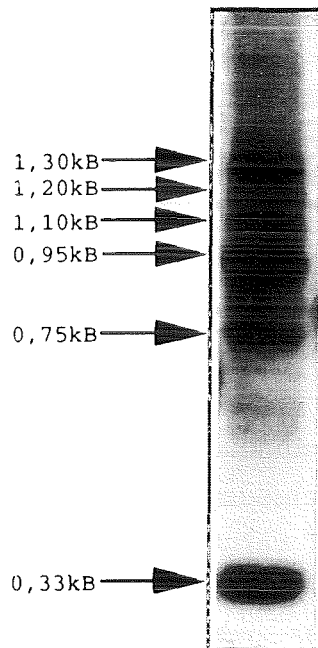


Abb.1: GR Zellen exprimieren eine Vielzahl von verschiedenen CD44 Isoformen. Die Abb. zeigt ein Autoradiogramm einer Southern Blot Hybridisierung verschieden großer Amplifikationsprodukte der RT-PCR von Sequenzen der in GR Zellen exprimierter CD44 Isoformen mit Sequenzen des cDNA Klon Meta-2. Die Pfeile markieren einzelne Amplifikationsprodukte. Die Größe der Amplifikationsprodukte ist angegeben. Der Nachweis der Expression verschiedener Spleißprodukte von CD44 wurde durch reverse Transkription von Poly-A RNA und anschließender PCR Amplifikation durchgeführt. Für die Amplifikation wurden Oligonukleotide als Primer verwendet, die an Position 746 und 2252 der publizierten CD44 cDNA Sequenz (Zhou,D.F.H.,et al.;1989) binden. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 1%igen analytischen Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Southern Blot Hybridisierung wurde mit  $\alpha^{32}\text{P}$  dATP markierten Sequenzen des cDNA Klon Meta-2 durchgeführt.

Der cDNA Klon Meta-2 enthält neben Sequenzen der variablen Region auch Sequenzen der konstanten Abschnitte der CD44 Transkripte. Da die für die Amplifikation von Sequenzen der variablen Region verwendeten Oligonukleotide in einem Abstand von 104bp bzw. 127bp zu der Insertionsstelle von Sequenzen der variablen Region binden, enthält jedes Amplifikationsprodukt Sequenzen der konstanten Abschnitte der CD44 Transkripte und hybridisiert daher mit der verwendeten Probe.

Zusätzlich zu dem im Agarosegel nachweisbaren Amplifikationsprodukt mit einer Größe von 330bp hybridisierten mehrere durch Ethidiumbromidfärbung nicht nachweisbare Amplifikationsprodukte, die eine Größe zwischen 1,3 und 0,8kB aufwiesen, mit den Sequenzen des Meta-2. Die in dem Größenbereich zwischen 0,2 und 1,5kB vorhandenen Amplifikationsprodukte wurden wie unter 15.1. beschrieben in den Vektor T3T7S kloniert, wobei die in Position 935 der publizierten Pgp-1 Sequenz (Zhou, D.F.H., et al.; 1989) vorhandene BamHI Schnittstelle verwendet wurde. Die klonierten cDNA Sequenzen wurden mit Hilfe von Oligonukleotiden deren Bindungsstellen innerhalb der Sequenzen des Vektors oder der Sequenzen der cDNA lagen wie unter 14.2. beschrieben sequenziert. Die Größe der aus Zellen der Linie GR isolierten cDNA Sequenzen der variablen Region verschiedener CD44 Isoformen variierte zwischen 117bp und 1245bp. Die Sequenz des größten cDNA Klons ist in Abb.2 dargestellt. Zusätzlich zu den Sequenzen der variablen Region unterschiedlicher CD44v Isoformen konnten cDNA Klone identifiziert werden deren Sequenz die der Isoform CD44s entspricht. Die Sequenz dieser cDNA Klone stimmt mit der publizierten cDNA Sequenz (Zhou, D.F.H., et al.; 1989) des 190bp großen Abschnitts zwischen der Bindungsstelle des ersten Amplifikationsprimers und der BamHI Restriktionsschnittstelle bei Position 935 überein. Abb.3 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz der größten, aus Zellen der Linie GR klonierten variablen Region mit den zuvor bekannten Aminosäuresequenzen homologer Sequenzabschnitte aus cDNA Klonen von Mensch und Ratte.

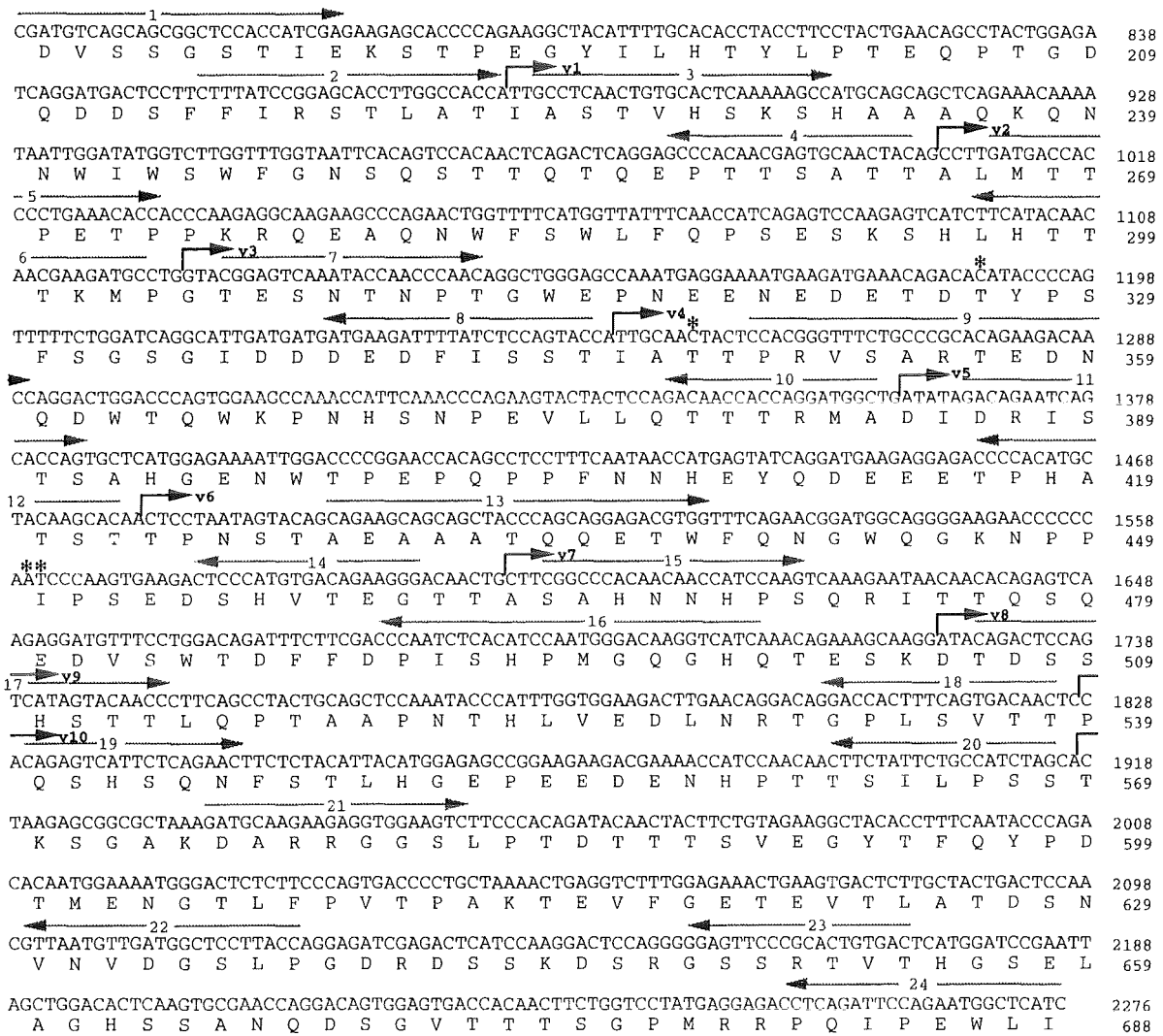


Abb.2: Sequenz der variablen Region des größten CD44 cDNA Klons der Maus.

Die Abb. zeigt einen Ausschnitt der Nukleotid- und der Aminosäuresequenz des größten CD44 cDNA Klons der Maus. Die Nummerierung der Nukleotide bzw. Aminosäuren entspricht der von Zhou, D.F.H., et al.; 1989 vorgeschlagenen, beginnend am N-Terminus des beschriebenen cDNA Klons.

Die Exons v1 bis v10 sind durch schwarze Pfeile begrenzt. Die Unterteilung der variablen Region in 10 Exons basiert auf dem Ergebnis der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Charakterisierung der Genomstruktur der variablen Region. Die Nukleotide der cDNA Sequenz, die von der publizierten Sequenz (Screaton, G.R., et al.; 1993) abweichen, sind markiert. Die Bindungsstellen der Oligonukleotide, die für die Sequenzierung der cDNA und der Exon-Intron Übergänge der variablen Region, sowie bei der Charakterisierung der Genomstruktur der variablen Region verwendet wurden, sind durch graue Pfeile repräsentiert.

		v1																																							
m	I	A	S	T	V	H	S	K	E	H	A	A	A	Q	R	K	N	N	W	I	W	S	W	F	G	N	S	Q	S	T	T	Q	T	O	E	P	T	T	S	261	
r	I	A	S	T	V	Y	S	K	S	H	A	T	A	Q	K	Q	N	N	W	I	W	S	W	F	G	N	S	Q	S	T	T	Q	T	O	D	S	P	T	T	T	300
h	L	T	S	T	V	H	S	N	S	H	A	T	A	Q	E	Q	N	N	*	I	W	S	W	F	G	N	S	Q	P	.	.	K	T	Q	D	L	T	T	T	218	
		v2																																							
m	A	T	T	A	L	M	T	T	P	E	T	P	P	K	R	O	E	A	Q	N	W	F	S	W	L	F	Q	P	S	E	H	K	S	H	L	H	301				
r	A	T	T	A	L	M	T	T	P	E	T	P	P	K	R	O	E	A	Q	N	W	F	S	W	F	Q	P	S	E	S	K	S	H	L	H	340					
h	A	T	T	A	L	M	S	T	S	A	T	A	T	E	T	A	T	K	R	Q	E	T	W	D	W	F	S	W	L	F	L	F	G	E	S	K	N	R	L	H	258
		v3																																							
m	T	T	T	K	M	F	G	T	E	S	N	T	N	P	T	G	W	E	P	N	E	E	N	E	D	E	T	D	T	Y	P	S	F	S	G	S	G	I	D	D	341
r	T	T	T	K	M	F	G	T	E	S	N	T	N	P	T	G	W	K	P	N	E	E	N	E	D	E	T	D	K	Y	P	N	F	S	G	S	G	I	D	D	380
h	T	T	T	K	M	F	S	T	S	N	T	I	S	A	G	W	E	P	N	E	E	N	E	D	E	R	D	R	H	L	S	F	S	G	S	G	I	D	D	298	
		v4																																							
m	D	E	D	F	I	S	S	T	I	A	T	T	P	R	V	S	A	R	T	E	D	N	Q	D	W	T	Q	W	K	P	N	H	S	N	P	E	V	L	L	Q	381
r	D	E	D	F	I	S	S	T	I	A	T	T	P	W	V	S	A	H	T	K	Q	N	Q	E	R	T	O	W	N	P	I	H	G	N	P	E	V	L	L	Q	420
h	D	E	D	F	I	S	S	T	I	S	T	P	R	A	F	D	H	T	K	Q	N	Q	D	W	T	O	W	N	P	S	H	S	N	P	E	V	L	L	Q	338	
		v5																																							
m	T	T	T	R	M	A	D	I	D	R	I	S	T	S	A	H	G	E	N	W	T	P	E	P	Q	P	P	F	N	N	H	E	Y	Q	D	E	E	E	T	P	421
r	T	T	T	R	M	T	D	I	D	R	N	S	T	S	A	H	G	E	N	W	T	Q	E	P	Q	P	P	F	N	N	H	E	Y	Q	D	E	E	E	T	P	460
h	T	T	T	R	M	T	D	V	D	R	N	G	T	T	A	Y	E	G	H	N	P	E	A	H	P	E	L	I	H	H	E	H	H	E	E	E	E	T	P	378	
		v6																																							
m	H	A	T	S	T	T	F	N	S	T	A	E	A	A	A	T	Q	Q	E	T	W	F	O	N	G	W	Q	G	K	N	P	P	I	F	S	E	D	458			
r	H	A	T	S	T	T	W	A	D	F	N	S	T	T	E	E	A	A	T	Q	K	E	K	W	F	E	N	E	W	Q	G	K	N	P	P	T	F	S	E	D	500
h	H	S	T	S	T	I	Q	A	T	F	S	S	T	T	E	E	T	A	T	Q	K	E	Q	W	F	G	N	R	M	H	E	G	Y	R	Q	T	E	R	E	D	418
		v7																																							
m	S	H	V	T	E	G	T	T	A	S	A	H	N	N	H	F	S	Q	R	I	T	T	Q	S	Q	E	D	V	S	W	T	D	F	F	D	P	I	S	H	497	
r	S	H	V	T	E	G	T	T	A	S	A	H	N	N	H	F	S	Q	R	M	T	T	Q	S	Q	E	D	V	S	W	T	D	F	F	D	P	I	S	H	539	
h	S	N	S	T	T	Q	T	A	A	S	A	H	T	S	H	E	M	O	G	R	T	T	P	S	P	E	D	S	S	W	T	D	F	F	N	P	I	S	H	458	
		v8																																							
m	F	M	G	Q	G	H	Q	T	E	S	K	D	T	D	S	S	H	S	T	T	L	Q	F	T	A	A	P	N	T	H	L	V	E	D	L	N	R	T	G	536	
r	F	M	G	Q	G	H	Q	T	E	S	K	D	T	G	S	S	H	S	T	T	L	Q	F	T	A	A	P	N	T	H	L	V	E	D	L	N	R	T	G	578	
h	F	M	G	R	G	H	Q	A	G	R	R	M	D	M	D	S	S	H	S	T	T	L	Q	F	T	A	N	P	N	T	G	L	V	E	D	L	D	R	T	G	498
		v9		v10																																					
m	P	E	S	V	T	T	P	Q	S	H	S	Q	N	F	S	T	L	H	G	E	P	E	E	D	E	N	H	P	T	T	S	I	L	P	S	T	K	S	G	576	
r	P	L	S	V	T	T	P	Q	S	H	S	Q	N	F	S	T	L	P	G	E	L	E	E	G	E	D	H	P	T	T	S	V	L	P	S	T	K	S	G	615	
h	P	L	S	M	T	T	Q	S	N	H	Q	S	F	S	T	S	H	E	G	L	E	E	D	K	D	H	P	T	T	S	T	L	T	S	G	N	R	N	D	538	
m	A	K	D	A	R	F	G	G	S	L	P	T	D	T	T	S	V	E	G	Y	T	F	Q	Y	F	D	T	M	E	N	G	T	L	F	F	V	T	P	A	616	
r		R	R	R	G	G	S	L	P	R	D	T	T	T	S	L	E	G	Y	T	P	Q	Y	F	D	T	M	E	N	G	T	L	F	F	V	T	P	A	655		
h	V	T	G	G	R	R	D	P	N	H	S	E	G	S	T	T	L	L	E	G	Y	T	S	H	Y	F	H	T	K	E	S	R	T	F	I	F	V	T	S	A	578
m	K	T	E	V	F	G	E	T	E	V	T	L	A	T	D	S	N	V	N	V	D	G	S	L	P	637															
r	K	T	E	V	F	G	E	T	E	C	T	V	A	T	D	S	N	F	N	V	D	G	S	L	P	676															
h	K	T	G	S	E	G	V	T	A	V	T	V	G	D	S	N	S	N	V	N	R	S	L	S	602																

Abb.3: Die Sequenz der variablen Region ist zwischen Maus, Ratte und Mensch konserviert.

Die Abb. zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz der variablen Region zwischen Maus (m), Ratte (r) und Mensch (h). Die Sequenzen wurden aus Hofmann, M., et al.; 1991, Sreaton, G.R., et al.; 1993 und Tölg, C., et al.; 1993 entnommen. Die Nummerierung der Aminosäuren beginnt am N-terminalen Ende und entspricht der in Stamenkovic, I., et al.; 1989, Zhou, D.F.H., et al.; 1989 und Günthert, U., et al.; 1991 verwendeten Nummerierung. Die zwischen zwei Spezies konservierten Aminosäuren sind hellgrau, die zwischen drei Spezies konservierten Aminosäuren sind dunkelgrau unterlegt. Die Exongrenzen sind durch Pfeile markiert. Das Stopcodon in Exon v1 der humanen Sequenz ist durch einen Stern repräsentiert.

