

Deletion des *Arfp1*-Gens in der Maus: Herstellung und Charakterisierung von
Arfp1-Null-Mutanten

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Andrea Gotelind Müller, geb. Meszaros

aus

Silver Spring, MD, USA

Bonn Januar 2002

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Universtitätsprofessor Dr. Dr. H.-G. Joost
2. Referent: Universtitätsprofessor Dr. K. Mohr

Tag der Promotion: 02.04.02

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Guaninnukleotid-bindende Proteine	1
1.1.1	Die Ras-homologen GTPasen und ihre Unterfamilien	2
1.2	Die ARF (ADP-ribosylation factor)-Familie	7
1.3	ARFRP1 (ARF-related protein)	10
1.4	Das murine <i>Knockout</i> -Modell	12
1.5	Im murinen <i>Knockout</i> -Modell untersuchte GTPasen	14
1.6	Ziel der Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Material	16
2.1.1	Bakterienstämme	16
2.1.2	Vektoren	16
2.1.3	Standards, Enzyme, Antikörper und Primer- bzw. Oligonukleotid-DNA	16
2.1.4	Kits	17
2.2	Methoden	17
2.2.1	Molekularbiologische Grundtechniken	17
2.2.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	17
2.2.1.2	Kultivierung von COS-7-Zellen	18
2.2.1.3	Isolierung von DNA	18
2.2.1.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA, kleiner Maßstab	18
2.2.1.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA, großer Maßstab	18
2.2.1.3.3	Isolierung von Phagen-DNA	19
2.2.1.3.4	Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen	20
2.2.1.3.5	Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	20
2.2.1.3.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	20
2.2.1.4	Subklonierung von DNA	21
2.2.1.4.1	Eluierung der DNA aus Agarose	21
2.2.1.4.1.2	Ligation von DNA-Fragmenten	21

2.2.1.4.3	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock-Methode	21
2.2.1.5	Sequenzierung	22
2.2.1.6	Transiente Transfektion von COS-7-Zellen	23
2.2.2	Isolation genomischer Klone	23
2.2.2.1	<i>Screening</i> der λ -Fix-Phagen- <i>Library</i>	23
2.2.2.2	<i>Shotgun</i> -Methode zur Fragmentierung von DNA	24
2.2.2.3	PCR (<i>Polymerase Chain Reaktion</i>)	24
2.2.2.4	<i>Southern-Blot</i> -Analyse	26
2.2.2.4.1	Gel-Elektrophorese von DNA	26
2.2.2.4.2	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	26
2.2.2.4.3	Hybridisierung von an Nylonmembran gebundenen Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Sonden	27
2.2.3	Untersuchung des Promotorbereiches von <i>Arfp1</i>	28
2.2.3.1	Herstellung von Mutationen im 5'-flankierenden Bereich des <i>Arfp1</i> -Gens	28
2.2.3.1.1	Herstellung der Deletionsmutanten mit Hilfe der Endonuclease III	28
2.2.3.1.2	Herstellung von Mutationen im Promotor von <i>Arfp1</i>	29
2.2.3.2	Luciferase-Assay	31
2.2.3.3	<i>Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay</i> (EMSA)	32
2.2.3.3.1	Präparation der Kernextrakte aus COS-7-Zellen	32
2.2.3.3.2	Eingesetzte Oligonukleotide und deren radioaktive Markierung	33
2.2.4	Herstellung der <i>Arfp1-Knockout</i> -Mäuse	36
2.2.4.1	Herstellung des <i>Arfp1-Knockout</i> -Konstrukts	36
2.2.4.2	Kultivierung der embryonalen Stammzellen	37
2.2.4.3	<i>Feeder</i> -Zellen-Herstellung und Gewinnung	38
2.2.4.4	Elektroporation der ES-Zellen mit dem <i>Knockout</i> -Vektor	38
2.2.4.5	Nachweis des deletierten <i>Arfp1</i> -Allels in ES-Zellen und Genotypisierung der Mäuse	39
2.2.4.6	Selektion der Neomycinresistenten ES-Zellen	40
2.2.4.7	Injektion und Transfer von ES-Zellen in die Blastozysten	40
2.2.4.8	Zucht der <i>Arfp1-Knockout</i> -Mäuse	41
2.2.5	Untersuchung des Phänotyps der <i>Arfp1</i> -Mutanten	41
2.2.5.1	<i>Northern-Blot</i> -Analyse	41
2.2.5.1.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben der Maus	42
2.2.5.1.2	Agarose-Gel-Elektrophorese von RNA unter denaturierenden Bedingungen	42

2.2.5.1.3	Transfer von RNA auf eine Nylonmembran	43
2.2.5.2	<i>Western-Blot</i> -Analyse	43
2.2.5.2.1	Herstellung von kernlosen Gesamtmembranpellets	43
2.2.5.2.2	Bestimmung der Protein-Konzentrationen	44
2.2.5.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gele zur Auftrennung von Proteinen	44
2.2.5.2.4	Transfer elektrophoretisch getrennter Proteine auf eine Nitrozellulosemembran	45
2.2.5.2.5	<i>Immuno-Assay</i>	45
2.2.6	Histologie der Embryos der Maus	46
2.2.6.1	<i>In-situ</i> Hybridisierung (ISH) an Schnitten von Embryos der Maus	46
2.2.6.1.1	Herstellung der RNA-Sonden durch <i>in-vitro</i> Transkription	47
2.2.6.2	<i>In-vitro</i> Kultivierung von Blastozysten	48
2.2.6.3	Untersuchung an präparierten Embryos	48
2.2.6.4	H/E (Hämalaun/Eosin)-Färbung	49
2.2.6.5	TUNEL-Assay	49
3	ERGEBNISSE	50
3.1	Das murine <i>Arfrp1</i> -Gen	50
3.1.1	Isolierung des murinen <i>Arfrp1</i> -Gens	50
3.1.2	Die genomische Organisation des murinen <i>Arfrp1</i> -Gens	55
3.1.3	Vergleich des <i>Open Reading Frame (ORF)</i> von <i>Arfrp1</i> in unterschiedlichen Spezies	56
3.1.4	Sequenzvergleich von ARFRP1 mit anderen GTPasen	58
3.2	Das humane <i>ARFRP1</i> -Gen	59
3.3	Promotoranalyse des <i>Arfrp1</i> -Gens	60
3.3.1	Analyse des <i>Arfrp1</i> -Promotors mittels Luciferase-Assays	61
3.3.1.1	Analyse von Deletionen des <i>Arfrp1</i> -Promotors mit Hilfe von Luciferase-Assays	62
3.3.1.2	Charakterisierung der Promotoraktivität nach Mutation putativer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen	63
3.3.2	<i>Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay</i> des <i>Arfrp1</i> -Promotor-Bereichs	64
3.4	Die <i>Arfrp1</i> -Knockout Maus	69
3.4.1	Konstruktion des <i>Arfrp1</i> -Knockout-Vektors	69
3.4.2	Homologe Rekombination in ES-Zellen	70