Die Berechnung von Ähnlichkeit und Übereinstimmung dieser Aminosäuresequenzen ergab für den Vergleich zwischen Maus und Ratte 94% Ähnlichkeit und 90% Übereinstimmung und für den Vergleich zwischen Maus und Mensch 75% Ähnlichkeit und 63% Übereinstimmung. Der Vergleich der Sequenzen der variablen Region verschiedener Amplifikationsprodukte zeigt, daß die variable Region des größten cDNA Klons in 8 Abschnitte unterteilt werden kann, die in den unterschiedlichen Amplifikationsprodukten vorhanden sein oder fehlen können (Abb.4). Diese Abschnitte wurden mit v1, v2, v3, v4, v5, v6, v7 und v8-10 bezeichnet. Die Größe dieser Abschnitte schwankt zwischen 114bp für v4 und 401bp für v8-10.

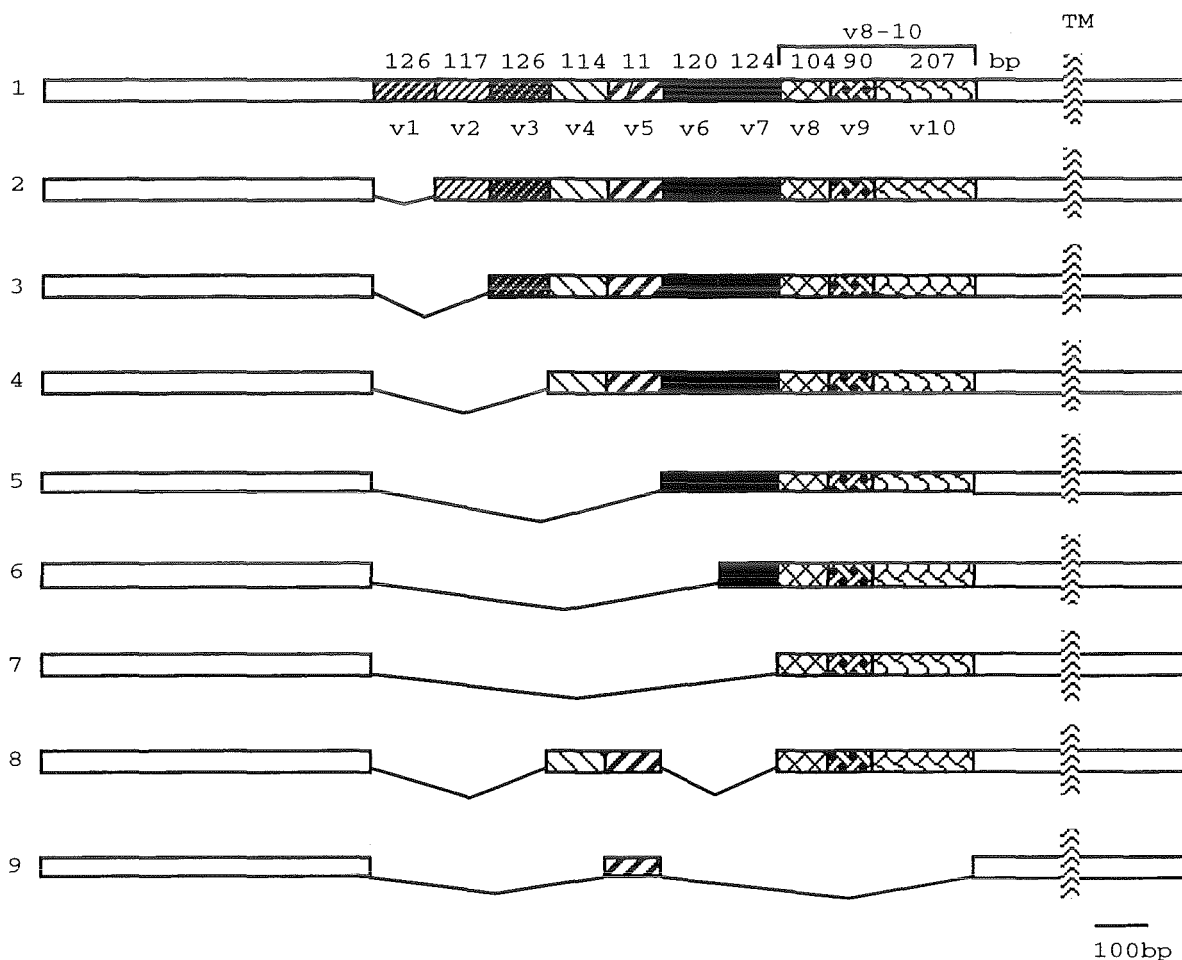


Abb.4: Die Heterogenität der variablen Region entsteht durch Kombination von unterschiedlichen Exons.

Die Abb. zeigt eine schematische Darstellung der aus Zellen der Linie GR etablierten cDNA Klone der variablen Region. Die einzelnen cDNA Abschnitte bzw. Exons der variablen Region sind als unterschiedlich strukturierte Rechtecke dargestellt. Die Exons der variablen Region wurden mit v1 bis v10 bezeichnet. Die Unterteilung des cDNA Abschnitts v8-10 in die Exons v8 bis v10 beruht dabei auf dem Ergebnis der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Charakterisierung der Genomstruktur der variablen Region. Die Größe der einzelnen Exons ist angegeben. Die Standardsequenzen sind durch leere Rechtecke dargestellt. TM bezeichnet die Transmembrandomäne.

Die einzelnen variablen Regionen der heterogenen CD44 Transkripte unterscheiden sich daher in ihrer Zusammensetzung aus diesen 8 cDNA Abschnitten. Dies weist darauf hin, daß die Heterogenität der variablen Region der CD44 mRNAs der Maus durch differentielles Spleißen entsteht. Der Prozentanteil der zwischen den drei Spezies Maus, Mensch und Ratte übereinstimmenden Aminosäuren, der aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz der variablen Region, ist für die einzelnen Abschnitte bzw. Exons in Tabelle1 angegeben.

Tabelle1

cDNA Abschnitt	% Übereinstimmung
v1	70,7%
v2	74,7%
v3	73,8%
v4	65,8%
v5	52,5%
v6	51,3%
v7	66,7%
v8-10	60,9%

Tab.1:Übersicht über die Homologie der cDNA Abschnitte der variablen Region zwischen Maus, Ratte und Mensch.

Es ist der Prozentanteil der zwischen allen drei Spezies übereinstimmenden Aminosäuren angegeben.

Um die Exonstruktur der variablen Region zu bestätigen, wurde die Genomstruktur der variablen Region des CD44 Gens der Maus analysiert. Dabei wurden genomische Klone der variablen Region verwendet, die durch Hybridisierung mit Sequenzen der variablen Region des in Abb.4 dargestellten murinen CD44 cDNA Klons #1 wie unter 15.2. beschrieben aus einer Genbank des Mausstammes GR identifiziert und isoliert wurden. Die Genbank war durch Klonierung von muriner GR-DNA nach partieller Fragmentierung mit der Restriktionsendonuklease EcoRI in die EcoRI Restriktionsschnittstelle des  $\lambda$  Phagen Charon 4A hergestellt worden (Hynes,N.E.,et al.;1981).



Es wurden vier voneinander unabhängige Klone, die Sequenzen der variablen Region enthielten, isoliert. Aus diesen Phagen wurde DNA isoliert, wie unter 10.3. beschrieben, und anschließend mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten. Die entstandenen Fragmente wurden auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt. Die Ethidiumbromidfärbung dieses Gels ist in Abb.5 dargestellt.

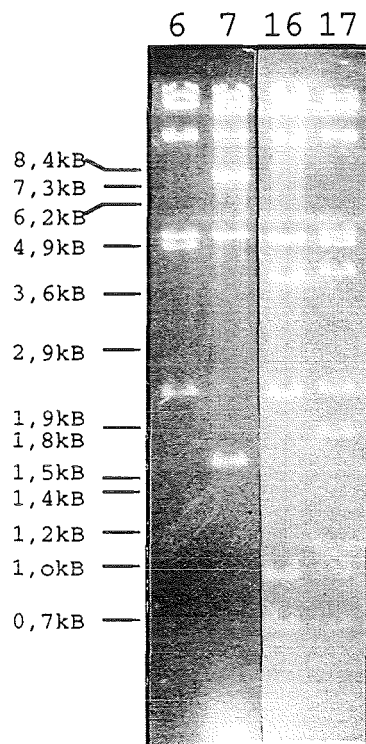


Abb.5: Isolierung von genomischen Klonen der variablen Region.

Die Abb. zeigt ein Photo ethidiumbromidgefärbter EcoRI Fragmente, von vier unabhängigen, genomischen Klonen des CD44 Gens der Maus, nach Auftrennung durch Gelelektrophorese.

Die Größe der EcoRI Fragmente des Markers SPP1 ist angegeben.

Um genomische Sequenzen der variablen Region zu klonieren wurde eine Phagenbank des Mausstammes GR mit der cDNA Sequenz der Exons v4 bis v10 hybridisiert. Es konnten vier unabhängige Phagenklone isoliert werden. 0,5µg der Phagen DNA der einzelnen Klone wurden mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten und anschließend auf einem 1%igen analytischen Agarosegel aufgetrennt.

Die vier unabhängigen Phagenklone zeigen ein unterschiedliches Muster an EcoRI Fragmenten. Die in allen Klonen vorhandenen Fragmente mit einer Größe von 11,1kB und 19,9kB entsprechen den Phagenarmen. Alle übrigen EcoRI Fragmente müssen genomischen Sequenzen des CD44 Gens entsprechen. Durch Hybridisierung von Southern Blots des in Abb.5 dargestellten analytischen Agarosegels mit Oligonukleotiden die innerhalb der einzelnen Abschnitte der cDNA der variablen Region, v1, v2, v3, v4, v5, v6, v7 und v8-10 binden, konnte die Reihenfolge der genomischen EcoRI Fragmente festgelegt werden. Das Ergebnis dieser Hybridisierungen ist schematisch in Abb.6 zusammengefaßt.

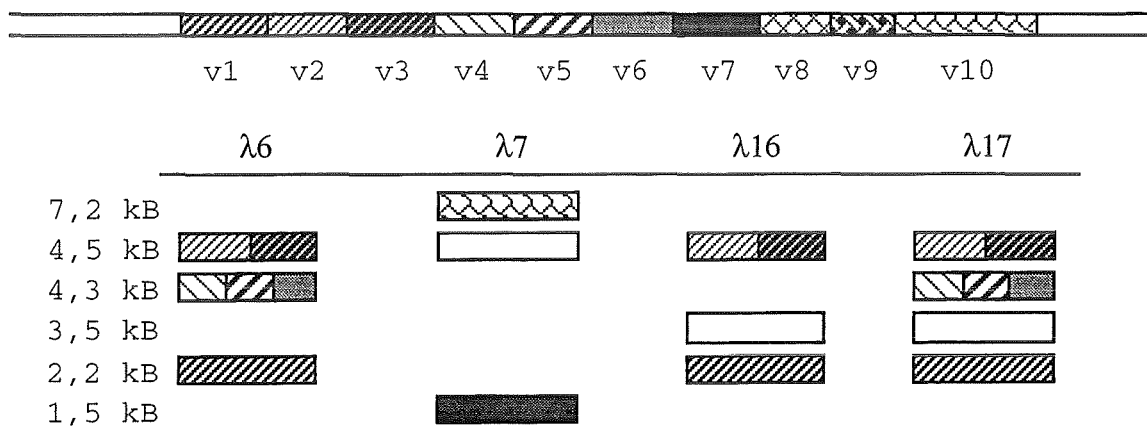


Abb.6: Die Exons der variablen Region können einzelnen EcoRI Fragmenten der genomischen Klone der variablen Region zugeordnet werden.

Die Abb. zeigt eine schematische Darstellung der Ergebnisse der Southern Blot Hybridisierung von EcoRI Fragmente der genomischen Klone des murinen CD44 Gens mit Oligonukleotiden, deren Bindungsstelle in einem der Exons der variablen Region lokalisiert ist. Die EcoRI Fragmente sind durch Rechtecke dargestellt. Die Größe der EcoRI Fragmente ist angegeben. Die Schraffierungen der einzelnen Rechtecke spiegelt das Ergebnis der Southern Blot Hybridisierungen wieder und entspricht der für die Darstellung der einzelnen Exons der variablen Region gewählten Schraffierung. Beispielsweise hybridisierte das 4,3kB große EcoRI Fragment des Phagen λ 6 mit Oligonukleotiden deren Bindungsstellen innerhalb der Exons v4, v5 und v6 lokalisiert sind.

Die EcoRI Fragmente des in Abb.5 dargestellten analytischen Agarosegels wurden durch einen Southern Blot Transfer auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Bei der Southern Blot Hybridisierung wurden  $\gamma^{32}\text{P}$  markierte Oligonukleotide verwendet. Die Bindungsstellen der Oligonukleotide befinden sich innerhalb einzelner Exons der variablen Region bzw. innerhalb der an die variable Region angrenzenden Exons der CD44 cDNA und sind in Abb.2 eingezeichnet.

Beispielsweise hybridisierte das 4,3kB große EcoRI Fragment des Phagen  $\lambda$  6 mit Oligonukleotiden, deren Bindungsstellen innerhalb der vermuteten Exons v4, v5 und v6 liegen. Das 4,5kB große EcoRI Fragment des Phagen  $\lambda$  6 hybridisierte mit Oligonukleotiden, deren Bindungsstellen innerhalb der vermuteten Exons v2 und v3 lokalisiert sind. Da die Exons v2 und v3 innerhalb der CD44 cDNA 5' der Exons v4, v5 und v6 lokalisiert sind, befindet sich das 4,5kB große EcoRI Fragment des Phagen  $\lambda$  6 innerhalb des CD44 Gens 5' des 4,3kB großen EcoRI Fragments des selben Phagen.

Um die EcoRI Fragmente zu identifizieren, deren Sequenzen die variable Region innerhalb der cDNA auf beiden Seiten flankieren, wurde der Southern Blot des in Abb.5 dargestellten analytischen Agarosegels mit einem Oligonukleotid, dessen Bindungsstelle 5' an die variable Region angrenzt und einem Oligonukleotid, dessen Bindungsstelle 31bp 3' der variablen Region liegt, hybridisiert. Das 4,5kB große EcoRI Fragment des Phagen  $\lambda$  7 hybridisierte mit dem Oligonukleotid, dessen Bindungsstelle 5' der variablen Region lokalisiert ist. Das 3,5kB große EcoRI Fragment der Phagen  $\lambda$  16 und  $\lambda$  17 hybridisierte mit dem Oligonukleotid, dessen Bindungsstelle 3' der variablen Region lokalisiert ist. Die Sequenzen, die die variable Region innerhalb der cDNA flankieren sind daher Bestandteil eines 4,5kB bzw. 3,5kB großen EcoRI Fragments des CD44 Gens. Das 1,7kB große und das 0,85kB große EcoRI Fragment des Phagen  $\lambda$  17 sowie das 0,7kB große und das 0,6kB große EcoRI Fragment der Phagen  $\lambda$  16 und  $\lambda$  17 hybridisierten mit keiner der verwendeten Hybridisierungsproben. Die Position dieser Fragmente innerhalb der klonierten genomischen Region konnte daher nicht durch Southern Blot Hybridisierung ermittelt werden. Die Position der EcoRI Fragmente, die Sequenzen der variablen Region bzw. der angrenzenden konstanten Bereiche der CD44 cDNA enthalten, ist in Abb.7 dargestellt.

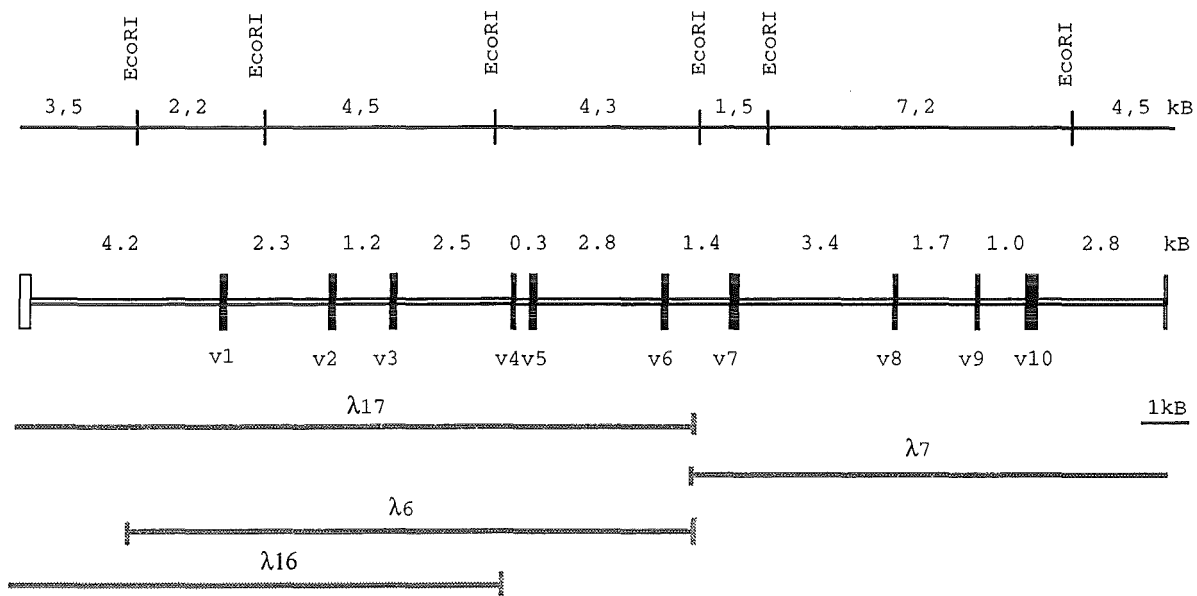


Abb.7: Schematische Darstellung der Genomstruktur der variablen Region.