3.4.3	Zucht der <i>Arfrp1</i> -defizienten-Mäuse	71
3.4.4	PCR-Analyse und <i>Southern</i> -Blot der genomischen Mausschwanz-DNA	72
3.5	Analyse des Phänotyps der <i>Arfrp1</i> - <i>Knockout</i> -Mäuse	74
3.5.1	Analyse der <i>Arfrp1</i> ^{+/-} -Mäuse	74
3.5.2	Untersuchung der Embryos von <i>Arfrp1</i> -Mutanten	76
3.5.2.1	<i>In-Situ</i> -Hybridisierung an gesamten Embryos	77
3.5.2.2	<i>In-vitro</i> Zucht von Blastozysten	78
3.5.2.3	Untersuchung präparierter Embryos zum Tag 7,5 <i>post conceptionem</i>	80
3.5.2.4	H/E-Färbung und TUNEL-Assays	81
<hr/>		
4	DISKUSSION	85
4.1	Die komplexe genomische Organisation von <i>Arfrp1</i> und die Stellung von ARFRP1 innerhalb der ARF-Familie	85
4.2	Die Chromosomale Lokalisation von <i>Arfrp1</i>	86
4.3	Der Promotorbereich des <i>Arfrp1</i> -Gens	87
4.4	Die <i>Arfrp1</i> - <i>Knockout</i> -Maus	90
<hr/>		
5	ZUSAMMENFASSUNG	96
<hr/>		
6	LITERATURVERZEICHNIS	98
<hr/>		
7	ANHANG	116
7.1	Abkürzungsverzeichnis	116
7.2	„Ein-Buchstaben“-Aminosäurencode	118

1 EINLEITUNG

1.1 Guaninnukleotid-bindende Proteine

Um feinregulierte intrazelluläre Prozesse zu steuern, werden molekulare Schalter benötigt. Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine, GTPasen) stellen solche molekularen Schalter dar. Sie steuern zelluläre Prozesse, indem sie zwischen einer aktiven und einer inaktiven Form wechseln. In ihrem aktivem Zustand haben sie GTP gebunden, durch Hydrolyse von GTP zu GDP werden sie inaktiviert, durch den Austausch von GDP mit GTP aktiviert (siehe Abb. 1).

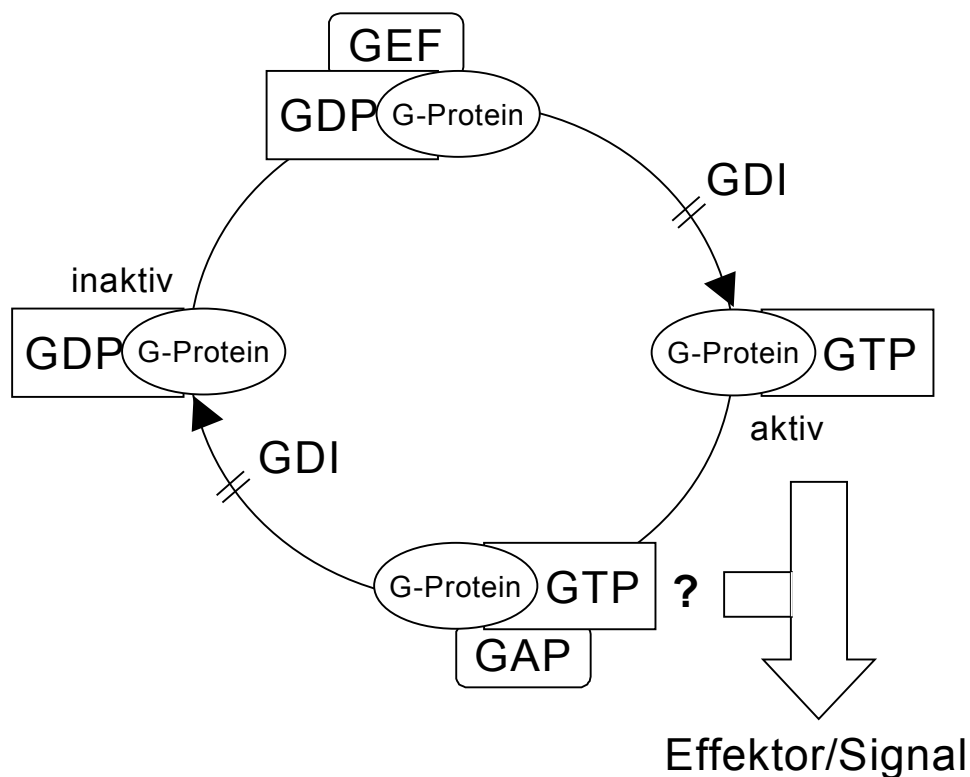


Abb. 1: Schematische Darstellung der Regulation Ras-ähnlicher GTPasen.
 GEF: Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor; GAP: GTPase-Aktivating Protein; GDI: Guanine-Nucleotide-Dissociation-Inhibitor.

Dieser Prozess kann durch weitere Proteine moduliert werden (Boguski *et al.*, 1993): GTPase-aktivierende Proteine (GAP's) beschleunigen die Hydrolyse von GTP und inaktivieren damit das G-Protein. GAP's stellen potentielle Effektoren der aktivierten GTPasen dar (McCormick, 1989). *Guanine-Nukleotide-Exchange-Factors* (GEF's) (auch *Guanine-Nucleotide-Releasing-Factors* (GRF's) oder *Guanine-Nucleotide-Dissociation Stimulators* (GDS's) genannt) aktivieren GTPasen, indem sie den Austausch von GDP zu GTP induzieren (Wolfman *et al.*, 1990; Cherfils and Chardin, 1999). Monomere GTPasen können auch durch eine dritte Gruppe von Proteinen, die *Guanine-Nucleotide-Dissociation-Inhibitors* (GDI's), beeinflusst werden. GDI's hemmen den Austausch von GDP gegen GTP, und die Hydrolyse von GTP zu GDP (Miura *et al.*, 1993).

Die GTPasen besitzen konservierte Sequenzmotive, die für die Bindung der Guaninnukleotide essentiell und jeweils für die verschiedenen Unterfamilien der monomeren GTPasen charakteristisch sind. Hierbei handelt es sich um die Phosphat-Magnesium-Bindungsstellen PM1 (GxxxxGK(S/T)), PM3 (DxxG), und das Guaninnukleotid-Bindungsmotiv G2 (NKxD); x kann jede beliebige Aminosäure darstellen (Dever *et al.*, 1987). Das PM3-Motiv ist als Teil der sogenannten *Switch II*-Region (Milburn *et al.*, 1990) an der Konformationsänderung beim Wechsel zwischen GDP- und GTP-besetzter Form beteiligt.

1.1.1 Die Ras-homologen GTPasen und ihre Unterfamilien

Ende der 70er Jahre wurden die ersten GTPasen dieser Familie, v-Ha-Ras und v-Ki-Ras, in Oncogenen von Kirsten und Harvey Sarcoma Virus entdeckt (Shih *et al.*, 1978, Chien *et al.*, 1979). Nach Identifizierung ihrer humanen Homologe und nach Aufklärung der Bedeutung von *Ha-Ras* und *Ki-Ras* für die Proliferation (Capon *et al.*, 1983, Stacey *et al.*, 1984) wurde dieses Gebiet in der Forschung immer wichtiger. Im Laufe der letzten 20 Jahre fand man schließlich viele weitere Mitglieder dieser Familie: zur Zeit kennt man über 100 monomere GTPasen, die in allen eukaryotischen Zellen - von der Hefe bis zum Menschen- exprimiert werden und eine neue Superfamilie bilden (Takai *et al.*, 1992). Gemeinsam ist ihnen ihre Größe von 20-40 kDa (Takai *et al.*, 2001).

Auf Grund von Sequenzhomologien lässt sich die Familie der Ras-homologen GTPasen in sechs Familien unterteilen: Ras-Proteine, Rho-Proteine, Ran-Proteine, Rab-Proteine, Rag-Proteine und ARF-Proteine.

1. **Die Ras-Familie:** Drei Vertreter dieser Gruppe sind heute bekannt: *Ha-Ras*, *Ki-Ras* und *N-Ras*. Durch genetische, zellbiologische und biochemische Untersuchungen wurden verschiedene Funktionen der Ras-Proteine aufgeklärt: über die *Mitogen-Activated-Protein*-(MAP) Kinase-Kaskade induzieren sie (Dent *et al.*, 1992; Campbell *et al.*, 1998) die Genexpression und regulieren damit die Zellproliferation. Andere Studien haben gezeigt, dass Ras-Proteine außerdem bei der Differenzierung von Zellen, in der Zellmorphologie (Bar-Sagi *et al.*, 1985a und 1985b) und bei programmiertem Zelltod (Apoptose, Kaufmann-Zeh *et al.*, 1997) eine Rolle spielen (Takai *et al.*, 2001). Unterschiede zwischen den Ras-Proteinen findet man u. a. in ihrer zellulären Verteilung. H-Ras gelangt im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern auf einem exozytotischen Weg an die Plasmamembran (Apolloni *et al.*, 2000).

Eine weitere Charakteristik der Ras-Proteine ist, dass Mutationen ihrer Gene oder der Gene von Ras-regulierenden Proteinen Tumore hervorrufen. In 10-50% aller menschlichen Tumore konnten spezifische Mutationen in einem der drei endogenen Ras-Gene nachgewiesen werden (Barbazid, 1987). Diese Mutationen verhindern z. B. die GTP-Hydrolyse (Austausch einer Aminosäure an Position 12 oder 61), so dass die resultierenden Proteine konstitutiv aktiv sind und unkontrolliertes Wachstum verursachen (Seeburg *et al.*, 1984; Takai *et al.*, 2001).

Die Aktivität von Ras-Proteinen wird von GEF's und GAP's kontrolliert. Deren Aktivierung wird über eine Vielzahl von extrazellulären Signalen induziert, die eine intrinsische oder assoziierte Tyrosin-Kinase-Aktivität aufweisen (Egan *et al.*, 1993). Phosphotyrosine dienen innerhalb der Zelle als Andockstelle für Adapterproteine, z. B. Grb2 und den SHC/Grb2-Komplex (*Src-Homology/α2-Collagen-Related Protein*) (Pelicci *et al.*, 1993). Diese rekrutieren dann SOS (SOS: Säugerhomologes Protein von *Son of*

Sevenless aus *Drosophila*). SOS ist der bislang am besten charakterisierte Ras-GEF (Rozakis *et al.*, 1993).

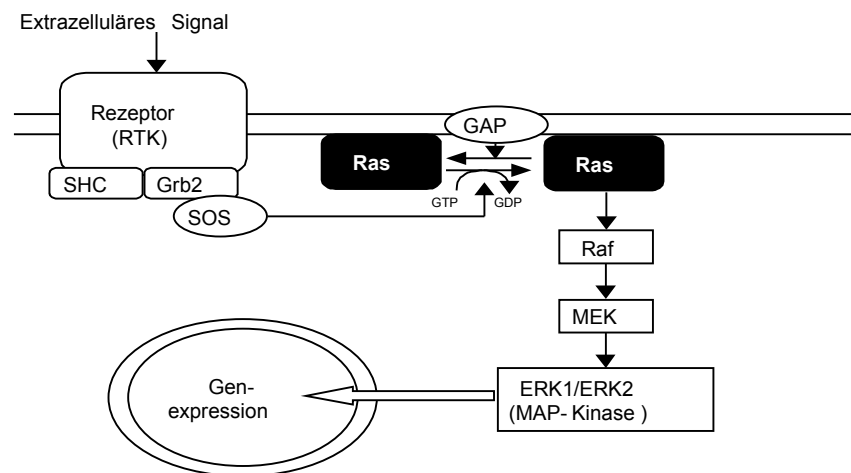


Abb. 2: Schematische Darstellung des Hauptsignaltransduktionswegs von Ras

RTK: Rezeptor-Tyrosin-Kinase, SHC: *Src-Homology/α2-Collagen-Related Protein*, Grb2: *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*, SOS: Säugerhomologes Protein von *Son of Sevenless* aus *Drosophila*, MEK: MAP-Kinase-Kinase, MAP: *Mitogen Activated Protein Kinase*.

Es aktiviert das Ras-Protein, indem der Austausch von GDP gegen GTP angeregt wird. Rezeptoren, die nicht direkt mit Tyrosin-Kinasen assoziiert sind (z. B. T-Zell-Rezeptoren), können Ras auch indirekt, über SHC-like Tyrosin-Kinasen aktivieren. Auch für heterotrimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, z. B. α -Ardrenorezeptoren, muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren und Lysophosphatidylsäure wurde eine Aktivierung von Ras-Proteinen nachgewiesen (Hawes *et al.*, 1995). Der klassische *Downstream*-Effektor von Ras ist die Serin-Threonin-Kinase Raf1. Raf phosphoryliert dann die Proteinkinasen MEK1 und MEK2 (*Mitogen Activated Protein/Extracellular Signal Related Kinase Kinase*), die damit aktiv werden. Diese wiederum phosphorylieren MAP-Kinasen der ERK1 und ERK2-Familie (Ahn *et al.*, 1992; Magee and Marshall, 1999). Aktives ERK wird in den Zellkern transloziert und stimuliert verschiedene Transkriptionsfaktoren. Andere wichtige Effektoren von Ras sind die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) oder p120GAP, welches eine andere GTPase Ral beeinflusst (Exton *et al.*, 1998).

2. **Die Rho-Familie:** Zur Rho-Familie, die inzwischen 16 Mitglieder zählt, gehören RhoA-E, Rho G, RhoH, Rho 6, Rac1-3, TTF und Cdc42 (Takai et al., 2001). Sie spielen eine zentrale Rolle bei zellulären Vorgängen wie der Migration, Adhäsion und Invasion, indem sie die Organisation des Zytoskeletts beeinflussen. Diese Rolle wurde u. a. mit Hilfe von bakteriellen Toxinen aufgeklärt, die die GTPasen modifizieren und konstitutiv aktivieren oder inaktivieren (Chardin *et al.*, 1989).

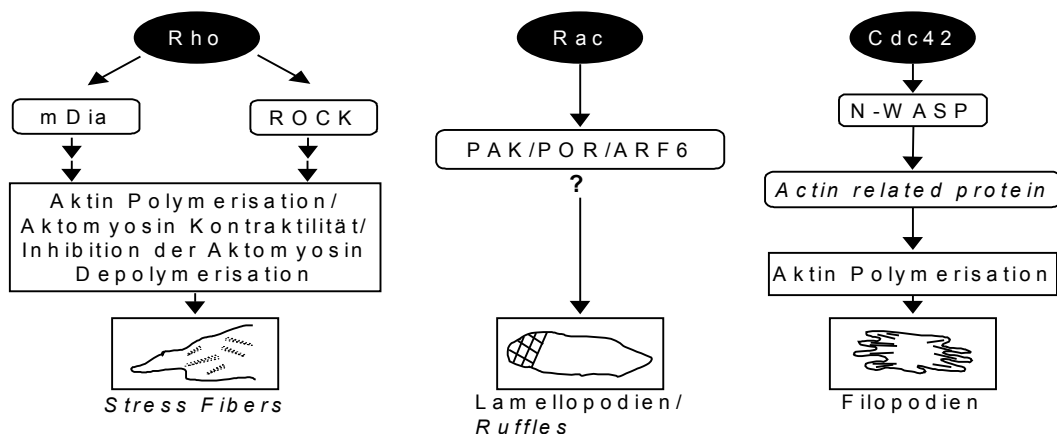


Abb. 3 Schematische Darstellung der Hauptsignaltransduktionswege von Rho, Rac und Cdc42

mDia: Säuger Homologes eines *Drosophila diaphanous* Proteins, ROCK: ROK α /Rho-Kinase (ROK: *RhoA-binding Kinase*), PAK: p21 aktivierende Kinase, POR: *Partner of Rac*, ARF6: *ADP-Ribosylation Factor 6*, N-WASP: menschliches Homologes zum *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*. Nach Takai et al., 2001