Um die Größe der Introns innerhalb der variablen Region zu ermitteln wurden die genomischen Sequenzen zwischen benachbarten Exons der variablen Region durch PCR amplifiziert. Die Bindungsstellen der dabei als Primer verwendeten Oligonukleotide sind in Abb.2 eingezeichnet. Die Größenbestimmung der Amplifikationsprodukte erfolgte durch Auftrennung in einem 1%igen analytischen Agarosegel. Die Exons der variablen Region sind durch schwarze Balken, die in allen bisher klonierten CD44 Isoformen der Maus enthaltenen Exons sind durch leere Rechtecke dargestellt. Die Intronsequenzen zwischen den einzelnen Exons sind durch waagerechte Balken dargestellt. Die Größe der Introns ist angegeben.

Die Schnittstellen der Restriktionsendonuklease EcoRI innerhalb der variablen Region wurden aus dem Ergebnis der in Abb.6 dargestellten Southern Blot Analyse der genomischen Klone der variablen Region abgeleitet. Die Größe der EcoRI Fragmente ist angegeben. EcoRI Fragmente die mit keiner der verwendeten Hybridisierungsproben detektiert werden konnten sind in der EcoRI Restriktionskarte nicht enthalten.

Die in den einzelnen Phagenklone enthaltenen genomischen Sequenzen sind als graue waagerechte Striche dargestellt.

Um die aus den genomischen Klonen abgeleitete EcoRI Restriktionskarte der variablen Region zu bestätigen wurden Southern Blot Hybridisierungen von EcoRI geschnittener DNA aus Zellen der Linie GR durchgeführt.

Als Hybridisierungsproben wurden Fragmente der in Abb.4 dargestellten murinen CD44 cDNA Klone verwendet. Ein Fragment umfaßte die cDNA Abschnitte v1 und v2, das zweite Fragment die cDNA Abschnitte v4 bis v10. Aus der EcoRI Restriktionskarte der Phagen DNA geht hervor, daß diese Hybridisierungsproben genomische EcoRI Fragmente der Größe 4,5kB und 2,2kB (v1-v2) sowie der Größe 7,2kB, 4,3kB und 1,5kB (v4-v10) erkennen sollten. Die Autoradiogramme der Southern Blot Hybridisierungen sind in Abb.8 dargestellt.

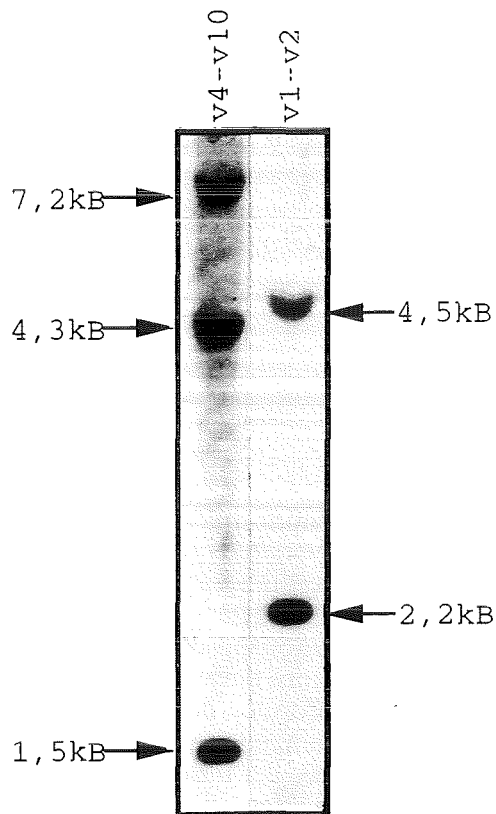


Abb.8: Das Mausgenom enthält nur ein CD44 Gen: Bestätigung der aus genomischen Klonen abgeleiteten EcoRI Restriktionskarte der variablen Region durch Southern Blot Analyse genomischer DNA von GR Zellen.

Die Abb. zeigt ein Autoradiogramm einer Southern Blot Hybridisierung von EcoRI Fragmenten genomischer DNA aus GR Zellen, mit Sequenzen der Exons v4 bis v10, sowie v1 bis v2. Die EcoRI Fragmente, die mit den verwendeten Proben hybridisieren, sind durch Pfeile markiert, die Größe dieser Fragmente ist angegeben.

10µg aus Zellen der Linie GR isolierte genomische DNA wurden mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten und anschließend auf einem 0,8%igen analytischen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde durch einen Southern Blot Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Southern Blot Hybridisierung wurde mit zwei verschiedenen, mit  $\alpha^{32}\text{P}$  markierten DNA Fragmenten der variablen Region durchgeführt. Die erste Hybridisierungsprobe enthielt die Exons v4 bis v10, die zweite Hybridisierungsprobe enthielt die Exons v1 und v2. Zwischen den einzelnen Hybridisierungen wurde der Southern Blot vollständig dehybridisiert. Beide Hybridisierungsproben detektieren die aufgrund der in Abb.7 dargestellten EcoRI Restriktionskarte der variablen Region erwarteten EcoRI Fragmente mit einer Größe von 7,2, 4,3, und 1,5kB bzw. 4,5 und 2,2kB. Es wurden keine zusätzlichen EcoRI Fragmente, die auf die Existenz weiterer CD44 Gene hinweisen würden, nachgewiesen.

Beide Hybridisierungsproben detektierten die aufgrund der EcoRI Restriktionskarte der Phagenklone erwarteten genomischen EcoRI Fragmente. Sollte, abweichend von der Situation im Rattengenom, mehr als ein CD44 Gen vorhanden sein, würden, da die unterschiedlichen CD44 Gene sich in der Anordnung der EcoRI Restriktionsschnittstellen der variablen Region unterscheiden würden, zusätzliche EcoRI Fragmente hybridisieren. Da nur die EcoRI Fragmente des bereits klonierten CD44 Gens nachgewiesen werden konnten, ist im Mausgenom ebenfalls nur ein CD44 Gen vorhanden. Die enorme Heterogenität der Exonkomposition innerhalb der variablen Region zwischen verschiedenen CD44 Isoformen der Maus entsteht daher, in Analogie zur CD44 Expression der Ratte, durch differentielles Spleißen eines alle Exons der variablen Region enthaltenden Primärtranskripts.

Um den Abstand zwischen den einzelnen Exons der variablen Region zu ermitteln, wurden die Sequenzen zwischen Oligonukleotiden, deren Bindungsstellen innerhalb der Exons der variablen Region lokalisiert waren, wie unter 14.3. beschrieben durch "Polymerase chain reaction" amplifiziert und die Größe der jeweiligen Produkte auf einem analytischen Agarosegel bestimmt.

Im menschlichen CD44 Gen ist der dem murinen cDNA Abschnitt v8-10 entsprechende Teil in drei Exons unterteilt, die für 34, 30 und 67 Aminosäuren kodieren (Scraeton, G.R., et al.; 1992). Es ist daher wahrscheinlich, daß eine mit der variablen Region des menschlichen CD44 Gens vergleichbare Unterteilung des cDNA Abschnitts v8-10 der Maus in drei Exons, v8, v9 und v10, vorliegt. Um diese Vermutung zu bestätigen und die Größe der Introns zwischen den Exons v8 bis v10 zu ermitteln, wurden die Sequenzen zwischen Oligonukleotiden, deren Bindungsstellen in diesen Exons lokalisiert waren amplifiziert. Dabei wurde davon ausgegangen, daß die Position der Exongrenzen zwischen Maus und Mensch konserviert ist. Für die Amplifikation der genomischen Sequenzen zwischen den Exons v1 bis v6 und v7 bis v10 wurde Phagen DNA der genomischen Klone des CD44 Gens verwendet. Da keiner der genomischen Klone sowohl das Exon v6 als auch das Exon v7 enthält, wurde für die Amplifikation der genomischen Sequenzen zwischen den Exons v6 und v7 genomische DNA aus Zellen der Linie GR verwendet. Die Bindungsstellen der als Primer verwendeten Oligonukleotide sind in Abb.2 markiert. Die Größe der Amplifikationsprodukte wurde auf einem analytischen Agarosegel ermittelt. Dabei zeigte sich, daß alle Amplifikationsprodukte größer als der Abstand der Amplifikationsprimer in der cDNA sind. Bei den amplifizierten Sequenzen handelt es sich daher wahrscheinlich um Intronsequenzen. Das Ergebnis der Analyse der Genomstruktur der variablen Region ist in Abb.7 dargestellt.

Um die aus dem Vergleich der cDNA Sequenz der variablen Region verschiedener CD44 Isoformen abgeleiteten Exon Grenzen zu bestätigen, wurden die Amplifikationsprodukte wie unter 15.3. beschrieben in den Vektor T3T5S kloniert und mit Hilfe der für die Amplifikation des jeweiligen Produkts verwendeten Oligonukleotide teilweise sequenziert. Die dabei erhaltenen Sequenzen der Exon/Intron Übergänge sind in Abb.9 zusammengefaßt.

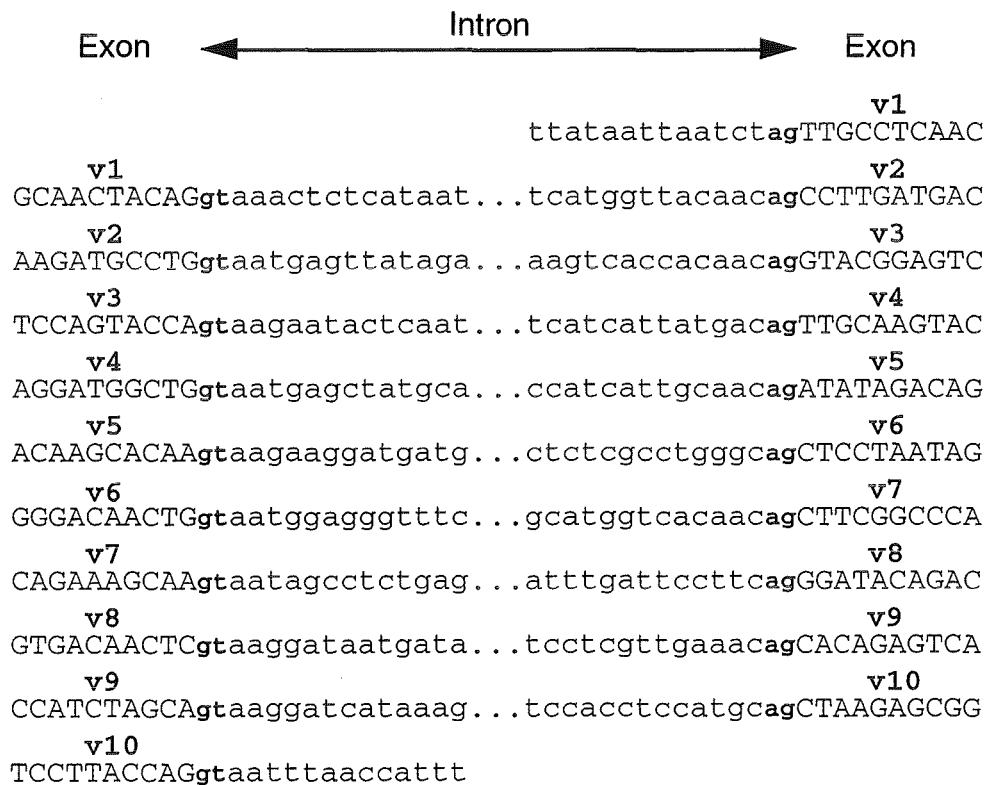


Abb.9: Sequenz der Exon-Intron Übergänge innerhalb der variablen Region.

Die Abb. zeigt die Sequenz der 15 direkt an die einzelnen Exons der variablen Region angrenzenden Nukleotide. Die Nukleotide der Exons sind durch Großbuchstaben, die Nukleotide der Introns durch Kleinbuchstaben dargestellt. Die Nukleotidabfolgen gt bzw. ag der Konsensussequenz sind hervorgehoben.

Um die Sequenz der Exon-Intron Übergänge innerhalb der variablen Region zu ermitteln wurden die Amplifikationsprodukte der Intronsequenzen der variablen Region in den Vektor T3T7S kloniert und ansequenziert. Dabei wurden Oligonukleotide als Primer verwendet, deren Bindungsstellen innerhalb einzelner Exons der variablen Region liegen. Die Bindungsstellen der Oligonukleotide sind in Abb.2 eingezeichnet.

Der Vergleich der direkt an die Exons angrenzenden Intronsequenzen mit der Konsensussequenz für Spleißdonor und Spleißakzeptorstellen zeigt, daß alle Introns der variablen Region durch die Nukleotide GT von dem oberhalb angrenzenden Exon und durch die Nukleotide AG von dem unterhalb angrenzenden Exon abgegrenzt sind und somit der GT/AG Regel eukaryontischer Gene entsprechen. Interessanterweise ist die Abfolge von Pyrimidinnukleotiden die der 3' Spleißposition konstitutiv gespleißter Introns häufig vorangeht in der Spleißakzeptorregion der Introns der variablen Region an mehreren Positionen durch Purinnukleotiden unterbrochen.

Der Vergleich der Sequenz der variablen Region verschiedener CD44 Isoformen und die Charakterisierung der Genomstruktur der variablen Region des CD44 Gens der Maus zeigten, daß die Heterogenität der variablen Region durch differentielles Spleißen von 10 Exons entsteht. Diese 10 Exons sind über eine genomische Region von 25kB verteilt, wobei die Größen der Introns der variablen Region des Mausgens weitgehend mit denen des menschlichen CD44 Gens übereinstimmen. Der Vergleich der Aminosäuresequenz der variablen Region von Maus, Ratte und Mensch zeigte, daß eine Übereinstimmung der Aminosäuren von 51,3% (v6) bis 74,7% (v2) zwischen allen drei Spezies vorliegt.



## **Gezielte Mutation der variablen Region des CD44 Gens der Maus durch homologe Rekombination in ES Zellen**

### Deletion der Exons v6 und v7 in ES Zellen

Die Expression der CD44 Isoform Meta-2 ist ausreichend um die Metastasierung von Tumorzellen der Linie BSp73AS zu induzieren (Rudy,W.,et al.;1993). Ein Vergleich der Sequenzen der variablen Region der CD44 Isoform Meta-2 mit der Genomstruktur der variablen Region zeigt, daß die variable Region der CD44 Isoform Meta-2 aus den Exons v6 und v7 besteht. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die Sequenzen dieser Exons an der Metastasierung von Tumorzellen mitverantwortlich sind.

Die *in vivo* Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen kann durch den Antikörper 1.1ASML inhibiert werden (Arch,R.,et al.1992). Das Epitop dieses Antikörpers ist innerhalb der Sequenzen des Exon v6 kodiert. Die Expression von Sequenzen des Exon v6 enthaltenden CD44 Isoformen ist daher mit der Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen assoziiert. Die an der Metastasierung von Tumorzellen beteiligten CD44 Isoformen üben daher physiologische Funktionen aus, die nicht von anderen Mitgliedern der CD44 Proteinfamilie übernommen werden können. Eine Möglichkeit weitere physiologische Funktionen der an der Tumorprogression beteiligten Isoformen zu identifizieren, ist die Analyse der Auswirkungen, die das Fehlen der Expression der Exons v6 und v7 auf die Embryonalentwicklung und das Immunsystem von Mäusen hat. Eine Mauslinie, in deren Genom die Exons v6 und v7 deletiert sind, kann durch die Technik des "Gene targeting" etabliert werden. Dazu ist es notwendig die Exons v6 und v7 zunächst in embryonalen Stammzellen durch homologe Rekombination zwischen dem endogenen CD44 Gen und einem v6/v7 Deletionskonstrukt zu deletieren. Die Abb.10 zeigt eine schematische Darstellung des v6/v7 Deletionskonstrukts und des mutierten CD44 Allels.

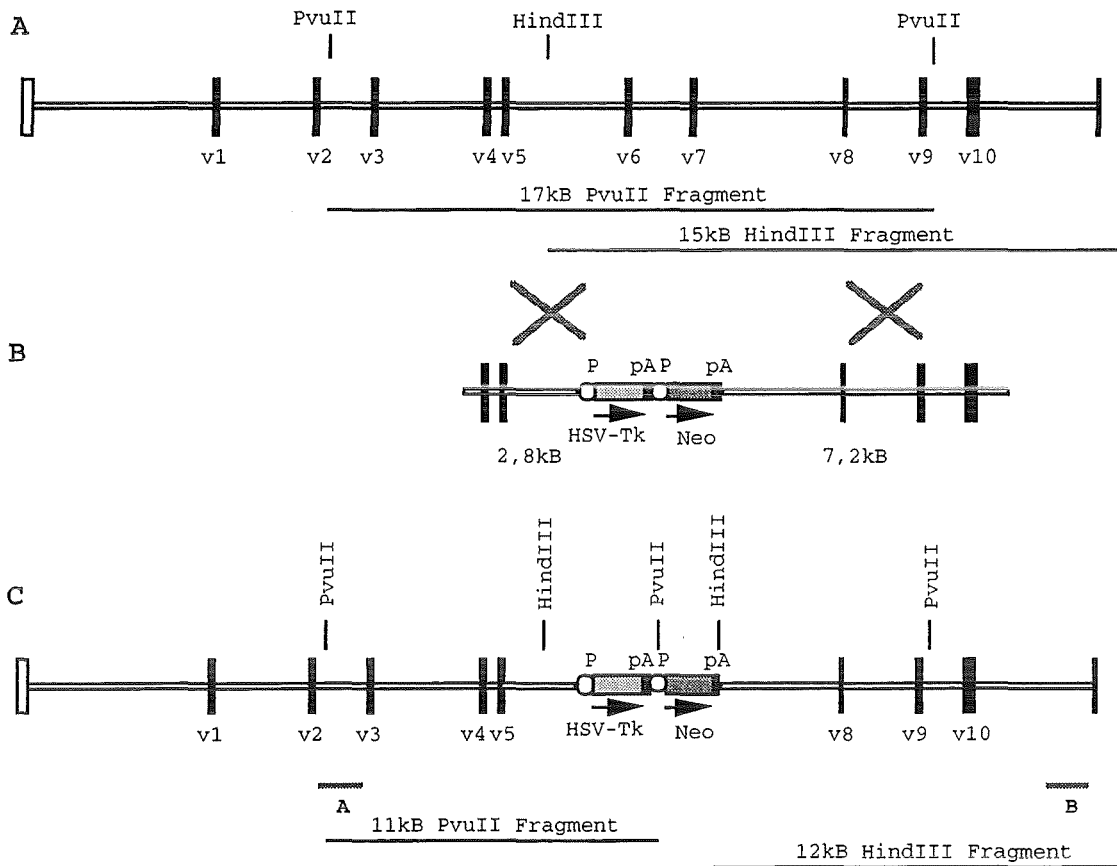


Abb.10: Schematische Darstellung der homologen Rekombination zwischen dem Targeting-Konstrukt und der variablen Region.

Die Abb. zeigt eine schematische Darstellung der Struktur der variablen Region des wildtyp CD44 Allels (A), der Sequenzen des Targeting-Konstrukts (B) und der Struktur des mutierten CD44 Allels (C). Die Exons der variablen Region sind durch schwarze Balken, die an die variable Region angrenzenden Exons sind durch leere Rechtecke dargestellt. Die Intronsequenzen sind durch waagerechte Balken dargestellt. Die Sequenzen der Selektionsmarker des v6/v7 Deletionskonstrukts, das virale Thymidinkinasegen und das bakterielle Neomycinresistenzgen sind durch graue Rechtecke symbolisiert. P bezeichnet die Promotersequenzen, pA bezeichnet die Polyadenylierungssignale der Selektionsmarker. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der Selektionsmarker an. Die bei der Southern Blot Analyse Ganzyclovir resistenter ES Zellklone verwendete, das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' bzw. 3' seitig flankierenden Hybridisierungsproben wurden mit A bzw. B bezeichnet. Die für die Southern Blot Analyse wichtigen Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen PvuII und HindIII sind eingezeichnet. Die mit den Probe A bzw. B hybridisierenden PvuII bzw. HindIII Fragmente sind durch graue Linien dargestellt. Die Kreuze zwischen der Darstellung des wildtyp CD44 Allels (A) und des v6/v7 Deletionskonstrukts (B) repräsentieren homologe Rekombinationsereignisse.

Für die angestrebte Mutation in der variablen Region wurde ein 3,5kB großer die Exons v6 und v7 umfassender Abschnitt der variablen Region durch zwei Selektionsmarker, dem Thymidinkinasegens des Herpes Simplex Virus und dem bakteriellen Neomycinresistenzgens, ersetzt. Die Expression des viralen Thymidinkinasegens wird von dem Promoter und dem Polyadenylierungssignal des murinen Phosphoglyzeratkinasegens (Adra,C.N.,et al.;1987, Mansour,S.L.,et al.;1988), die Expression des bakteriellen Neomycinresistenzgens von dem Promoter und dem Polyadenylierungssignal des viralen Thymidinkinasegens (Mc Knight,S.L.;1980, Mansour,S.L.,et al.;1988) kontrolliert. Diese Selektionsmarker sind auf beiden Seiten durch genomische Sequenzen von insgesamt 10kB Länge flankiert. Das die Selektionsmarker 5' seitig flankierende, 2,8kB große Fragment umfaßt die Exons v4 und v5. Das die Selektionsmarker 3' seitig flankierende, 7,2kB große Fragment umfaßt die Exons v8 bis v10.

Da Sequenzunterschiede zwischen den genomischen Sequenzen des Konstrukts und den endogenen genomischen Sequenzen zu einer Verringerung der Effizienz der homologen Rekombination führen (Deng,C. und Capecchi,M.R.; 1992, te Riele,H.,et al.;1992), wurden die Sequenzen für das v6/v7 Deletionskonstrukt aus genomischen Klonen des CD44 Gens von Mäusen des Stammes 129/ola, aus dem auch die ES Zellen der Linie E14 stammen (Hooper,M.,et al.;1987), kloniert. Die Isolierung der bei der Klonierung des v6/v7 Deletionskonstrukts verwendeten genomischen Klone der variablen Region und die Klonierung des Konstrukts sind unter 15.4. beschrieben.

Wird das v6/v7 Deletionskonstrukt durch Elektroporation von den ES Zellen aufgenommen, kann eine heterologe Integration des Konstrukts an einer beliebigen Stelle des Genoms oder eine homologe Integration in die variable Region eines der beiden CD44 Allele erfolgen. Die Expression des bakteriellen Neomycinresistenzgens führt unabhängig vom Integrationsort zur Resistenz gegenüber G418. Die Wahrscheinlichkeit der heterologen Integration überwiegt bei weitem die Wahrscheinlichkeit der homologen Integration des v6/v7 Deletionskonstrukts. Da nur homologe Integrationen des v6/v7 Deletionskonstrukts zur angestrebten Mutation des CD44 Gens führt, müssen diese unter den G418 resistenten ES Zellklonen identifiziert werden. Die Integration des v6/v7 Deletionskonstrukts in die variable Region durch homologe Rekombination führt zu charakteristischen strukturellen Veränderungen, z.B. des Abstandes zwischen Restriktionsschnittstellen, innerhalb der variablen Region. Diese Veränderungen können durch Southern Blot Analyse der genomischen DNA der G418 resistenten ES Zellklone nachgewiesen werden.

Nach homologer Integration des Konstrukts erfolgt die Transkription der Selektionsmarker in der gleichen Richtung wie die Transkription des CD44 Gens. Es ist daher nicht auszuschließen, daß ein Teil der CD44 Transkripte aufgrund der Polyadenylierungssignale der Selektionsmarker vorzeitig polyadenyliert wird und daher nicht die Information für die Translation funktionaler CD44 Isoformen enthält. Ob CD44 Isoformen wie z.B. der CD44 Standardtyp (CD44s) von dem mutierten Allel ausgehend exprimiert werden können, oder ob eine vollständige Inaktivierung des mutierten Allels vorliegt ist von dem Ausmaß der vorzeitigen Polyadenylierung der CD44 Transkripte abhängig. Um zu gewährleisten, daß von der Deletion der Exons v6 und v7 nicht betroffene Isoformen weiterhin von dem mutierten Allel ausgehend exprimiert werden können, wurde eine Deletion der integrierten Selektionsmarker durch ein zweites homologes Rekombinationsereignis angestrebt.

Das für die Deletion der Exons v6 und v7 verwendete v6/v7 Deletionskonstrukt enthält neben dem Neomycinresistenzgen das Gen der Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus. Die Expression des viralen Thymidinkinasegens führt dazu, daß die Zellen nach Aufnahme des Thymidinanalogs Gancyclovir sterben. Da das Thymidinkinasegen zusammen mit dem Neomycinresistenzgen in die variable Region integriert wird können Zellen, bei denen eine Deletion des viralen Thymidinkinasegens erfolgte, durch Kultur in Gancyclovir haltigem Medium selektioniert werden.

Um die Exons v6 und v7 in ES Zellen durch Selektionsmarker zu ersetzen, wurden Zellen der Linie E14 mit dem v6/v7 Deletionskonstrukt elektroporiert. Kultur der Zellen, Präparation des Konstrukts, Elektroporation und Selektion mit G418 wurden, wie unter 16.1. und 16.5. beschrieben, durchgeführt. Die G418 resistenten ES Zellklone wurden, wie unter 16.5. beschrieben, isoliert und expandiert. Um die ES Zellklone zu identifizieren, bei denen eine homologe Integration des v6/v7 Deletionsonstrukts vorliegt wurde eine Southern Blot Analyse genomischer DNA der G418 resistenten ES Zellklone, wie unter 14.1. beschrieben, durchgeführt. Als Hybridisierungsproben wurden dabei Sequenzen des zwischen den Exons v2 und v3 lokalisierten Introns und ein 500bp großes Fragment des unterhalb des Exons v10 gelegenen Introns verwendet. Beide Hybridisierungsproben erkennen Sequenzen des CD44 Gens, die das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' oder 3' seitig flankieren und sind daher nicht im v6/v7 Deletionskonstrukt enthalten. Dies gewährleistet, daß die Southern Blot Analyse auf die Struktur der variablen Region beschränkt wird und keine heterolog integrierten Kopien des v6/v7 Deletionsonstrukts detektiert werden.

Durch die Restriktionskartierung der PvuII Schnittstellen der genomischen Phagenklone der variablen Region aus Mäusen der Linie GR, die analog zu der Kartierung der EcoRI Schnittstellen durchgeführt wurde, ist bekannt, daß die variable Region zwei PvuII Restriktionsschnittstellen enthält. Eine PvuII Schnittstelle befindet sich zwischen den Exons v2 und v3, eine weitere Schnittstelle befindet sich zwischen den Exons v9 und v10. Die das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierende Hybridisierungsprobe detektiert in der Southern Blot Analyse genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen der Mauslinie 129/ola ein 17kB großes PvuII Fragment. Der PvuII Restriktionskarte der variablen Region entsprechend umfaßt dieses Fragment die Exons v3 bis v9. Das für die Deletion der Exons v6 und v7 in embryonalen Stammzellen verwendete v6/v7 Deletionskonstrukt enthält innerhalb der Sequenzen der Selektionsmarker mehrere PvuII Restriktionsschnittstellen. Diese PvuII Schnittstellen befinden sich nach der homologen Integration des v6/v7 Deletionskonstrukts zusätzlich zu den endogenen PvuII Restriktionsschnittstellen in der variablen Region. Innerhalb des v6/v7 Deletionskonstrukts erstreckt sich der genomische Abschnitt der die Selektionsmarker 5' seitig flankiert bis 1,8kB unterhalb des Exons v5. Die ersten 2kB des Selektionsmarker enthalten keine PvuII Schnittstelle. Nach homologer Integration des Konstrukts befindet sich demnach eine zusätzliche PvuII Schnittstelle 3,8kB unterhalb des Exons v5. Der Abstand dieser zusätzlichen PvuII Schnittstelle und der zwischen den Exons v2 und v3 gelegenen endogenen PvuII Schnittstelle beträgt 11kB. In ES Zellklonen in denen eine homologe Integration des v6/v7 Deletionskonstrukts vorliegt, würde daher ein 11kB großes PvuII Fragment bei der Southern Blot Hybridisierung PvuII geschnittener genomischer DNA mit der das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierenden Probe detektiert werden. Da nur ein Allel des CD44 Gens durch homologe Rekombination mutiert wäre, würde außer dem 11kB großen PvuII Fragment das 17kB große PvuII Fragment des wildtyp Allels auftreten.

Es wurden insgesamt 220 ES Zellklone, die durch die Integration des v6/v7 Deletionskonstrukts Resistenz gegenüber G418 erworben hatten, durch Southern Blot Hybridisierung PvuII geschnittener genomischer DNA mit der das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierenden Probe analysiert. 21 dieser G418 resistenten ES Zellklone enthielten zusätzlich zum 17kB großen PvuII Fragment des wildtyp CD44 Allels das 11kB große PvuII Fragment des durch homologe Integration des v6/v7 Deletionskonstrukts mutierten CD44 Allels. Die Effizienz der homologen Rekombination betrug daher 9,5%. Abb.11A zeigt das Autoradiogramm der Southern Blot Analyse von 6 G418 resistenten Klonen.

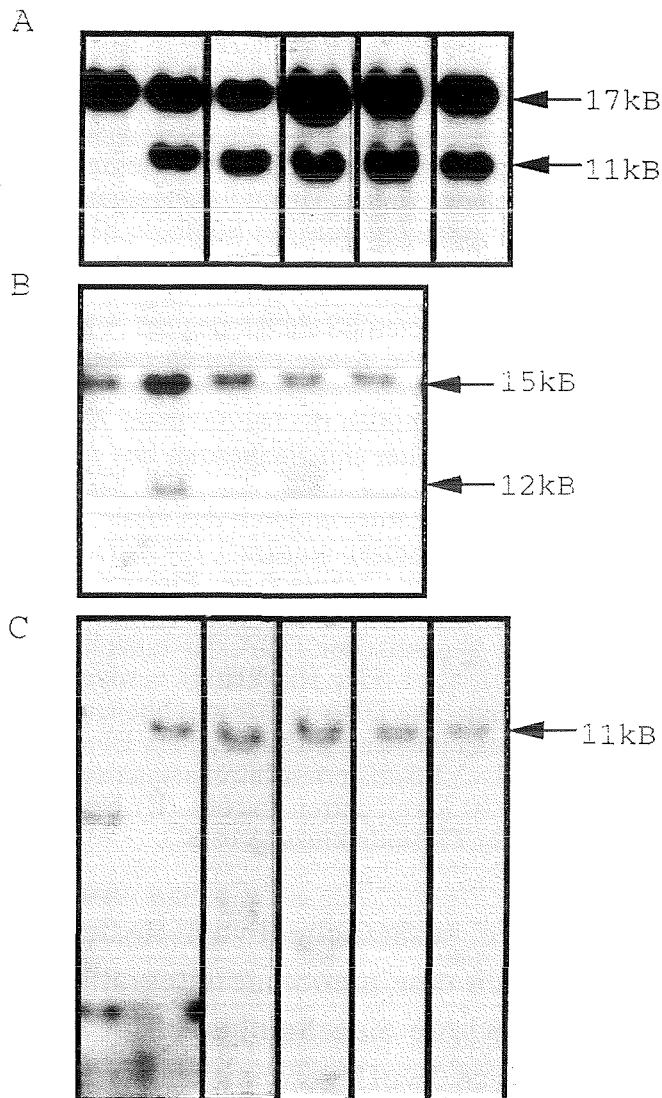


Abb.11: Identifizierung der G418 resistenten ES Zellklone die eine Mutation eines der beiden CD44 Allele tragen.

A: Analyse der Struktur der variablen Region der G418 resistenten ES Zellklone durch Southern Blot Hybridisierung mit einer das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierenden Hybridisierungsprobe.

Die Abb. zeigt als Beispiel ein Autoradiogramm der Southern Blot Hybridisierung von PvuII Fragmenten der genomischen DNA aus 6 G418 resistenten ES Zellklonen mit der das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierenden Probe. Die Pfeile markieren das 17kB große PvuII Fragment des wildtyp CD44 Allels und das 11kB große PvuII Fragment des mutierten CD44 Allels. 5 der ES Zellklone enthalten zusätzlich zum wildtyp CD44 Allel das mutierte CD44 Allel. Von insgesamt 220 analysierten G418 resistenten ES Zellklonen waren 21 heterozygot.

B: Analyse der Struktur der variablen Region der heterozygoten ES Zellklone durch Southern Blot Hybridisierung mit einer das v6/v7 Deletionskonstrukt 3' seitig flankierenden Hybridisierungsprobe.

Die Abb. zeigt ein Autoradiogramm der Southern Blot Hybridisierung von HindIII Fragmenten genomischer DNA der 5 in A heterozygoten ES Zellklone mit der das v6/v7 Deletionskonstrukt 3' seitig flankierenden Probe. Die Pfeile markieren das 15kB große HindIII Fragment des wildtyp CD44 Allels und das 12kB große HindIII Fragment des mutierten CD44 Allels. Für alle heterozygoten ES Zellklonen konnte das Ergebnis der unter A dargestellten Southern Blot Analyse durch den Nachweis des 12kB HindIII Fragments des mutierten CD44 Allels bestätigt werden.

C: Analyse der Anzahl der integrierten Kopien des v6/v7 Deletionskonstrukts durch Southern Blot Hybridisierung mit Sequenzen des viralen Thymidinkinasegens.

Die Abb. zeigt als Beispiel ein Autoradiogramm der Southern Blot Hybridisierung von PvuII Fragmenten genomischer DNA von 6 G418 resistenten ES Zellklone. Der Pfeil markiert das 11kB große PvuII Fragment der homolog in die variable Region integrierten Kopie des v6/v7 Deletionskonstrukts. In den 5 heterozygoten ES Zellklonen aus A konnten keine weiteren PvuII Fragmente nachgewiesen werden. Diese Klone enthalten daher nur eine Kopie des v6/v7 Deletionskonstrukts.