Es konnte gezeigt werden (siehe Abb. 3), dass Rho die Polymerisation von Aktinfilamenten hervorruft und damit an der Bildung von sogenannten *Stress Fibers* und *Focal Adhesions* beteiligt ist (Maekawa et al., 1999; Nakano et al., 1999). Rac und Cdc42, weitere Mitglieder der Rho-Familie, regulieren nach Stimulation von extrazellulären Signalen die Reorganisation des Zytoskeletts. Rac löst die Bildung von Membran-*Ruffles* und von Lamellopodien aus (Ridley et al., 1992; Cox et al., 1997), es spielt aber auch eine Rolle bei der Regulierung der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und bei der Zell-Zell-Adhäsion (Sugihara et al., 1998). Cdc42 reguliert die Bildung von fingerartigen Ausstülpungen, den sogenannten Filopodien (Nobes and Hall, 1995; Burbello et al., 1999) und spielt bei der Zell-Zell-Adhäsion, Migration und Morphologie eine Rolle (Kodama et al., 1999). Symons (1995 und 1996) hat nachweisen können,

dass Rac und Rho in einer Signalkaskade einerseits unter Ras und andererseits unter Cdc42 agieren.

3. **Die Ran-Familie:** Ran, das *Ras-Related Nuclear Protein*, ist auf Grund seiner Homologie zum Ras kloniert worden. In den meisten Zelltypen und Spezies, wie auch beim Menschen, ist nur eine Ran-Isoform bekannt. 1993 konnte erstmals gezeigt werden, dass Ran eine Rolle im nukleozytoplasmatischen Transport spielt (Moore and Blobel, 1993). Makromoleküle (z. B. Proteine, mRNA's, tRNA's) können die Kernmembran nicht ohne Hilfe passieren. Dazu dient z. B. Ran als *Carrier*-Protein. Auch die Reorganisation der Mikrotubuli während der M-Phase des Zellzyklus wird durch Ran reguliert (Carazo-Salas *et al.*, 1999).

4. **Die Rab-Familie:** Rab-Proteine bilden die größte Gruppe der kleinen GTPasen Superfamilie. Alleine in Säuger-Zellen sind über 50 Proteine (inklusive Isoformen) dieser Familie kloniert. Identifiziert wurden die Rab-homologen YPT-Proteine zuerst in *S. cerevisiae*, als Regulatoren von vesikulärem Transport zwischen Zellorganellen. Auch beim Säuger übernehmen Rab-Proteine verschiedene Rollen im vesikulären Transport (Pryer *et al.*, 1992, Mellman and Warren, 2000). Vier Schritte beschreiben den intrazellulären Transport von Proteinen in Vesikeln: 1. Die Entstehung der Vesikelknospe an der Donormembran, an diesem Prozess beteiligen sich Proteine der ARF-Familie (siehe Kap. 1.2), 2. das *Targeting* des Vesikels an die Akzeptormembran, 3. die Assoziation des Vesikels an die Akzeptormembran und 4. die Fusion mit der Akzeptormembran. Die letzten drei beschriebenen Prozesse werden sowohl bei exozytotischen als auch bei endozytotischen Vorgängen durch Proteine der Rab-Familie reguliert (Martinez an Goud, 1998, Novick and Zerial, 1998). Ein großer Teil der Rab-Proteine ist Kompartiment-spezifisch (Plutner *et al.*, 1991) und befindet sich in erster Linie in Membranen (Brenwald und Novick, 1993).

5. **Die Rag-Familie:** Diese Familie der GTPasen wird aus zwei in Säugern identifizierten Mitgliedern (RagA und RagB) und einem Homolog aus Hefe (Gtr1) gebildet. Von RagB existieren zwei *Splice*-Isoformen (Schürmann *et al.*, 1995). RagA

shuttelt je nach Aktivitätszustand zwischen Zytoplasma (inaktiv) und Kern (aktiv). Dabei reguliert es die Aktivierung von Ran (Hirose et al., 1998). Neuere Untersuchungen haben belegt, dass die Expression von *ragAB*, dem *P. gingivalis* homologen Protein, temperaturreguliert ist. Man geht davon aus, dass diese regulierte Genexpression dem gram-negativem Anaerobier in einem infiziertem Träger bessere Überlebenschancen gibt (Bonass et al., 2000).

6. **Die ARF-Familie:** Die GTPasen der *ADP-Ribosylation-Factor*-Familie wurden ursprünglich als Co-Faktoren bei der Cholera-toxin-induzierten ADP-Ribosylierung identifiziert. Sie katalysieren außerdem die Vesikelbildung und sind an der Aktivierung der Phospholipase-D beteiligt (siehe Kap. 1.2).

1.2 Die ARF (ADP-ribosylation factor)-Familie

Die ARF-Familie wird auf Grund von Sequenzhomologien und Funktionen unterteilt in ARF's (ARF1-ARF6), ARF-like-Proteine (ARL's, ARL1-ARL7), SAR's (SAR1a und SAR1b) und das ARF-related Protein (ARFRP1). Als Kriterien für die Zugehörigkeit zur ARF-Familie galten ursprünglich die Fähigkeit, das Cholera-toxin zu aktivieren und die letale Doppelmutante *arf1⁻arf2⁻* in *S. cerevisiae* zu antagonisieren (Kahn et al., 1991). Allerdings weiß man heute, dass auch ARL1 in der Lage ist, diese Bedingungen zu erfüllen (Hong et al., 1998).

ARF1 ist das am besten charakterisierte Mitglied der ARF-Familie und wurde auf Grund seiner Fähigkeiten entdeckt, als Co-Faktor Cholera-toxin zu stimulieren (Kahn and Gilman, 1984, Sewell and Kahn, 1988). ARF1 aktiviert Phospholipase-D und ist während der Abschnürung von Vesikeln (Stearns et al., 1990) bei exo- und endozytotischen Vorgängen (Zeuzem et al., 1992, D'Souza-Schorey et al., 1995) in allen eukaryotischen Zellen am Vesikeltransport beteiligt. ARF1 ist hauptsächlich auf der zytosolischen Seite des *cis*-Golgi lokalisiert (Stearns et al., 1990) und bewirkt dabei die Anlagerung von sogenannten *Coat*-Proteinen (COP's) für die Vesikelknospung. Man vermutet folgende Funktionen der COP's: einerseits geben sie der Knospe ihre

mechanische Stabilität, andererseits verankern sie spezielle membranäre Rezeptoren. Vesikel mit *Coat*-Proteinen unterteilt man in Clathrin- (beinhalten auch die *Adaptor Protein* (AP)-Komplexe AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4), COPI- und COPII-*Coated Vesicles* (Zhu *et al.*, 1999).