Nach vollständiger Dehybridisierung wurden die bei der unter A dargestellten Southern Blot Analyse verwendeten Nitrozellulosefilter mit Sequenzen des viralen Thymidinkinasegens hybridisiert.

Um die Exons v6 und v7 der variablen Region durch das virale Thymidinkinasegen und das bakterielle Neomycinresistenzgen zu ersetzen wurden  $1 \cdot 10^8$  Zellen der Linie E14 mit  $60 \mu\text{g}$  des v6/v7 Deletionskonstrukts elektroporiert. 24h nach der Elektroporation wurde dem Medium  $160 \mu\text{g/ml}$  G418 zugefügt. Die G418 resistenten ES Zellklone wurden nach weiteren 8-9 Tagen isoliert und expandiert. 5-10  $\mu\text{g}$  genomischer DNA der einzelnen Klone wurden mit den Restriktionsendonukleasen PvuII(A,C) oder HindIII(B) verdaut und auf einem 0.8%igen analytischen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde anschließend durch einen Southern Blot Transfer auf Nitrozellulosemembran übertragen Die Southern Blot Hybridisierung erfolgte mit den zwischen den Exons v2 und v3 lokalisierten Intronsequenzen (A), einem 500bp großen Fragment des unterhalb Exon v10 lokalisierten Introns (B) bzw. mit einem 1,1kB großen XhoI-EcoRV Fragment des viralen Thymidinkinasegens (C).

Um zu bestätigen, daß die zusätzliche PvuII Restriktionsschnittstelle des mutierten CD44 Allels durch eine homologe Integration des v6/v7 Deletionskonstrukts entstanden ist, wurde eine Southern Blot Hybridisierung von mit der Restriktionsendonuklease PvuII geschnittener genomischer DNA von 5 heterozygoten ES Zellklone mit Sequenzen des viralen Thymidinkinasegen durchgeführt. Das Autoradiogramm dieser Hybridisierung ist in Abb.11C dargestellt. In allen 5 heterozygoten ES Zellklonen wurde nur ein 11kB großes PvuII Fragment detektiert. Wie aus Abb.10 hervorgeht sind die in der Hybridisierungsprobe enthaltenen Sequenzen Bestandteil des 11kB großen PvuII Fragments, das indikativ für eine homologe Integration des v6/v7 Deletionskonstrukts ist. Das mit dem Fragment des Thymidinkinasegens hybridisierende 11kB große PvuII Fragment reflektiert daher die homolog in die variable Region integrierte Kopie des v6/v7 Deletionskonstrukts. Dieses Fragment ist oberhalb der Hybridisierungsprobe durch eine PvuII Restriktionsschnittstelle begrenzt die außerhalb der im v6/v7 Deletionskonstrukt enthaltenen Sequenzen lokalisiert ist. Die Position dieser PvuII Schnittstelle ist

daher abhängig von dem Integrationsort des v6/v7 Deletionskonstrukts. Zusätzliche, heterolog integrierte Kopien des v6/v7 Deletionskonstrukts würden demnach als zusätzliche PvuII Fragmente unterschiedlicher Größe in der Southern Blot Hybridisierung der heterozygoten Klone auftreten. Solche zusätzliche Kopien des v6/v7 Deletionskonstrukts können die Funktion der von der Integration betroffenen Gene beeinträchtigen und somit den Phänotyp der aus den mutierten Stammzellen etablierten Mauslinie beeinflussen. Da bei allen 5 der analysierten ES Zellklonen nur das aufgrund der homolog integrierten Konstruktkopie erwartete 11kB große PvuII Fragment hybridisiert, enthalten diese ES Zellklone nur die homolog in die variable Region integrierte Kopie des v6/v7 Deletionskonstrukts.

Um zu bestätigen, daß die homologe Integration des v6/v7 Deletionskonstrukts in die variable Region nicht zu größeren Deletionen der 3' seitig an das v6/v7 Deletionskonstrukt angrenzenden genomischen Sequenzen führte, wurde eine Southern Blot Analyse der genomischen DNA der heterozygoten ES Zellklone mit der das v6/v7 Deletionskonstrukt 3' seitig flankierenden Hybridisierungsprobe durchgeführt. Aus der Kartierung der HindIII Restriktionsschnittstellen des die Exons v4 bis v6 umfassenden 4,3kB großen EcoRI Fragments der variablen Region ging hervor, daß sich drei HindIII Restriktionsschnittstellen 0,3 bis 1kB unterhalb des Exons v5 befinden. Sequenzen der Exons v6 und v7 detektieren bei der Southern Blot Hybridisierung mit der Restriktionsendonuklease HindIII geschnittener genomischer DNA von Zellen der Linie E14 ein 15kB großes HindIII Fragment. Die das v6/v7 Deletionskonstrukt 3' seitig flankierende Hybridisierungsprobe detektiert ebenfalls ein 15kB großes HindIII Fragment genomischer DNA von Zellen der Linie E14. Das bedeutet, daß sich keine weiteren endogenen HindIII Restriktionsschnittstellen zwischen der das v6/v7 Deletionskonstrukt 3' seitig flankierenden Hybridisierungsprobe und den Exons v6 und v7 befinden. Das v6/v7 Deletionskonstrukt enthält unterhalb der Selektionsmarker eine HindIII Restriktionsschnittstelle. Diese zusätzliche HindIII Restriktionsschnittstelle befindet sich innerhalb des mutierten CD44 Allels 3kB unterhalb der endogenen HindIII Restriktionsschnittstellen unterhalb des Exons v5. Das 15kB große HindIII Fragment des wildtyp CD44 Allels ist daher im mutierten CD44 Allel auf 12kB verkleinert. Die 5 heterozygoten ES Zellklone wurden durch eine Southern Blot Hybridisierung von mit der Restriktionsendonuklease HindIII geschnittener genomischer DNA mit der das v6/v7 Deletionskonstrukt 3' seitig flankierenden Probe weiter analysiert. Das Autoradiogramm dieser Hybridisierung ist in Abb.11B dargestellt. In allen 5 heterozygoten ES Zellklonen konnte das



12kB große HindIII Fragment des mutierten CD44 Allels nachgewiesen werden.

Das mutierte CD44 Allel weist daher sowohl oberhalb als auch unterhalb des integrierten v6/v7 Deletionskonstrukts die aufgrund der Restriktionskarten der variablen Region und des v6/v7 Deletionskonstrukts erwartete Struktur auf. Die Integration des v6/v7 Deletionskonstrukts in die variable Region wurde daher nicht von unerwarteten Deletionen der das v6/v7 Deletionskonstrukt flankierenden genomischen Sequenzen begleitet.

Die durch homologe Rekombination mutierten ES Zellklone enthalten ein mutiertes Allel und ein wildtyp Allel des CD44 Gens. Bei der Southern Blot Hybridisierung PvuII oder HindIII geschnittener DNA der heterozygoten ES Zellklone mit der das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' bzw. 3' seitig flankierenden Probe sollten die Hybridisierungssignale der Fragmente des wildtyp CD44 Allels und des mutierten CD44 Allels gleich stark sein. Das mutierte Allel war in beiden Southern Blot Hybridisierungen jedoch schwächer repräsentiert als das wildtyp Allel. Dies weist darauf hin, daß die mutierten ES Zellklone durch wildtyp Zellen verunreinigt sind. Um Klone zu erhalten die ausschließlich aus mutierten ES Zellen bestehen wurden 4 der heterogenen ES Zellklone wie unter 16.3. beschrieben subkloniert. Durch Southern Blot Hybridisierung von, mit der Restriktionsendonuklease PvuII geschnittener DNA der Subklone, mit der das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierenden Hybridisierungsprobe konnte zwischen Subklonen, die aus mutierten ES Zellen und Subklonen, die aus wildtyp Zellen bestehen unterschieden werden. Das Autoradiogramm dieser Southern Blot Hybridisierung ist in Abb.12 dargestellt.

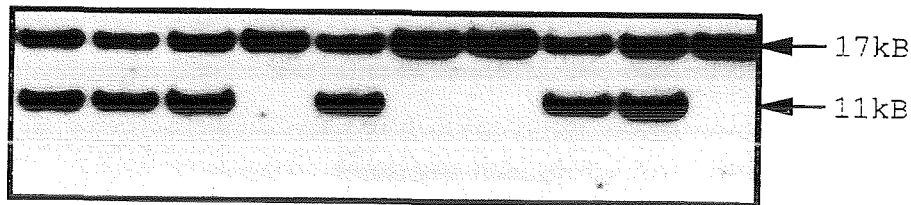


Abb.12: Die in den heterozygoten ES Zellklonen enthaltenen wildtyp ES Zellen können durch Subklonierung entfernt werden.

Die Abb. zeigt als Beispiel ein Autoradiogramm der Southern Blot Analyse von 10 unterschiedlichen Subklonen die ausgehend von einem heterozygoten ES Zellklon etabliert wurden. Die Pfeile markieren das 17kB große PvuII Fragment des wildtyp CD44 Allels und das 11kB große PvuII Fragment des mutierten CD44 Allels. Von den 10 dargestellten Klonen enthalten 6 das mutierte CD44 Allel. Das Hybridisierungssignal der PvuII Fragmente des wildtyp und des mutierten CD44 Allels sind gleich stark, so daß keine weitere Kontamination dieser heterozygoten Subklone mit wildtyp ES Zellen vorliegt.

Um heterozygote ES Zellklone zu erhalten die nicht durch wildtyp ES Zellen kontaminiert sind wurden die in Abb.11 dargestellten heterozygoten ES Zellklone subkloniert. Um Subklone zu identifizieren die aus heterozygoten ES Zellen bestehen, wurde eine Southern Blot Hybridisierung PvuII geschnittener DNA mit der das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierenden Probe durchgeführt.

8-10µg genomische DNA der einzelnen Subklone wurde mit der Restriktionsendonuklease PvuII geschnitten und anschließend auf einem 0,8%igen analytischen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde durch einen Southern Blot Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Southern Blot Hybridisierung wurde mit einer das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierenden,  $\alpha^{32}\text{P}$  markierten Probe durchgeführt.

Die Hybridisierungssignale der PvuII Fragmente des wildtyp CD44 Allels und des mutierten CD44 Allels sind in den Subklonen, die das mutierte CD44 Allel enthalten gleichstark. Diese heterozygoten Subklone enthalten daher keine oder nur sehr geringe Mengen an wildtyp ES Zellen.

Während der Kultur von Zellen kommt es häufig zu einer Veränderung der Chromosomenzahl. Eine Voraussetzung für die Pluripotenz der ES Zellen ist, daß der diploide Chromosomensatz von 38 Autosomen und 2 Heterosomen erhalten bleibt. Von den 4 subklonierten ES Zellklonen wurde von jeweils einem heterozygoten Subklon der Karyotyp wie unter 16.4. beschrieben analysiert. 3 der analysierten Klone wiesen einen Karyotyp von 40 Chromosomen auf, die Zellen von einem Klon enthielten nur 39 Chromosomen.

Die Exons v6 und v7 eines der beiden CD44 Allele konnten in ES Zellen durch homologe Rekombination zwischen dem endogenen CD44 Gen und einem v6/v7 Deletionskonstrukt deletiert werden. Die homologe Integration des v6/v7 Deletionskonstrukts erfolgte dabei mit einer Effizienz von 9,5%. Durch Subklonierung der G418 resistenten ES Zellklone, in denen das mutierte CD44 Allel nachgewiesen wurde, konnten ES Zellklone etabliert werden, die ausschließlich heterozygote ES Zellen enthielten. Drei dieser Subklone enthielten einen vollständigen heterozygoten Chromosomensatz und waren daher für die Etablierung von Chimären geeignet.

#### Injektion der heterozygoten ES Zellen in Blastozysten

Um aus den ES Zellen, die eine Deletion der Exons v6 und v7 in einem der beiden CD44 Allele aufweisen, eine Mauslinie zu etablieren wurden ES Zellen von zwei unabhängigen, subklonierten ES Zellklonen in Blastozysten injiziert. Die Zellen der aus Mäusen des Stammes C57BL/6 isolierten Blastozysten haben einen anderen genetischen Hintergrund als die aus Mäusen des Stammes 129/ola isolierten ES Zellen. Die injizierten ES Zellen und die Zellen der Blastozyste nehmen an der Embryonalentwicklung der nach der Injektion der ES Zellen in Ammenmäuse reimplantierten Blastozysten teil. Die sich aus diesen Blastozysten entwickelnden Nachkommen sind daher ein Mosaik aus Zellen der Mausstämmen 129/ola und C57BL/6. Diese zwei Mausstämmen zeichnen sich durch Unterschiede in der Fellfärbung aus (Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E.; 1994). Die Fellfärbung wird durch 5 Gene, A, B, C, D und P beeinflusst. Die Mausstämmen 129/ola und C57BL/6 besitzen beide die Wildtypallele der Gene B und D. Das Allel "chinchilla" ( $c^{ch}$ ) des Gens C des Stammes 129/ola bewirkt eine sehr helle cremefarbene Fellfärbung. Das Allel "pink-eyed dilution" (p) des Gens P führt zusätzlich zu einer Verringerung der Augenpigmentierung, so daß Mäuse des Stammes 129/ola rote Augen besitzen. Im Locus A besitzen Mäuse des Stammes 129/ola das Allel "white-bellied agouti" ( $A^w$ ). Dieses Allel bedingt eine Ausdünnung der Fellfarbe an den Haarspitzen, die in der Bauchregion besonders ausgeprägt ist. Mäuse des Stammes C57BL/6 besitzen die Wildtypallele der Gene C und P und zeichnen sich daher durch eine dunkelbraune Fell- und Augenfarbe aus. Da diese Mäuse nicht das Allel "white-bellied agouti" besitzen ist diese Fellfarbe gleichmäßig über die gesamte Haarlänge vorhanden. Aufgrund der großen Unterschiede in der Fellfärbung zwischen den Mausstämmen 129/ola und C57BL/6 setzt sich die Fellfarbe der chimären Mäuse mosaikartig aus hellen und dunklen Haaren zusammen. Der Anteil an Zellen des Mausstammes 129/ola an den Zellen der einzelnen chimären Mäuse spiegelt sich daher im Anteil der für den Stamm

129/ola typischen Fellfarbe "chinchilla" an der Fellfärbung der chimären Mäuse wieder.

Unter der Voraussetzung, daß sich injizierte ES Zellen zu Keimzellen der chimären Mäuse entwickelt haben und sich damit in deren Keimbahn befinden ist es möglich Nachkommen der chimären Mäuse zu erhalten, die in einem CD44 Allel die Deletion der Exons v6 und v7 tragen. Dazu wurden von jedem ES Zellklon 6 chimäre Männchen, deren Fell zu 50 bis 90% die Färbung "chinchilla" aufwies mit Weibchen des Stammes 129/ola gekreuzt. Nachkommen, die durch Befruchtung mit einer Spermzelle mit dem genetischen Hintergrund des Mausstammes 129/ola entstanden, sind in den Genen, die die Fellfarbe beeinflussen, homozygot für die Allele "white-bellied agouti", "chinchilla" und "pink-eyed dilution". Diese Nachkommen besitzen daher die für den Stamm 129/ola typische Fell- und Augenfarbe. Nachkommen, die durch Befruchtung mit einer Spermzelle mit dem genetischen Hintergrund des Mausstammes C57BL/6 entstanden, besitzen für die Gene C und P neben den von dem Weibchen vererbten Allelen "chinchilla" und "pink-eyed dilution" die wildtyp Allele für die Gene C und P des Stammes C57BL/6. Da die wildtyp Allele in diesem Fall dominant sind besitzen diese Nachkommen eine dunkle Fellfarbe. Für das Gen A besitzen diese Nachkommen das Allel "white-bellied agouti" des Stammes 129/ola und das Allel a des Stammes C57BL/6. Da das Allel "white-bellied agouti" dominant ist liegt eine Aufhellung der Fellfarbe an den Haarspitzen vor, was in einer gegenüber dem Stamm C57BL/6 helleren Farbe resultiert. Diese braune Fellfarbe wird als "agouti" bezeichnet. Von 12 chimären Männchen waren 5 fertil. Von jedem dieser Männchen wurden 12 bis 24 Nachkommen erhalten. Keiner dieser Nachkommen besaß die Fellfarbe des Stammes 129/ola. Das bedeutet, daß keiner der Nachkommen durch Befruchtung mit einer Spermzelle, die aus einer der injizierten ES Zellen hervorgegangen ist, entstanden ist. Die Mutation der variablen Region wurde daher nicht in die Keimbahn aufgenommen.

Die Pluripotenz der in der variablen Region eines der CD44 Allele mutierten ES Zellen war ausreichend um Chimäre mit einem hohen Anteil an 129/ola Zellen etablieren zu können. Von diesen Chimären wurden jedoch keine heterozygoten Nachkommen erhalten. Die Pluripotenz der heterozygoten ES Zellen war daher nicht ausreichend um in die Keimbahn der Chimären aufgenommen zu werden. Eine mögliche Ursache dafür ist, daß die Expression des viralen Thymidinkinasegens im Testis der Chimären zu einer Inhibierung der Spermzellreifung führt (Braun, R.E., et al.; 1990).

### Deletion des integrierten Selektionsmarker durch homologe Rekombination

Durch homologe Rekombination eines der beiden CD44 Allele mit dem v6/v7 Deletionskonstrukt wurden die Exons v6 und v7 durch zwei Selektionsmarker, dem Thymidinkinasegen des Herpes Simplex Virus und dem bakteriellen Neomycinresistenzgen ersetzt. Da nicht auszuschließen ist, daß die Kontrollsequenzen der Selektionsmarker mit der Expression des endogenen CD44 Gens interferieren, ist es notwendig die Selektionsmarker aus der variablen Region zu entfernen. Dies würde außerdem eine mögliche Inhibierung der Spermzellreifung als Ursache für die fehlende Pluripotenz der heterozygoten ES Zellen aufheben. Nach der Deletion der Selektionsmarker sollten die heterozygoten ES Zellen daher in die Keimbahn aufgenommen werden können. Für die Deletion der Selektionsmarker wurde die sogenannte "tag and exchange" Strategie gewählt (Askew,G.R.,et al.;1993). Dabei wird zunächst durch homologe Rekombination mit einem Konstrukt ein Selektionsmarker in das zu mutierende Allel integriert, der eine Selektion sowohl für als auch gegen die Expression bzw. das Vorhandensein des Selektionsmarkers erlaubt. Durch homologe Rekombination des Allels das den Selektionsmarker trägt, mit einem zweiten Konstrukt, dem sogenannten Exchange-Konstrukt, das die angestrebte Mutation enthält, wird der Selektionsmarker gegen die angestrebte Mutation "ausgetauscht".

Für die Deletion der in die variable Region eines der beiden CD44 Allele integrierten Selektionsmarker, wurde ein tk/neo Deletionskonstrukt verwendet, das sich vom v6/v7 Deletionskonstrukt nur dadurch unterscheidet, daß die Selektionsmarker, das virale Thymidinkinasegen und das bakterielle Neomycinresistenzgen, fehlen. Abb.13 zeigt eine schematische Darstellung des tk/neo Deletionskonstrukt und des mutierten CD44 Allels nach der Deletion der Selektionsmarker.

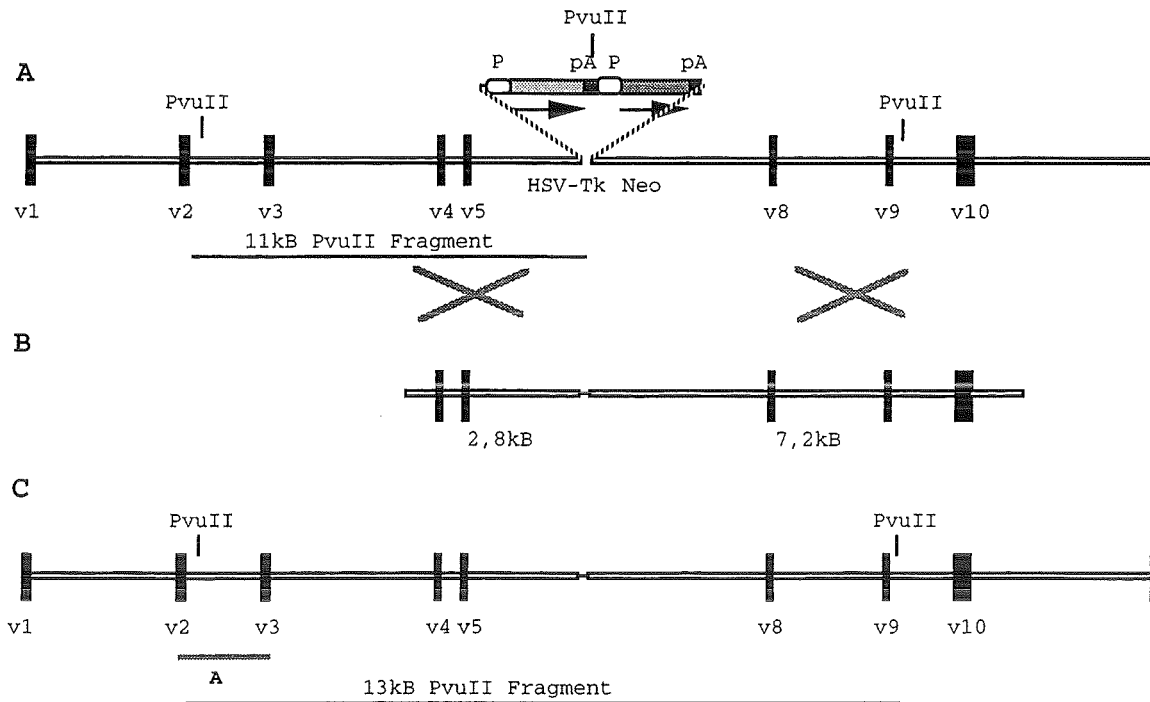


Abb.13: Schematische Darstellung der homologen Rekombination zwischen dem mutierten CD44 Allel und dem tk/neo Deletionskonstrukt.

Die Abb. zeigt eine schematische Darstellung der Struktur der variablen Region des mutierten CD44 Allels (A), der Sequenzen des tk/neo Deletionskonstrukts (B) und der Struktur des mutierten CD44 Allels nach Deletion der Selektionsmarker (C). Die Exons der variablen Region sind durch schwarze Balken, die an die variable Region angrenzenden Exons sind durch leere Rechtecke dargestellt. Die Intronsequenzen sind durch waagerechte Balken dargestellt. Die Sequenzen der Selektionsmarker des v6/v7 Deletionskonstrukts, das virale Thymidinkinasegen und das bakterielle Neomycinresistenzgen sind durch graue Rechtecke symbolisiert. P bezeichnet die Promotersequenzen, pA bezeichnet die Polyadenylierungssignale der Selektionsmarker. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der Selektionsmarker an. Die bei der Southern Blot Analyse Ganzyclovir resistenter ES Zellklone verwendete, das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierende Hybridisierungsprobe wurde mit A bezeichnet. Die für die Southern Blot Analyse wichtigen Schnittstellen der Restriktionsendonuklease PvuII sind eingezeichnet. Die mit den Probe A hybridisierenden PvuII Fragmente sind durch graue Linien dargestellt. Die Kreuze zwischen der Darstellung des mutierten CD44 Allels (A) und des tk/neo Deletionskonstrukts (B) repräsentieren homologe Rekombinationsereignisse.

Es wurden ES Zellen eines der heterozygoten Subklone mit dem tk/neo Deletionskonstrukt wie unter 16.5. beschrieben elektroporiert. Aufgrund der Expression des viralen Thymidinkinasegens ist die für die Elektroporation verwendete ES Zelllinie sensitiv gegenüber Ganzyclovir. Die Deletion der Selektionsmarker aus der variablen Region führt dazu, daß die ES Zellen resistent gegenüber Ganzyclovir werden. ES Zellen bei denen eine Deletion der Selektionsmarker durch homologe Rekombination des mutierten CD44 Allels mit dem tk/neo Deletionskonstrukt erfolgte, können in Ganzyclovir haltigem Medium selektioniert werden. Da die virale Thymidinkinase einige Zeit in den ES Zellen persistiert, sind ES Zellen bei denen eine Deletion des viralen Thymidinkinasegens erfolgte erst einige Zeit nach dem homologen Rekombinationsereignis, das zur Deletion der Selektionsmarker führte, resistent gegenüber Ganzyclovir. Es war daher notwendig nach der Elektroporation einige Tage zu warten bevor dem Medium Ganzyclovir zugesetzt werden konnte. Die Selektion, Isolierung und Expandierung der ES Zellklone erfolgte wie unter 16.5. beschrieben. Die Anzahl der mit dem tk/neo Deletionskonstrukt elektroporierten Zellen, der Beginn der Selektion nach der Elektroporation und die Anzahl der erhaltenen Ganzyclovir resistenten ES Zellklone sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle2

1. Selektionstag	Elektroporierte Zellen	Zahl der Klone
Tag 4	$7,5 \times 10^6$	9
Tag 5	$5,0 \times 10^6$	13
Tag12	$3,0 \times 10^7$	8

Tab.2: Zusammenfassung der Experimente zur Deletion der Selektionsmarker durch homologe Rekombination.

In der ersten Spalte (1. Selektionstag) ist der Tag angegeben, von dem ab die Selektion mit Ganzyclovir durchgeführt wurde. Der Tag der Elektroporation ist dabei Tag 0. Die zweite Spalte (Elektroporierte Zellen) gibt die Anzahl der bei den drei unabhängig voneinander durchgeführten Elektroporationen eingesetzten ES Zellen und Spalte drei die Anzahl der jeweils etablierten, Ganzyclovir resistenten ES Zellklone an.

Außer durch eine Deletion der Selektionsmarker durch homologe Rekombination des mutierten CD44 Allels mit dem tk/neo Deletionskonstrukt können die ES Zellen auch durch spontane Mutationen innerhalb des viralen Thymidinkinasegens, Reparaturvorgängen wie Genkonversion oder durch den Verlust des Chromosoms, das das mutierte CD44 Allel enthält, Resistenz gegenüber Ganzyclovir erlangen. Es ist daher notwendig ES Zellklone in denen eine Deletion der Selektionsmarker durch homologe Rekombination des mutierten CD44 Allels mit dem tk/neo Deletionskonstrukt erfolgte durch Southern Blot Analyse genomischer DNA eindeutig zu identifizieren. Nach der Deletion der Selektionmarker unterscheidet sich das mutierte CD44 Allel vom Wildtypallel durch eine 4kB große Deletion. Diese Deletion führt dazu, daß das von der das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierenden Hybridisierungsprobe identifizierte 17kB große PvuII Fragment des wildtyp Allels auf 13kB verkleinert wird. Im CD44 Allel das eine Insertion der Selektionsmarker trägt wird von der das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierenden Hybridisierungsprobe im Gegensatz dazu ein 11kB großes PvuII Fragment erkannt. Das wildtyp Allel, das durch homologe Rekombination mit dem v6/v7 Deletionskonstrukt und das durch homologe Rekombination mit dem tk/neo Deletionskonstrukt mutierte CD44 Allel sind somit anhand der unterschiedlichen Größen der PvuII Fragmente, die von der das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierenden Hybridisierungsprobe detektiert werden eindeutig voneinander unterscheidbar.

Die Autoradiogramme der Southern Blot Hybridisierungen sind in Abb.14 dargestellt.



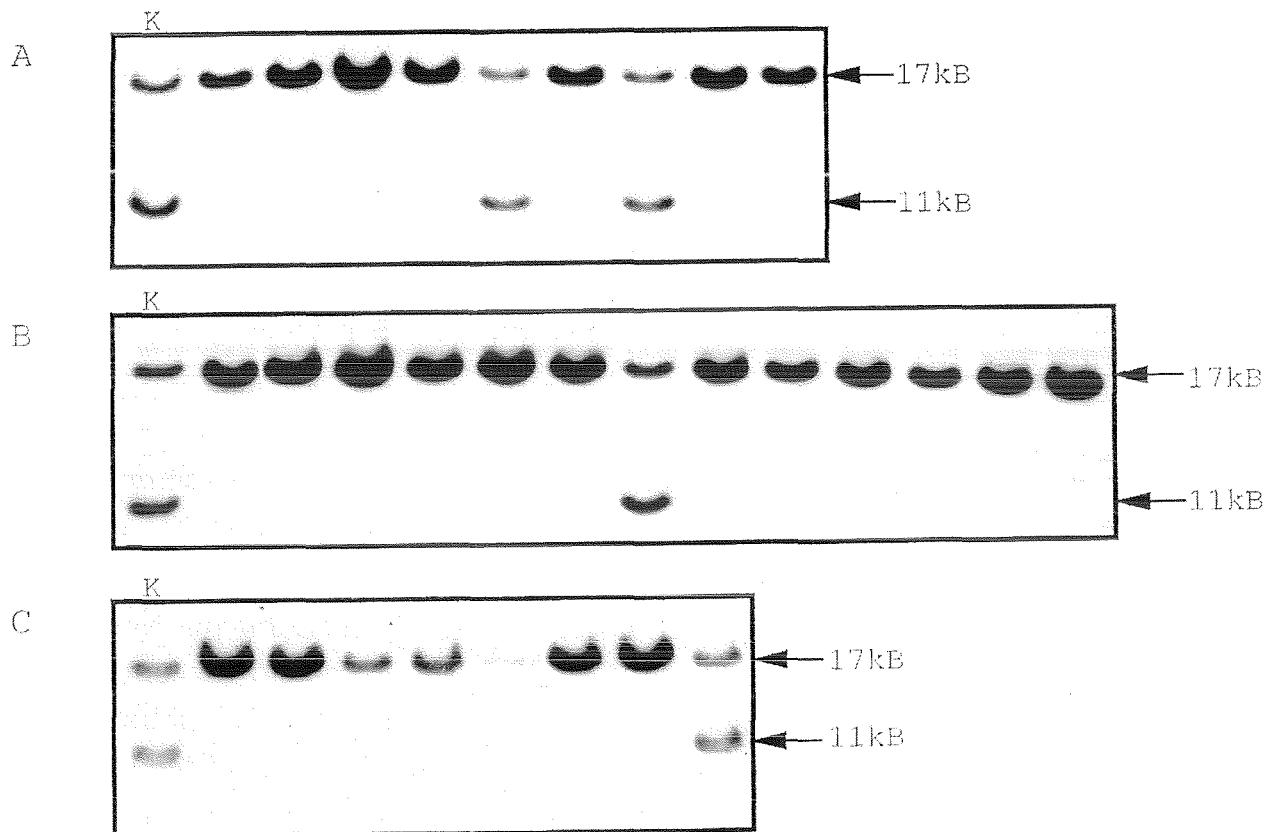


Abb.14: Analyse der Struktur der CD44 Allele der Ganzzyklovir resistenten ES Zellklone. Die Abb. zeigt ein Autoradiogramm der Southern Blot Analyse aller isolierten Ganzzyklovir resistenten ES Zellklone. Die Pfeile markieren das 17kB große PvuII Fragment des wildtyp CD44 Allels und das 11kB große PvuII Fragment des durch die Integration des v6/v7 Deletionskonstrukts mutierten CD44 Allels. In der mit K bezeichneten Probe wurde DNA des ES Zellklons verwendet der mit dem tk/neo Deletionskonstrukt elektroporiert wurde. Von den insgesamt 30 Ganzzyklovir resistenten ES Zellklonen enthielten 4 zusätzlich zum 17kB großen PvuII Fragment des wildtyp CD44 Allels das 11kB große PvuII Fragment des durch die Integration des v6/v7 Deletionskonstrukt mutierten CD44 Allels. Die übrigen 26 Klone enthielten lediglich das 17kB große PvuII Fragment des wildtyp Allels. In keinem der Klone konnte das für eine Deletion der Selektionsmarker indikative 13kB große PvuII Fragment nachgewiesen werden. Um das virale Thymidinkinasegen zusammen mit dem bakteriellen Neomycinresistenzgen aus dem mutierten CD44 Allel zu deletieren wurden  $9 \cdot 10^7$  Zellen eines der Subklone der heterozygoten ES Zellklone mit  $200 \mu\text{g}$  des tk/neo Deletionskonstrukts elektroporiert. Nach 3 (A), 4 (B) oder 12 Tagen (C) wurde dem Medium Ganzzyklovir zugefügt. Nach weiteren 8-9 Tagen wurden die Ganzzyklovir resistenten Klone isoliert und expandiert. Die DNA der einzelnen Ganzzyklovir resistenten ES Zellklone wurde mit der Restriktionsendonuklease PvuII geschnitten und anschließend auf einem 0,8%igen analytischen Agarosegel aufgetrennt. Die Southern Blot Hybridisierung erfolgte mit einer das v6/v7 Deletionskonstrukt 5' seitig flankierenden, mit  $\alpha^{32}\text{P}$  dATP markierten Hybridisierungsprobe.

Von den 30 analysierten, Ganzyclovir resistenten Klone enthielten 26 ausschließlich das 17kB große PvuII Fragment des CD44 wildtyp Allels. Die übrigen 4 Klone enthalten zusätzlich das 11kB große PvuII Fragment des durch homologe Rekombination mit dem v6/v7 Deletionskonstrukt mutierten CD44 Allels. Keiner der Ganzyclovir resistenten Klone enthielt das für das mutierte CD44 Allel, aus dem die Selektionsmarker deletiert wurden, indikative 13kB große PvuII Fragment. Somit fand in keinem der Ganzyclovir resistenten Klone eine Deletion der Selektionsmarker durch homologe Rekombination des mutierten CD44 Allels mit dem tk/neo Deletionskonstrukt statt. Es war daher nicht möglich ES Zellen zu etablieren, die außer der Deletion der Exons v6 und v7 keine weiteren Veränderungen in der variablen Region eines CD44 Allels enthalten.