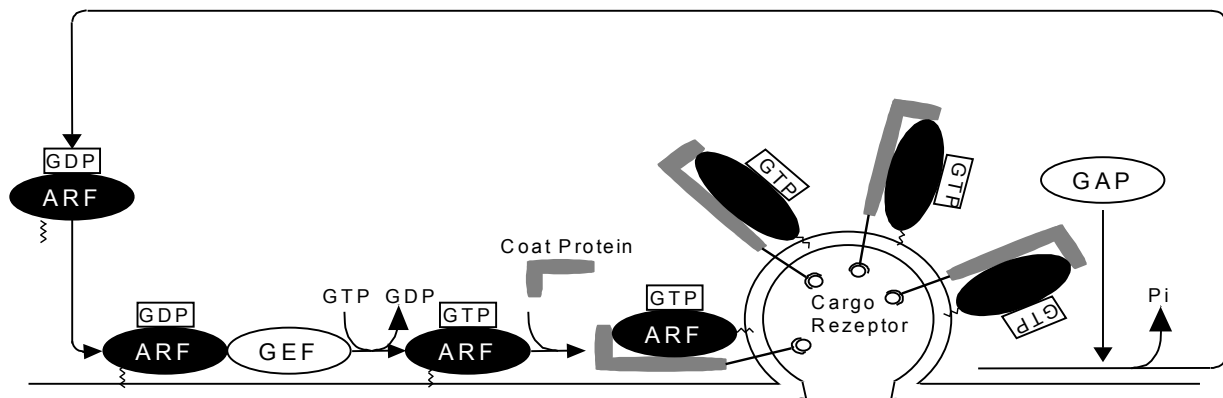


Abb. 4: Aktivierung und Inaktivierung von ARF-Proteinen und ihre Translokation.

Die gezackte Linie stellt das Myristoylisierungsmotiv und runde Kreise spezielle membranäre Rezeptoren dar. Nach Takai *et al.*, 2001

ARF's und SAR1 nehmen essentielle Rollen ein: in der Rekrutierung der COPI- und COPII-Proteine sowie der AP-Komplexe-1 und -3 in die Membranen des Golgi-Apparates, des endoplasmatischen Retikulum, der frühen Endosomen und anderer Zellorganellen (Hirst and Robinson, 1998). Sie wechseln dabei zwischen ihrem GDP-gebundenen inaktiven und GTP-gebundenen aktiven Zustand. Dabei wird der Zyklus durch GEF's und GAP's (Jackson and Casanova, 2000), aber nicht von GDI's reguliert. Der Nukleotid-Austausch bewirkt eine konformationelle Veränderung in den *Switch-I* und *-II* Domänen, die eine Interaktion mit *Downstream*-Effektoren ermöglicht (Cherfils and Chardin, 1999), z. B. die Aktivierung der Phospholipase-D (Bomann and Kahn, 1995, Roth, 1999a). Letztere katalysiert ihrerseits die Umwandlung von Phosphatidylcholin in Phosphatidylsäure und Cholin. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bildung der Phosphatidylsäure über eine Acetylierung der Lysophosphatidylsäure die Bildung von Vesikeln im Golgi-Apparat steuert (Weigert *et al.*, 1999). Bomann *et al.* (2000) haben kürzlich eine neue Gruppe von γ -Adaptin verwandten Proteinen identifiziert, die Signaltransduktionsprozesse als Effektoren der ARF's in der Golgi-Membran regulieren.

Da ARF-Proteine keine intrinsische GTPase-Aktivität besitzen (Moss and Vaughan, 1998), werden sie (wie schon beschrieben) in ihrem Zyklus von GEF's und GAP's reguliert. Viele GEF's der ARF-Proteine sind schon identifiziert worden (Roth, 1999b) und werden auf Grund ihrer Sequenz-Ähnlichkeiten und Funktion in zwei Familien gruppiert (Roth, 2000). Zur ersten Familie gehören z. B. Sec7, Gea1 und Gea2 aus der Hefe und BIG1/p200, BIG2 und GBF1 in Säuger-Zellen. Sie sind vergleichsweise große Proteine (1400-2000 Aminosäuren lang) und werden alle außer GBF1 durch Brefeldin A inhibiert (Peyroche et al., 1999). Zur zweiten Familie gehören ARNO, Cytohesin-1, GRP1 und Cytohesin-4. Diesen vergleichsweise kurzen Proteinen (ca. 400 Aminosäuren lang) ist eine ca. 200 Aminosäuren große konservierte Region gemeinsam, die Nukleotidaustausch-katalysierende Sec7-Domäne (Jackson and Casanova, 2000; Roth, 2000). Die Austauschfaktoren besitzen außerdem eine *Coiled-Coil*-Domäne und eine *Pleckstring Homology* (PH)-Domäne (Pacheco-Rodriguez et al., 1998). Die PH-Domäne ist nach Bindung von PIP₂ oder PIP₃ für die Rekrutierung der GEF's an die Membran verantwortlich, wo sie dann GDP-gebundene ARF-Proteine aktivieren (Klarlund et al., 1997). Eine Myristoylierung am N-terminalen Ende der ARF-Proteine und das Vorhandensein von Phospholipiden sind außerdem für ihre Aktivierung unbedingt erforderlich (Moss and Vaughan, 1998). Röntgenstruktur-Analysen des Komplexes von ARF1 und der Sec7-Domäne von Gea1 lieferten neue Hinweise auf die Aktivierungs-Mechanismen der ARF's: In seinem inaktivem Zustand ist ARF nicht in der Lage mit der Sec7-Domäne eine Wechselwirkung einzugehen. Wahrscheinlich rufen Phospholipide der Membran eine Konformationsänderung von ARF hervor, die die Bindung von ARF an die Sec7-Domäne der GEF's ermöglichen. Erst dann ist die Aktivierung von ARF möglich (Goldberg, 1998).

ARF-inaktivierende-Proteine (GAP's) sind identifiziert worden (Roth, 1999b). Sie enthalten eine *Zink-Fingerlike*-ARF-GAP-Domäne, die die Aktivität der ARF's herabsetzt. Das in Säugern zuerst identifizierte GAP, ARF1-GAP (Cukierman et al., 1995), ist im Golgi-Apparat lokalisiert und wird von Diacylglycerol stimuliert, das wahrscheinlich als Produkt der Phospholipase-D-Stimulierung entsteht (Antonny et al.,

1997). ARF1-GAP wird über Cargo-Rezeptoren an die Vesikel-Membran rekrutiert (Aoe et al., 1998).

Die Subgruppe der ARF-like GTPasen (ARL's) besitzt mindestens 40% Identität zu den ARF-Proteinen und wird auf Grund dieser Ähnlichkeit der ARF-Familie zugeordnet (Hillig *et al.*, 2000). Über ihre Funktion ist wenig bekannt; es wird spekuliert, dass sie eine Rolle im exozytotischen als auch endozytotischen Vesikel-Transport spielt. ARL4 besitzt ein Kernlokalisierungssignal, es wird vermutet, dass diese GTPase den Proteinfluss über die Membran des Zellkerns vermittelt (Lin *et al.* 2000; Schürmann, unveröffentlicht).

1.3 ARFRP1 (ARF-related protein)

ARFRP1 ist eine Ras-ähnliche GTPase, die die höchste Homologie zu anderen GTPasen der ARF-Familie besitzt (36% zu ARF1 und 44% zu ARL3 und zu ARL4). Die Ähnlichkeit beschränkt sich jedoch weitgehend auf die Nukleotidbindungsmotive und das Tryptophan 86. ARFRP1 wird in den meisten Zellen exprimiert, wobei höhere Konzentrationen in Hoden, Niere und Leber gefunden wurden (Schürmann, 1995b). ARFRP1 besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 23 kDa und weist charakteristische Sequenzmotive auf, die für die Nukleotid-Bindung und die Hydrolyse von GTP essentiell sind (siehe Abb. 7). ARFRP1 unterscheidet sich von ARF- und ARL-Proteinen durch das Fehlen eines Myristoylierungs-Motivs (ein Glycin an Position 2), eine Insertion von acht Aminosäuren zwischen PM1 und PM2 und einen längeren C-Terminus. ARFRP1 ist im Gegensatz zu den ARF- und ARL-Proteinen vorwiegend in der Plasmamembran lokalisiert, ARF- und ARL-Proteine hingegen wandern zwischen Zytosol und Plasmamembran (ARF's), oder zwischen Zellkern und Zytosol (ARL4) (siehe Kap. 1.2). Da ARFRP1 das Myristoylierungs-Motiv fehlt, das bei ARF- und ARL-Proteinen zur posttranslationalen Lipidmodifikation führt und eine Membranassoziation ermöglicht, wird vermutet, dass ein weiteres bisher nicht identifiziertes Motiv für die Lokalisation in der Plasmamembran verantwortlich ist.