Zusammenfassend konnten die Exons v6 und v7 eines CD44 Allels durch homologe Rekombination in ES Zellen durch zwei Selektionsmarker, dem viralen Thymidinkinasegen und dem bakteriellen Neomycinresistenzgen ersetzt werden. Die Integration des viralen Thymidinkinasegens hat den Vorteil, daß mit Ganzyclovir Zellen selektioniert werden können, bei denen eine Deletion der Selektionsmarker stattgefunden hat, so daß die Zellen außer der Deletion keine zusätzlichen Veränderungen tragen. Die Deletion der Selektionsmarker erschien notwendig, da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die Sequenzen der Selektionmarker mit der Expression des mutierten CD44 Allels interferieren. Andererseits kann eine Expression des viralen Thymidinkinasegens im Testis zu einer Inhibierung der Spermzellendifferenzierung führen. Da die heterozygoten, G418 resistenten ES Zellen nicht in die Keimbahn chimärer Mäuse aufgenommen wurden, scheint eine derartige Inhibierung tatsächlich vorzuliegen. Es war nicht möglich die Selektionsmarker durch ein zweites homologes Rekombinationsereignis aus der variablen Region zu deletieren. Es wurden daher keine heterozygoten ES Zellen erhalten, die für die Etablierung heterozygoter Mauslinie geeignet waren

## Diskussion

### **Die Heterogenität der variablen Region entsteht durch differentielles Spleißen von 10 Exons.**

Die Analyse der Genomstruktur der variablen Region des murinen CD44 Gens zeigte, daß die variable Region mindestens 10 mit v1 bis v10 bezeichnete Exons mit einer Größe zwischen 90 und 207bp enthält. Diese 10 Exons sind über eine genomische Region von 25kB verteilt. Die Größe der Introns beträgt 0,3 bis 4,2kB beträgt. Die Sequenzierung der Exon-Intron Übergänge der variablen Region der Maus zeigte, daß alle Introns 5´seitig durch die Nukleotide GT und 3´seitig durch die Nukleotide AG begrenzt werden (Tölg,C.,et al.;1993). Die Introns der variablen Region entsprechen somit der GT-AG Regel eukaryontischer Gene (Breathnach,R.,et al.;1978, Mount,S.M.; 1982). Die für diese Gene typische Abfolge von Pyrimidinnukleotiden innerhalb der Spleißakzeptorregion ist bei den Introns der variablen Region jedoch häufig durch Purinnukleotiden unterbrochen. Es ist denkbar, daß die Proteinkomplexe, sogenannte Spleißosomen, die für konstitutive Spleißereignisse verantwortlich sind, nur eine geringe Affinität für die untypischen Spleißakzeptorregionen der Introns der variablen Region besitzen (Forbes,D.J.,et al.;1984). Dies würde eine selektive Auswahl der Exons der variablen Region durch Spleißosomen, die eine Affinität zu Sequenzen innerhalb der variablen Region besitzen, ermöglichen.

Ein Vergleich der Genomstruktur der variablen Region des CD44 Gens der Maus (Tölg,C.,et al.;1993) mit der zeitgleich von einer englischen Arbeitsgruppe publizierten Genomstruktur des humanen CD44 Gens (Screaton,G.R.,et al.;1993) zeigt, daß die Anzahl und Größe der Introns weitgehend konserviert ist. Mit Ausnahme des Introns zwischen den Exons v7 und v8 sind die Introns des CD44 Gens der Maus um 0,2kB bis 0,7kB kürzer. Das Intron zwischen den Exons v7 und v8 ist im Mausgenom gegenüber dem menschlichen Gen 1,3kB größer. Die Sequenzen der Spleißakzeptorregionen der Introns innerhalb der variablen Region des menschlichen CD44 Gens weisen, wie die entsprechenden Sequenzen des Mausgens, keine ausgeprägte Homologie zur Konsensussequenz auf (Screaton,G.R.,et al.;1992, Screaton,G.R.,et al;1993).

Der Vergleich der cDNA Sequenz der variablen Region verschiedener von der murinen Tumorzelllinie GR exprimierter CD44 Isoformen zeigte, daß die Heterogenität der variablen Region durch Unterschiede in der Exonkomposition der cDNA entsteht. Die Isoform CD44s enthält lediglich die zwischen allen CD44 Isoformen konstanten Sequenzen der cDNA. Im Gegensatz dazu

enthält die cDNA verschiedener CD44v Isoformen eine unterschiedliche Anzahl der Exons der variablen Region.

Da, analog zu der Situation in der Ratte, keine weiteren CD44 Gene im Mausgenom nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, daß alle CD44 Isoformen durch differentielles Spleißen innerhalb der variablen Region entstehen. Die dadurch entstehende Heterogenität der CD44 Proteinfamilie übertrifft die der meisten bisher bekannten Beispiele für differentielles Spleißen (Cunningham, B.A., et al.; 1987, Smith, C.W.J., et al.; 1989). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß weitere Exons der variablen Region existieren, die in den klonierten CD44 Isoformen nicht enthalten waren und daher bei der Analyse der Genomstruktur nicht berücksichtigt wurden.

Die Sequenz der variablen Region des größten aus Zellen der Linie GR etablierten cDNA Klons unterscheidet sich an vier in Abb.2 markierten Positionen von der Sequenz, die von Screatton et al. publiziert wurde (Screatton, G.R., et al.; 1993). Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich darauf, daß für die Klonierung der variablen Region unterschiedliche Mausstämme, GR bzw. Balb-c, verwendet wurden. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen innerhalb der variablen Region der Maus, Ratte und des Menschen ergab eine Übereinstimmung zwischen allen drei Spezies von 51,3 bis 74,7 %.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Konservierung der cDNA Sequenz der variablen Region zwischen Maus, Ratte und Mensch, sowie die Konservierung der Genomstruktur der variablen Region zwischen Maus und Mensch auf eine Beteiligung der variablen Region an der funktionellen Struktur der CD44v Isoformen hinweist.

### **Deletion der für die Metastasierung von Tumorzellen verantwortlichen Exons v6 und v7 in embryonalen Stammzellen**

Tumorzellen der Linie Bsp73AS auf deren Oberfläche die CD44 Isoform Meta-2 der Ratte exprimiert ist, metastasieren nach subkutaner Injektion in syngene Ratten in die Lymphknoten und in die Lunge (Rudy, W., et al.; 1993). Die Isoform Meta-2 ist die bisher kleinste Isoform deren Expression auf der Zelloberfläche die Metastasierung von Tumorzellen induziert. Um die Sequenzen der variablen Region dieser CD44 Isoform durch homologe Rekombination im Mausgenom deletieren zu können ist es notwendig zu wissen von welchen Exons der variablen Region diese Sequenzen kodiert werden. Aus dem Vergleich der Sequenz der Isoform Meta-2 mit der cDNA Sequenz der variablen Region der Maus geht hervor, daß die variable Region der Isoform Meta-2 von den Exons v6 und v7 kodiert wird. Diese Exons wurden durch homologe Rekombination zwischen dem endogenen CD44 Gen und einem

v6/v7 Deletionskonstrukt in einem CD44 Allel des ES Zellgenoms durch das virale Thymidinkinasegen und das bakterielle Neomycinresistenzgen ersetzt. Die Effizienz der homologen Integration des v6/v7 Deletionskonstrukt lag dabei bei 9,5% aller G418 resistenter ES Zellklone. Dies stellt ein mit anderen Rekombinationsexperimenten vergleichbares Ergebnis dar. Die Kreuzung der durch Injektion der heterozygoten ES Zellen in Blastozysten des Stammes C57BL/6 etablierten Chimären mit Weibchen des Stammes 129/ola führte nicht zu heterozygoten Nachkommen. Das bedeutet, daß die Pluripotenz der mutierten ES Zellen nicht ausreichte um an der Entwicklung sämtlicher Zellen und Gewebe, einschließlich der Keimzellen, der Chimären teilzunehmen. Dafür sind unterschiedliche Erklärungen denkbar.

1. Die Kulturbedingungen während der Klonierung der ES Zellen waren nicht ausreichend um den pluripotenten Charakter der ES Zellen zu erhalten.
2. Die Mutation eines der beiden CD44 Allele interferiert mit der Pluripotenz der ES Zellen.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Sequenzen der Selektionsmarker mit der Expression des durch homologe Integration des Konstrukts mutierten CD44 Allels interferieren. Beispielsweise können die Polyadenylierungssignale der Selektionsmarkergene dazu führen, daß ein Großteil der CD44 Transkripte vorzeitig polyadenyliert wird und damit keine funktionalen CD44 Proteine kodieren. Um zu gewährleisten, daß ausschließlich die Expression der Exons v6 und v7 von der Mutation betroffen sind wurde eine Deletion der Selektionsmarker durch ein zweites homologes Rekombinationsereignis angestrebt. Um ES Klone identifizieren zu können in denen eine solche Deletion der Selektionsmarker stattfand enthält das v6/v7 Deletionskonstrukt zusätzlich zum bakteriellen Neomycinresistenzgen das virale Thymidinkinasegen. Dies erlaubt die Selektion von ES Zellen bei denen keine Expression der Selektionsmarker, z.B. aufgrund einer Deletion der Selektionsmarker, stattfindet, durch den Zusatz von Gancyclovir ins Kulturmedium (Mansour, S.L., et al.; 1988). Es existieren jedoch Hinweise, daß die Expression des viralen Thymidinkinasegens im Testis die Entstehung von ausdifferenzierten Spermzellen inhibiert (Braun, R.E., et al.; 1990). In Mäusen, die das virale Thymidinkinasegen als Transgen exprimieren, war dieser Effekt abhängig von der Expressionsstärke des Transgens. Dabei bewirkte eine hohe Expression des viralen Thymidinkinasegens eine geringe Fertilität der transgenen Männchen. Darüberhinaus enthielt keines der Nachkommen der transgenen Männchen das Transgen. Es ist denkbar, daß die Expression des viralen Thymidinkinasegens der heterozygot mutierten ES Zellen zu hoch war um in den chimären Männchen funktionale Spermzellen aus den mutierten ES Zellen entstehen zu lassen. Ein

Hinweis darauf ist die insgesamt geringe Fertilität der chimären Männchen. Von insgesamt 12 chimären Männchen zeugten nur 6 Nachkommen. Dies ist eine im Vergleich mit anderen Rekombinationsexperimenten sehr niedrige Fertilitätsrate. Um eine mögliche Inhibition der Spermzellreifung durch die Expression des viralen Thymidinkinasegens zu umgehen wurde ein heterozygot mutierter ES Zellklon, der durch eine spontane Mutation Ganzyclovirresistenz erworben hatte, in Blastozysten injiziert. Dieser Klon wurde im Verlauf der Rekombinationsexperimente, in denen eine Deletion der in die variable Region integrierten Selektionsmarker angestrebt wurde, isoliert. In der Southern Blot Hybridisierung PvuII geschnittener genomischer DNA dieses Ganzyclovir resistenten ES Zellklons mit der das v6/v7 Deletionskonstrukt 5'seitig flankierenden Probe wurde neben dem 17kB großen Fragment des CD44 wildtyp Allels das 10,5kB große Fragment des mutierten Allels nachgewiesen. Die Ganzyclovirresistenz dieser Zellen ist somit nicht durch eine größere Deletion innerhalb des viralen Thymidinkinasegens entstanden. Die Kreuzung der aus diesen Ganzyclovir resistenten ES Zellen etablierten Chimären mit Weibchen des Stammes 129/ola führte jedoch ebenfalls nicht zu heterozygoten Nachkommen. Die injizierten Ganzyclovir resistenten ES Zellen wurden daher ebenfalls nicht in die Keimbahn aufgenommen. Dies bedeutet jedoch nicht, daß die Expression des viralen Thymidinkinasegens als Ursache für das Fehlen der Pluripotenz der heterozygot mutierten ES Zellen ausgeschlossen werden kann. Beispielsweise kann die Inhibierung der Keimzellendifferenzierung unabhängig von der Aufnahme und Aktivierung des Nukleotidanalogs Ganzyclovir durch die ES Zellen erfolgen. Alternativ ist es denkbar, daß nur eine teilweise Inaktivierung der viralen Thymidinkinase in den Ganzyclovir resistenten ES Zellen vorliegt, so daß die Enzymaktivität in den ES Zellen zu niedrig ist um das Absterben der Zellen in Ganzyclovir haltigem Medium zu bewirken aber auf der anderen Seite in differenzierenden Spermzellen ausreichend ist um die Keimzellendifferenzierung zu inhibieren.

Um die Fähigkeit der heterozygot mutierten Ganzyclovir resistenten ES Zellen an der Entstehung unterschiedlicher Gewebe teilzunehmen zu überprüfen wurde der Anteil an Zellen des Stammes 129/ola an unterschiedlichen Geweben eines chimären Weibchens ermittelt. Die Mausstämme 129/ola und C57BL/6 besitzen unterschiedliche Isoenzyme der Glucose-6-Phosphat Isomerase. Diese Isoenzyme können durch Elektrophorese aufgetrennt und durch eine enzymabhängige Umsetzung eines Farbstoff nachgewiesen werden. Es ist daher möglich den Anteil an Zellen eines Gewebes der aus den Zellen der Blastozyste und den Anteil der aus den injizierten ES Zellen hervor-

gegangen ist zu ermitteln. In insgesamt 10 unterschiedlichen Geweben eines chimären Weibchens war der Anteil an Zellen, die aus den ES Zellen hervorgegangen sind, in der Größenordnung von 50%. Im Vergleich mit Chimären aus anderen Rekombinationsexperimenten stellt dies ein für pluripotente ES Zellen repräsentatives Ergebnis dar.

Zusammenfassend konnten jedoch weder die Expression des viralen Thymidinkinasegens noch die Kulturbedingungen als Ursache für die fehlende Keimbahnaufnahme der heterozygot mutierten ES Zellen ausgeschlossen werden.

Um einer Beeinträchtigung der CD44 Expression durch den genomisch integrierten Selektionsmarker entgegenzuwirken wurde versucht, den Selektionsmarker durch ein zweites homologes Rekombinationsereignis zu deletieren. Dadurch würde gleichzeitig die Möglichkeit einer von der viralen Thymidinkinase verursachten Inhibierung der Keimzellendifferenzierung in chimären Männchen ausgeschlossen werden. ES Zellen, deren Selektionsmarker deletiert wurde, sollten demnach die Fähigkeit besitzen, in die Keimbahn der Chimären aufgenommen zu werden.

Um den Selektionsmarker aus der variablen Region zu entfernen wurde die sogenannte "tag-and-exchange" Strategie verwendet (Askew,G.R.,et al.;1993, Stacey,A.,et al.;1994, Wu,H.,et al.;1994). Grundlage dieser Strategie ist der Austausch des homolog integrierten v6/v7 Deletionskonstrukt gegen das die angestrebte Deletion der Exons v6 und v7 und der Selektionsmarker aufweisende tk/neo Deletionskonstrukt durch ein zweites homologes Rekombinationsereignis. ES Zellen, bei denen eine derartige Deletion der Selektionsmarker stattfand, sind jedoch dadurch, daß ein Pool an aktiver viraler Thymidinkinase in den Zellen persistiert nicht unmittelbar nach dem zweiten homologen Rekombinationsschritt gegen Ganzyclovir resistent. Die Selektion Ganzyclovir resistenter ES Zellen kann erst erfolgen nachdem das virale Enzym in den Zellen abgebaut wurde. Der Zeitpunkt, von dem ab ES Zellen, bei denen eine homologe Integration des tk/neo Deletionskonstrukts stattfand, isoliert werden können, ist abhängig von der Expressionsstärke der viralen Thymidinkinase und damit abhängig von dem zur Kontrolle der Thymidinkinase Expression verwendeten Promoter und dem genomischen Integrationsort. In Anlehnung an die in der Literatur beschriebenen Rekombinationsexperimente wurde mit der Ganzyclovirselektion vier, fünf und 12 Tage nach der Elektroporation der ES Zellen begonnen (Askew,G.R.,et al.;1993, Wu,H.,et al.;1994).

In keinem der insgesamt 30 Ganzyclovir resistenten ES Zellklone hatte eine homologe Rekombination des tk/neo Deletionskonstrukt mit dem mutierten

CD44 Allel stattgefunden. Vier der analysierten Klone enthielten zusätzlich zum wildtyp Allel das durch die Insertion des Selektionsmarkers mutierte Allel. Die Ursache der Ganzyclovirresistenz für diese Klone ist wahrscheinlich eine spontane Mutation des viralen Thymidinkinasegens (Askew, G.R., et al.; 1993). Die restlichen 26 Ganzyclovir resistenten Klone enthielten lediglich das CD44 wildtyp Allel. Eine mögliche Ursache für den Verlust des mutierten CD44 Allels könnte eine Rekombination zwischen den beiden unterschiedlichen CD44 Allelen sein, an die sich eine Reparatur der Heteroduplex Region anschließt (Genkonversion). Eine weitere Ursache könnte der Verlust des das mutierte Allel enthaltenden Chromosoms sein (Mortenson, R.M., et al.; 1992, Askew, G.R., et al.; 1993, Stacey, A., et al.; 1994, Wu, H., et al.; 1994).