Der Austausch von GDP zu GTP findet beim ARFRP1 im Vergleich zu anderen GTPasen langsam statt. Während rekombinantes ARF ohne Lipidmodifikation und in Abwesenheit eines GAP's nicht in der Lage ist, GTP zu hydrolysieren (Makler *et al.*, 1995), zeigt ARFRP1 intrinsische GTPase-Aktivität (Schürmann *et al.*, 1997). Allerdings sind die Reaktionen von ARFRP1 so langsam, dass ARFRP1 vermutlich, ähnlich wie Ras (Vogel *et al.*, 1988, Bollag *et al.*, 1991, Chardin *et al.*, 1993), mit GAP's, GEF's und GDI's interagiert. Bislang konnte gezeigt werden, dass ARFRP1 an dem ARF-spezifischen Nukleotid-Austausch-Faktor sec7-1/Cytohesin bindet und dabei die durch ARF/sec7 hervorgerufene Aktivierung der Phospholipase-D inhibiert (Schürmann *et al.*, 1999).

Schürmann *et al.* (1999) haben gezeigt, dass die über den muskarinischen Acetylcholin Rezeptor-3 induzierte Phospholipase-D-Stimulation und Translokation von ARF aus dem Zytosol an die Membran durch aktiviertes ARFRP1 gehemmt wurde. Diese Untersuchungen ließen vermuten, dass ARFRP1 in einer Signalkaskade die durch ARF hervorgerufene Aktivierung der Phospholipase-D inhibiert.

In *S. cerevisiae* wurde ein ARFRP1 homologes Protein zu ARFRP1 (yARL3) identifiziert, das zu ARFRP1 eine Identität von 43% aufweist (Huang *et al.*, 1999). Auch biochemisch verhalten sich die beiden Proteine gleichartig, die Bindung und Hydrolyse von GTP ist vergleichbar. Durch das Deletieren des Hefe-Gens konnten die Autoren zeigen, dass yARL3 für das Überleben der Hefe-Zelle nicht essentiell ist, allerdings für das Wachstum eine Rolle spielt. Bei 15° C zeigte die Mutante ein erheblich langsames Wachstum im Vergleich zum Wildtyp.

Die physiologische Funktion von ARFRP1 ist bislang noch nicht bekannt. Das Vorkommen von ARFRP1 (sowohl in primitiven Hefe-Zellen als auch in komplexen eukaryotischen Zellen) lässt eine basale Funktion vermuten, die vielen Zellen gemeinsam ist.

1.4 Das murine *Knockout*-Modell

Das Deletieren eines Gens, auch *Knockout*-Verfahren genannt, ist eine sehr effektive Methode, um die Funktion eines Gens *in vivo* zu analysieren (Shastry, 1994, Galli-Taliadoros, 1995). Ausgeschaltet wird das intakte Gen, indem gezielt das Gen oder ein Teil des Gens auf dem entsprechenden Chromosom durch eine geeignete Veränderung ersetzt wird. Das Ausschalten des Gens bewirkt das Fehlen eines bestimmten Proteins. Hierdurch kann sich ein Phänotyp ausbilden, durch dessen Analyse erfasst wird, welche Aufgaben ein bestimmtes Protein bei einem Organismus im Laufe des Lebenszyklus wahrnimmt. Um Erkenntnisse über den menschlichen Organismus und seine normale oder auch gestörte Funktion zu gewinnen, werden solche Experimente an einem Säugermodell durchgeführt. Meistens werden dazu Mäuse eingesetzt, da Schätzungen zufolge mindestens 99% der Gene von Mäusen und Menschen im wesentlichen übereinstimmen (Capecchi, 1994). Weitere Vorteile der Maus sind die schnelle Vermehrung und der geringe räumliche Anspruch der Tiere. Mit dieser Methode wird erhofft, unser Verständnis von Genen und Proteinen erheblich zu vertiefen. Insbesondere die neu veröffentlichten Daten des Humanen-Genom-Projekts zeigen erneut, zu welchem geringen Anteil der Gene die Funktion bekannt ist.

Der erste Schritt für die Herstellung von *Knockout*-Mäusen ist die Konstruktion eines sogenannten *Targeting*-Vektors, der mit dem endogenen Gen der Wirtszelle homolog rekombiniert. Der klassische *Targeting*-Vektor enthält ein Antibiotika-Resistenz-Gen, das als Selektions-*Marker* dient und die kodierende Region des Gens ersetzt oder zerstört.

Da homologe Rekombinationen im Vergleich zur ungerichteten Integration des *Targeting*-Vektors ins Genom selten stattfinden (Thomas and Capecchi, 1987), können Maßnahmen ergriffen werden, um die Wahrscheinlichkeit eines homologen Rekombinationsereignisses zu erhöhen. In einem *Targeting*-Konstrukt wird das Resistenz-Gen zu beiden Seiten von DNA flankiert, die mit Bereichen des entsprechenden auszuschaltenden Gens homolog ist. Die Frequenz der homologen

Rekombination korreliert mit der Symmetrie (Thomas *et al.*, 1992) und der Länge der homologen DNA des *Targeting*-Konstrukts. Ab einer DNA-Länge von 1,9 kb nimmt die Zahl der homologen Rekombinationsereignisse exponentiell zu (Hasty *et al.*, 1991, Deng *et al.*, 1992). Auch unter Verwendung von syngenetischer DNA erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination (Riele *et al.*, 1992). Unter syngenetischer DNA versteht man genomische DNA, die aus dem gleichem Mausstamm, aus dem die embryonale Stammzellen (ES-Zellen) isoliert wurden, stammt.

Das *Targeting*-Konstrukt wird mittels Elektroporation in ES-Zellen gebracht, die dann in Anwesenheit des Antibiotikums wachsen. ES-Zellen, in denen eine stabile Transfektion des Konstrukts stattgefunden hat, können über die Expression der Antibiotika-Resistenz selektiert und (z. B. mittels PCR) auf die homologe Rekombination untersucht werden. ES-Zellen, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, werden in eine Wirtsblastozyste injiziert oder nach Aggregation mit einer Morula (Wood *et al.*, 1993) in den Uterus einer scheinsschwangeren Maus reimplantiert. Die chimären Nachkommen dieser Maus besitzen eine mosaikartig zusammengesetzte Fellfarbe, da die ES-Zellen von braunen (*agouti*) Mäusen (129/SvJ) stammen und die Blastozysten aus schwarzen C57/B6 Mäusen isoliert werden. Die nachfolgende Kreuzung der chimären Mäuse mit schwarzen C57/B6 Mäusen lässt erkennen, ob das mutierte Allel in die Keimbahn der Chimären gelangt ist. Da das braune *Agouti*-Gen dominant über die schwarze Fellfärbung ist, tragen nach Mendel 50% der braunen Nachkommen das mutierte Allel. Schwarze Nachkommen enthalten keine Mutation im zu untersuchenden Gen. Mit Hilfe von *Southern*-Blot-Analysen oder über PCR kann das ausgeschaltete Allel nachgewiesen werden. Eine Kreuzung zweier heterozygoter Mäuse resultiert schließlich in 25% homozygoter Nachkommen (Capecchi, 1989a, Capecchi, 1989b). Die Untersuchungen der Mäuse auf einen veränderten Phänotyp ermöglichen Rückschlüsse auf die Funktion des manipulierten Gens (Saftig, 1997).