Da das für die Deletion des Selektionsmarker verwendete tk/neo Deletionskonstrukt die gleichen genomischen Fragmente enthält wie das für die Insertion des Selektionsmarker verwendete v6/v7 Deletionskonstrukt sollte die homologe Rekombinationseffizienz beider Konstrukte ähnlich sein. Somit wäre zu erwarten, daß die Effizienz der homologen Integration des tk/neo Deletionskonstrukt etwa 10% aller stabil transfizierter ES Zellen betragen würde. Da nur eine homologe Rekombination des tk/neo Deletionskonstrukt mit dem mutierten CD44 Allel zu einer Deletion der Selektionsmarker führen würde, sollte die Effizienz der Deletion der Selektionsmarker bei etwa 5% liegen. Eine mögliche Ursache für die anscheinend sehr niedrige homologe Rekombinationseffizienz des tk/neo Deletionskonstrukts kann der geringe Abstand der beiden genomischen Fragmente sein. Innerhalb der variablen Region des CD44 Gens sind diese beiden Fragmente 3,5kB voneinander entfernt. Diese Distanz ist innerhalb des v6/v7 Deletionskonstrukts durch die Insertion des Selektionsmarkers auf 4kB vergrößert. Es kann sein, daß der geringe Abstand der genomischen Fragmente innerhalb des tk/neo Deletionskonstrukt von 30bp die für die homologe Rekombination notwendige Paarung dieser Fragmente mit den homologen Sequenzen des mutierten Allels stark erschwert. Der Vergleich verschiedener zu unterschiedlich großen Deletionen innerhalb des HPRT Gens führenden Konstrukte zeigte, daß die Effizienz der homologen Rekombination unabhängig von der Größe der angestrebten Deletion ist (Zhang, H., et al.; 1994). Es ist jedoch nicht klar, ob diese Ergebnisse auf das CD44 Gen übertragen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine selektive Inaktivierung definierter CD44 Spleißvarianten durch die Deletion einzelner Exons der variablen Region angestrebt. Da die Etablierung einer ES Zelllinie, die in einem der beiden CD44 Allele keine weiteren Veränderungen als die Deletion der Exons v6 und v7 trägt, über zwei aufeinander folgende homologe Rekombinations-



ereignisse führt, ist die angewendete Strategie sehr unsicher. Eine Alternative würde eine vollständige Inaktivierung des CD44 Gens durch Mutation der N-terminalen Sequenzen darstellen. Dabei würde die Insertion eines promoterlosen Selektionsmarkers direkt unterhalb des Startcodon des CD44 Gens den Vorteil bieten, daß nur Rekombinationsereignisse die zur Integration des Konstrukts in exprimierte Gene, wie z.B. dem CD44 Gen, führen, die G418 Resistenz der ES Zellen bewirken. Dies würde eine starke Anreicherung von Klonen in denen eine homologe Integration des Konstrukts stattgefunden hat bedeuten (Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E.; 1994). Durch Kreuzung der homozygot mutierten Mäuse mit Mäusen, die einzelne CD44 Isoformen von einem Transgen ausgehend exprimieren, könnten Mauslinien etabliert werden, die ausschließlich die CD44 Isoform des Transgen exprimieren. Der Phänotyp dieser Mäuse würde ebenfalls eine Analyse der physiologischen Funktion einzelner CD44 Isoformen erlauben. Diese Strategie wurde nicht gewählt, da sie zu einer drastischen Veränderung der CD44 Expression führen würde. Die Expression einzelner CD44 Isoformen von einem Transgen ausgehend, würde abhängig vom Promoter und Integrationsort des Transgens, und daher mit einer vom endogenen CD44 Gen unterschiedlichen Effizienz erfolgen.

Die Expression der Isoform CD44s und der CD44v Isoformen während der Embryonalentwicklung weist darauf hin, daß der Wechselwirkung zwischen CD44 und Hyaluronsäure eine entscheidende Funktion für die Entstehung embryonaler Strukturen zukommt. Eine vollständige Inaktivierung des CD44 Gens würde daher möglicherweise zu einem embryonal lethalen Phänotyp der homozygoten Nachkommen führen. Die Expression einer einzelnen CD44 Isoform in Form eines Transgen würde eventuell diesen Phänotyp nicht so weit abmildern können, daß eine Analyse des Immunantwort oder der Tumorprogression in diesen Mäusen möglich wäre.

Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Strategie "tag-and-exchange" hat den Vorteil, daß nach der Mutation des CD44 Gens die Expression einer Gruppe von CD44 Isoformen unter der Kontrolle des endogenen CD44 Promoter erhalten bleibt. Im Laufe dieser Arbeit zeigte sich jedoch, daß die Effizienz der homologen Rekombination innerhalb der Sequenzen der variablen Region nicht ausreichend ist um diese auf zwei aufeinander folgende homologe Rekombinationsschritte basierende Strategie durchführen zu können.

## Literaturverzeichnis

- Adams, J.C., Watt, F.M.** (1993). Regulation of development and differentiation by the extrazellular matrix. *Development* 117 : 1183-1198
- Adra, C.N., Boer, P.H., Mc Burney, M.W.** (1987). Cloning and expression of the mouse pgk-1 gene and the nucleotide sequence of its promoter. *Gene* 60 : 65-74.
- Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P., Zöller, M.** (1992). Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 257 : 682-685.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., Seed, B.** (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61 : 1303-1313.
- Askew, G.R., Doetschman, T., Lingrel, J.B.** (1993). Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene -targeting tag-and-exchange strategy. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 4115-4124.
- Birch, M., Mitchell, S., Hart, I.R.** (1991). Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res.* 51 : 6660-6667.
- Birnboim, P.M., Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucl. Acids Res.* 7 : 1513-1523.
- Boucaut, J.C., Darribère, T., Boulekbache, H., Thiery, J.P.** (). Prevention of gastrulation but not neurulation by antibodies to fibronectin in amphibian embryos. *Nature* 307 : 364-367.
- Boudreau, N., Rabinovitch, M.** (1991). Developmentally regulated changes in extrazellular matrix in endothelial and smooth muscle cells in the ductus arteriosus may be related to internal proliferation. *Lab. Invest.* 64 : 187-199.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., Robertson, E.** (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309 : 255-256.
- Bradley, L.M., Croft, M., Swain, S.L.** (1993). T cell memory: new perspectives. *Immunol. today* 14 : 197-199.
- Braun, R.E., Lo, D., Pinkert, C.A., Widera, G., Flavell, R.A., Palmiter, D., Brinster, R.L.** (1990). Infertility in male transgenic mice: Disruption of sperm development by HSV-tk expression in postmeiotic germ cells. *Biol. Reprod.* 43 : 684-693.
- Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F., Chambon, P.** (1978). Ovalbumin gene: Evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 : 4853-4857.
- Brown, T.A., Bouchard, T., St. John, T., Wayner, E., Carter, W.G.** (1991). Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J. Cell. Biol.* 113 : 207-221.
- Budd, R.G., Cerottini, J-C. Horvath, C., Bron, C., Pedrazini, T., Howe, R.C., Mc Donald, H.R.** (1987). Distinction of virgin and memory T

lymphocytes: Stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *J. Immunol.* 138 : 3120

**Camp,R.L., Kraus,T.A., Birkeland,M.L., Puré,E.** (1991). High levels of CD44 expression distinguish virgin from antigen-primed B cells. *J. Exp. Med.* 173 : 763-766.

**Camp,R.L., Kraus,T.A., Puré,E.** (1991). Variations in the cytoskeletal interaction and posttranslational modification of the CD44 homing receptor in macrophages. *J. Cell. Biol.* 115 : 1283-1292.

**Camp,R.L., Scheynius,A., Johansson,C., Puré,E.** (1993). CD44 is necessary for optimal contact allergic responses but is not required for normal leukocyte extravasation. *J. Exp. Med.* 178 : 497-507.

**Carter,W.G., Wayner,E.A.** (1988). Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J. Biol. Chem.* 263 : 4193-4201.

**Cunningham,B.A., Hemperly,J.J., Murray,B.A., Prediger,E.A., Brackenburry,A., Edelman,G.M.** (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation and alternative RNA splicing. *Science* 236 : 799-806.

**Deng,C., Carpecchi,M.R.** (1992). Reexamination of gene targeting frequency as a foundation of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol. Cell. Biol.* 12 : 3365-3371.

**Dougherty,G.J., Lansdorp,P.M., Cooper,D.L., Humphries,R.K.** (1991). Molecular cloning of CD44 R1 and CD44 R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells. *J. Exp. Med.* 174 : 1-5.

**Evans,M.J., Kaufman,M.H.** (1981). Establishment of pluripotential cells of mouse embryos in culture. *Nature* 292 : 154-156.

**Forbes,D.J., Kirschner,M.W., Caput,D., Dahlberg,J.E., Lund,E.** (1984). Differential expression of multiple U1 small nuclear RNAs in oocytes and embryos of *Xenopus laevis*. *Cell* 38 : 681-689.

**Goldstein,L.A., Zhou,D.F.H., Picker,L.J., Minty,C.N., Bargatze,R.F., Ding,J.F., Butcher,E.C.** (1989). A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 56 : 1063-1072.

**Gossler,A., Doetschman,T., Korn,R., Serfling,E., Kemler,R.** (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 9065-9069.

**Günthert,U., Hofmann,M., Rudy,W., Reber,S., Zöller,M., Haussmann,I., Matzku,S., Wenzel,A., Ponta,H., Herrlich,P.** (1991). A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65 : 13-24.

**Hanahan,D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 : 557-580.

**Hasty,P., Rivera-Pérez,J., Bradley,A.** (1991a). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 5586-5591.

- Hasty,P., Rivera-Pérez,J., Chang,C., Bradley,A.** (1991b). Targeting frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 4509-4517.
- Heider,K-H., Hofmann,M., Horst,E., Van den Berg,F., Ponta,H., Herrlich,P., Pals,S.** (1993). A human homologue of the rat associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinoma and adenomatous polyps. *J. Cell. Biol.* 120:227-233.
- Hofmann,M., Rudy,W., Zöller,M., Tölg,C., Ponta,H., Herrlich,P., Günthert,U.** (1991). CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: Homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 51 : 5292-5297.
- Hogan,B., Beddington,R., Costantini,F., Lacy,E.** (eds.) (1994). *Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Honn,K.V., Tang,D.G.** (1992). Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer Metastasis Rev.* 11 : 353-375.
- Hooper,M., Hardy,K., Handyside,A., Hunter,S., Monk,M.** (1987). HPRT deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326 : 292-295.
- Hynes,N.E., Kennedy,N., Rahmsdorf,U., Groner,B.** (1981). Hormone-responsive expression of an endogenous proviral gene of mouse mammary tumor virus after molecular cloning and gene transfer into cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 2038-2042.
- Isacke,C.M., Sauvage,C.A., Hyman,R., Lesley,J., Schulte,R., Trowbridge,I.J.** (1986). Identification and characterisation of the human Pgp-1 glycoprotein. *Immunogenetics* 23 : 326-332.
- Jackson,D.G., Buckley,J., Bell,J.I.** (1992). Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 267 : 4732-4739.
- Jalkanen,S., Jalkanen,M.** (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell. Biol.* 116 : 817-825.
- Lacy,B.E., Underhill,C.B.** (1987). The hyaluronate receptor is associated with actin filaments. *J. Cell. Biol.* 105 : 1395-1404.
- Law,C.L., Clark,E.A.** (1994). Cell-Cell interactions that regulate the development of b-lineage cells. *Curr. opinion Immunol.* 6 : 238-247.
- Lesley,J., Hyman,R., Kincade,P.W.** (1993). CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv. Immunol.* 54 : 271-335.
- Maniatis,T., Fritsch,E.F., Sambrook,J.** (eds.) (1983). *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Mansour,S.L., Thomas,K.R., Capecchi,M.R.** (1988). Disruption of the proto-oncogene *Int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336 : 348-352.

- Martin,G.R.** (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 7634-7638.
- Matzku,S., Komitowski,D., Mildenerger,M., Zöller,M.** (1983). Characterization of Bsp73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities. *Invasion Metastasis* 3 : 109-123.
- Matzku,S., Wenzel,A., Liu,S., Zöller,M.** (1989). Antigenic differences between metastatic and nonmetastatic Bsp73 rat tumor variants characterized by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 49 : 1294-1299.
- Mc Knight,S.L.** (1980). The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidin kinase gene. *Nucl. Acids Res.* 8 : 5949-5964.
- Miyake,K., Medina,K.L., Hayashi,S-I., Ono,S., Hamaoka,T., Kincade,P.W.** (1990). Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lymphohemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J. Exp. Med.* 171 : 477-488.
- Miyake,K., Underhill,C.B., Lesley,J., Kincade,P.W.** (1990). Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J. Exp. Med.* 172 : 69-75.
- Mobley,J.L., Dailey,M.O.** (1992). Regulation of adhesion molecule expression by CD8 Tcells in vivo I. Differential regulation of gp90 Mel-14 (LECAM-1), Pgp-1, LFA-1, and VLA-4a during the differentiation of cytotoxic T lymphocytes induced by allografts. *J. Immunol.* 148 : 2348-2356.
- Mortenson,R.M., Conner,D.A., Chao,S., Geisterfer-Lowrance,A.A.T., Seidman,J.G.** (1992). Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct. *Mol. Cell. Biol.* 12 : 2391-2395.
- Mount,S.M.** (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* 10 : 459-472.
- Neame,S.J., Isacke,C.M.** (1992). Phosphorylation of CD44 in vivo requires both Ser 323 and Ser 325, but does not regulate membrane localization or cytoskeletal interaction in epithelial cells. *EMBO J.* 11 : 4733-4738.
- Nikolic-Zugic,J.** (1991). Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of ab T cells. *Immunol. today* 12 : 65-70.
- Nottenburg,C., Rees,G., St.John,T.** (1989). Isolation of mouse CD44 cDNA: structural features are distinct from the primate cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 8521-8525.
- Robertson,E.J.** (eds.) (1987). *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach.* IRL Press, Oxford.
- Rudy,W., Hofmann,M., Schwartz-Albiez,R., Zöller,M., Heider,K.-H., Ponta,H., Herrlich,P.** (1993). The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res.* 53 : 1262-1268.
- Sanger,F.,Nicklen,S.,Coulson,A.R.** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

- Screaton,G.R., Bell,M.V., Jackson,D.G., Cornelis,F.B., Gerth,U., Bell,J.I.** (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 12160-12164.
- Screaton,G.R., Bell,M.V., Bell,J.I., Jackson,D.G.** (1993). The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. *J. Biol. Chem.* 268 : 12235-12238.
- Smith,C.W.J., Patton,J.G., Nadal-Ginard,B.** (1989). Alternative splicing in the control of gene expression. *Ann. Rev. Genet.* 23 : 527-577.
- Stacey,A., Schnieke,A., Mc Whir,J., Cooper,J., Colman,A., Melton,D.W.** (1994). Use of double-replacement gene targeting to replace the murine  $\alpha$ -Lactalbumin gene with its human counterpart in embryonic stem cells and mice. *Mol. Cell. Biol.* 14 : 1009-1016.
- Stamenkovic,I., Amiot,M., Pesando,J.M., Seed,B.** (1989). A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 56 : 1057-1062.
- Stamenkovic,I., Aruffo,A., Amiot,M., Seed,B.** (1991). The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J.* 10 : 343-348.
- te Riele,H., Robanus-Maandag,E., Berns,A.** (1992). Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 5125-5132.
- Thomas,K.R., Capecchi,M.R.** (1986). Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene. *Nature* 324 : 34-38.
- Thomas,K.R., Capecchi,M.R.** (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51 : 503-512.
- Thomas,K.R., Deng,C., Capecchi,M.R.** (1992). High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol. Cell. Biol.* 12 : 2919-2923.
- Tölg,C., Hofmann,M., Herrlich,P., Ponta,H.** (1993). Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucl. Acids Res.* 21 : 1225-1229.
- Toole,B.P., Munaim,S.F., Welles,S., Knudson,C.B.** (1989). Hyaluronate-cell interactions and growth factor regulation of hyaluronate synthesis during embryo development. Evered,D., Whelan, J. (eds) *Biology of Hyaluronan*. John Wiley and Sons, Chichester, 143 : 146-159.
- Tsukita,S., Oishi,K., Sato,N., Sagara,J., Kawai,A., Tsukita,S.** (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell. Biol.* 126 : 391-401.
- Turley,E.A.** (1992). Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer Metastasis Rev.* 11 : 21-30.

- Wheatley,S.C., Isacke,C.M., Crossley,P.H.** (1993). Restricted expression of the hyaluronan receptor CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. *Development* 119 : 295-306.
- Wolffe,E.J., Gause,W.C., Pelfrey,C.M., Holland,S.M., Steinberg,A.D., August,J.T.** (1990). The cDNA sequence of mouse Pgp-1 and homology to human CD44 cell surface antigen and proteoglycan core/link proteins. *J. Biol. Chem.* 265 : 341-347.
- Wu,H., Liu,X., Jaenisch,R.** (1994). Double replacement: Strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine Col 1a-1 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 2819-2823.
- Zetter,B.R.** (1993). Adhesion molecules in tumor metastasis. *Seminars Cancer Biol.* 4 : 219-229.
- Zhang,H., Hasty,P., Bradley,A.** (1994). Targeting frequency for deletion vectors in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 14 : 2404-2410.
- Zhou,D.F.H., Ding,J.F., Picker,L.F., Bargatze,R.F., Butcher,E.C., Goeddel,D.V.** (1989). Molecular cloning and expression of Pgp-1 the mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. *J. Immunol.* 143 : 3390-3395.