1.5 Im murinen *Knockout*-Modell untersuchte GTPasen

Seit bereits ca. zehn Jahren ist das murine Knockout-Modell (siehe Kap. 1.4) eine Methode, die zunehmend an Popularität gewonnen hat. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass auch andere GTPasen mit Hilfe dieser Methode untersucht wurden. Das *N-Ras*-Gen wurde von Umanoff *et al.* (1995) in der Maus ausgeschaltet. Dabei fanden sie keine Unterschiede in Entwicklung, Wachstum und Fertilität zwischen Wildtyp-Mäusen und *N-Ras*-defizienten Mäusen. Auch das Ausschalten von *H-Ras* bringt keine phänotypischen Veränderungen hervor (Esteban *et al.*, 2001). *K-Ras* hingegen ist für die embryonale Entwicklung von Mäusen essentiell (Koera *et al.*, 1997). *K-Ras* defiziente Mäuse zeigen in der Embryonalentwicklung ab dem Tag 11,5 *post conceptionem* Veränderungen der Motoneuronen der Medulla und sterben schließlich ab dem Tag 12,5. Neuronale Veränderungen beobachtete man auch in *Rab3A*-defizienten Mäusen. In diesen mutierten Mäusen findet nach einem normalen Impuls der Neuronen eine erhöhte Exozytose von Vesikeln in die Synapse statt (Geppert *et al.*, 1997). Auch *Rac1* und *Rac2* sind bereits mit Hilfe des murinen *Knockout*-Modells untersucht worden. Dabei waren *Rac2*-defiziente Mäuse zwar lebensfähig, doch zeigten sie Abnormalitäten im Verhalten der neutrophilen Granulozyten in ihrer Abwehrfunktion (Kim and Dinauer, 2001). *Rac1-Knockout*-Mäuse waren embryonal letal. Die untersuchten Embryos zeigten verstärkten Zelltod während der Phase der Gastrulation. *In-vivo* Studien einer Epiblasten-Kultur aus den *Rac1*-defizienten-Mäusen belegten außerdem die Rolle von *Rac1* bei der Bildung von Lamellopodien, der Zell-Adhäsion und Zell-Migration. Vermutlich ist die *Rac1*-vermittelte-Zell-Adhäsion bei der Bildung der Keimblattschichten während der Gastrulation essentiell (Sugihara *et al.*, 1998). Aus der Familie der ARF-Proteine ist *ARL4* in der Maus bereits ausgeschaltet worden. Diese Mutanten sind im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Geschwistern phänotypisch unauffällig (Jacobs, 1999; Koling, unveröffentlicht).

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die physiologische Rolle der Ras-homologen GTPase ARFRP1 aufzuklären, indem das Gen in der Maus ausgeschaltet wurde. Um dieses Ziel zu erreichen, war es notwendig, das Gen zu isolieren und die genomische Struktur aufzuklären. Die Isolation des genomischen Klon ermöglichte es außerdem, den Promotor von *Arfrp1* zu charakterisieren und die Regulation der Genexpression von *Arfrp1* zu untersuchen.

Die genomische DNA wurde zur Herstellung eines *Targeting*-Konstrukts eingesetzt, das die Grundlage für die homologe Rekombination zum Ausschalten des *Arfrp1*-Gens darstellte. Embryonale Stammzellen wurden stabil mit dem *Targeting*-Konstrukt transfiziert und es wurde ein Klon, bei dem eine homologe Rekombination stattgefunden hatte, gezüchtet und in Blastozysten injiziert. Diese Blastozysten wurden dann zur Herstellung von chimären Mäusen in scheinchwangere Mäuse reimplantiert. Die chimären Mäuse wurden zur Zucht von *Arfrp1*-defizienten Mäuse eingesetzt. Da Mäuse, in denen das *Arfrp1*-Gen deletiert war, embryonal letal waren, wurden diese Embryos genauer untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

E. coli: DH5 α *endA*⁻ Wirtsstamm
XL1-Blue MRA

2.1.2 Vektoren

pUC18[®] (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
pGL3[®]-Basic (Promega, Mannheim)
pGEM[®]-5Zf(+) (Promega, Mannheim)
pBlueskript[®]II-KS (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

2.1.3 Standards, Enzyme, Antikörper und Primer- bzw. Oligonukleotid-DNA

Restriktionsendonukleasen wurden von den Herstellern Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Gibco-BRL (Eggenstein), Life Technologies (Karlsruhe), New England Biolabs (Beverly, USA), MBI-Fermentas (Vilnius, Litauen), Promega (Mannheim) und Roche-Diagnostics (Mannheim) erworben. 100 bp und 1 kb Leitern wurden von Gibco-BRL (Eggenstein), und Primer- bzw. Oligonukleotid-DNA wurden bei MWG-Biotech AG (Ebersberg) bestellt. Antikörper wurden von Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA) erworben.

2.1.4 Kits

BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)

FuGene[®] 6-Reagenz (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)

Jetsorb-Kit[®] (Genomed, Bad Oeynhausen)

Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer (Promega, Madison, USA)

Midi-/ Maxipräparationskit (Qiagen, Hilden)

QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden)

SP6/T7 Transkriptionskit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)

Sure Clone Kit[®] (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

TdT-FragEL DNA Fragmentation Detection Kit[®] (Oncogene Research Products, Boston, MA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Grundtechniken

Die Durchführung von molekularbiologischen Standardmethoden, wie z. B. Restriktionsverdau, Ethanol-fällung, Auffüllen einzelsträngiger DNA-Enden und Dephosphorylierung, wurden nach den Vorschriften von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli* (*E.coli*)

E. coli wurden unter Schütteln bei 37°C über Nacht in LB-Medium kultiviert. Sofern *E. coli* mit einem Plasmid transformiert waren, wurde das Medium mit dem Antibiotikum entsprechend des Resistenzgens versetzt (Maniatis *et al.*, 1982). Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar (Gibco BRL, Eggenstein) hinzugefügt. Dabei wurden für Klonierungsarbeiten der *E. coli*-Stamm DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe), und für die Phagenaufnahme der *E. coli*-Stamm XL1-Blue

eingesetzt. Für die XL1-Blue-Zellen wurde das LB-Medium zusätzlich noch mit Maltose (Endkonzentration 0,2% w/v) und MgCl₂ (Endkonzentration 10 mM) versetzt.

LB-Medium:	10 g/l	Peptone
	10 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefeextrakt

2.2.1.2 Kultivierung von COS-7-Zellen

COS-7-Zellen (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA, Kat. Nr. CRL-1651) wurden in DMEM-*High Glucose* (PAA-Laboratories, Linz, Österreich) mit 10% FCS (PAA-Laboratories, Linz, Österreich) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zur Subkultivierung der Zellen wurden diese mit 1 x PBS gewaschen und für 5 min bei 37°C mit 0,05% Trypsin/EDTA (Seromed, Berlin) inkubiert. Die Trypsinierung wurde mit frischem Medium gestoppt und kleinere Mengen der Zellsuspension je nach Bedarf auf neue Kulturflaschen verteilt.

2.2.1.3 Isolierung von DNA

Da unterschiedliche Arten von DNA isoliert werden mussten, wurde je nach Art und erwünschter Menge der DNA nach unterschiedlichen Protokollen verfahren.

2.2.1.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA, kleiner Maßstab

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab erfolgte nach der *Rapid-Boiling*-Methode von Holmes und Quigley (1981).

2.2.1.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA, großer Maßstab

Für die Plasmidaufreinigung in großem Maßstab (50-200 µg) wurde das *Midi-* oder *Maxipräparations-Kit* von Qiagen (Hilden) verwendet.

2.2.1.3.3 Isolierung von Phagen-DNA

150 μ l einer über Nacht herangezogenen Kultur maltoseinduzierter (0,2% w/v) Bakterien XL1-Blue MRA wurden mit ca. 3×10^5 *plaque forming units* (pfu) Phagenklone und 100 μ l SM-Puffer versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3,5 ml TOP-Agarose wurde die Kultur auf Agarplatten ausplattiert und 8-14 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Phagen mit der TOP-Agarose in 3 ml SM-Puffer, 4 μ l Chloroform für 15 min geschüttelt und abgeschabt. Die Bakterienreste wurden durch Zentrifugation bei (10 min 10 000 x g) abgetrennt, der Überstand zur Zerstörung der bakteriellen Nukleinsäuren mit 1 μ l RNase A-Lösung und 1 μ l DNase-Lösung versetzt und 30 min inkubiert. Die Phagenanteile wurden durch Zugabe von einem Volumenanteil 20% (w/v) PEG 20 000, einem halben Volumenanteil 4 N NaCl, und Schütteln auf Eis über 1 h und anschließender Zentrifugation (10 min 10 000 x g, JA-20 Rotor) pelletiert. Das erhaltene Pellet wurde in 500 μ l TE-Puffer aufgenommen und die Phagen anschließend mit 1/100 Volumenanteil 10% (w/v) SDS, 1/500 Volumenanteil Proteinase K (10 mg/ml) 10 min bei 68°C lysiert. Die Salzkonzentration wurde mit 1/40 Volumenanteil 4 N NaCl erhöht, die Phagen-DNA mittels zweimaliger Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und mit 100% Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol vorsichtig gewaschen und anschließend in 100 μ l TE aufgenommen. Die Konzentration der Phagen-DNA wurde gemessen und diese anschließend mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen verdaut.

SM-Puffer:	20 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
TOP-Agarose:	7 g	Agarose/l LB-Medium
RNase A-Lösung:	10 mg/ml	RNase A
DNase I-Lösung:	10 mg/ml	DNase I
TE-Puffer:	40 mM	Tris-Acetat
	1 mM	EDTA

2.2.1.3.4 Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden mit 500 µl DNA-Lysepuffer 8-14 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Isopropanol wurde die DNA gefällt, an einem Glasstab aus der Zelllösung gehoben und in 200 µl destilliertem Wasser gelöst, wobei der Vorgang durch Schütteln bei 37°C unterstützt wurde.

DNA-Lysepuffer:	100 µg/ml	Proteinase K
	100 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	5 mM	EDTA
	0,2%	SDS
	200 mM	NaCl

2.2.1.3.5 Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Mit einem Skalpell wurde den Mäusen 0,5-1,0 cm der Spitze ihres Schwanzes abgeschnitten, und in 500 µl Lysispuffer mit 20 µl Proteinase K (20 mg/ml, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) überführt. Über Nacht wurde das Gewebe bei 56°C unter Schütteln gelöst, die DNA über Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt, mit 100% Isopropanol gefällt und an einem gebogenem Glashaken aufgenommen, zur Reinigung in 70% (v/v) Ethanol geschwenkt und in 200 µl TE aufgenommen.

Lysispuffer	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	100 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
	1%	SDS
TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA

2.2.1.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm photometrisch bestimmt.

2.2.1.4 Subklonierung von DNA

Um die isolierte DNA zu untersuchen, waren Subklonierungsschritte notwendig.

2.2.1.4.1 Eluierung der DNA aus Agarose

Nach einer elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarosegele wurden erwünschte Fragmente unter UV-Licht ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit Hilfe des *Jetsorb-Kit*[®] nach Angaben des Hersteller eluiert.

2.2.1.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Volumen von 10 µl bestehend aus 1 µl 6 mM ATP, 1 *unit* T4-Ligase, 1 µl Ligationspuffer, ca. 0,1 pmol Vektor und 0,3 pmol Fragment. Dieses wurde bei 16°C 8-14 h inkubiert und anschließend transformiert.

Ligationspuffer:	660 mM	Tris, pH 7,6
	100 mM	MgCl ₂
	150 mM	DTT
	10 mM	Spermidin

2.2.1.4.3 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock-Methode

Bei der Transformation wurden *E. coli* Zellen, die nach der Methode von Hanahan (1983) kompetent gemacht worden waren, eingesetzt. Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 100 µl Zelllösung mit 0,1 µg DNA versetzt und für 30 min auf Eis gelagert. Nach einer Inkubation bei 42°C für 90 sec wurde die Lösung wieder auf Eis gekühlt, mit 250 µl LB-Medium versetzt, 45 min bei 37°C inkubiert und dann auf Agaroseplatten mit dem entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Transformationseffizienz liegt mit dieser Methode bei etwa 2×10^8 bis 5×10^8 Kolonien pro µg DNA.

2.2.1.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxynukleotid-Methode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Dazu wurde das *Thermosequenase-Cycle-Sequencing-Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Die Auftrennung der Sequenzreaktion erfolgte in einem automatischem Sequenzierer (LI-COR, Lincoln, NE, USA) in einem 6% Harnstoffgel, bestehend aus folgenden Komponenten: 6% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, Amresco, Solon, USA), 7,3 M Harnstoff und 0,05% (w/v) APS in 0,5 x TBE, das mit 0,54 µl/ml TEMED polymerisiert wurde. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Die Sequenzreaktion erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers.

10 x TBE:	0,89 M	Tris-HCl, pH 7,5
	0,89 M	Borsäure
	25 mM	EDTA

Verwendete Sequenzierprimer:

Alle verwendeten Sequenzierprimer wurden 5'-IRD 800 markiert.

Zur Sequenzierung von *Inserts* im Vektor pGL3[®]-Basic:

pGL-Fw:	5'-GTG CAA GTG CAG GTG CCA G-3'
pGL-Rev:	5'-GTG TTC CAT GGT GGC TTT ACC-3'

Zur Vervollständigung der genomischen Sequenz von *Arfp1* im Bereich des 6. Introns:

Fw: ARP Int6F	5'-GTT TGT ATG AGG ATC GAG TCG-3'
Rv: ARP Int6R	5'-GAT CCT CAT AGA AAC CAG TGG-3'

Zur Sequenzierung von *Inserts* im Vektor pBlueskript[®] II-KS, und pUC18:

Hierfür wurden die gebräuchlichen *Primer* M13-Fw und M13-Rv verwendet.

2.2.1.6 Transiente Transfektion von COS-7-Zellen

Die transiente Transfektion der COS-7-Zellen wurde mit Hilfe des FuGene®-6 Systems (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Am Tag der Transfektion wurden pro Probe 3 Wells einer 6-Well-Kulturschale mit $1,2 \times 10^5$ Zellen in 2 ml Medium ausgesät und 0,75 µg aufzunehmende Plasmid-DNA mit 2,5 µl FuGene Reagenz eingesetzt.

2.2.2 Isolation genomischer Klone

Für die Charakterisierung des *Arfrp1*-Gens und für die Herstellung des *knockout*-Konstrukts von *Arfrp1* war es notwendig, die genomische DNA des *Arfrp1*-Gens der Maus zu isolieren. Eine Möglichkeit genomische DNA zu isolieren besteht darin, genomische Klone einer *Library* zu isolieren. Diese wurden fragmentiert, um sie danach weiter zu verwenden.

2.2.2.1 Screening der λ-Fix-Phagen-Library

Um die genomische DNA des *Arfrp1*-Gens der Maus zu isolieren, wurde eine λ-Fix® II-Bibliothek des Mausstammes 129/SvJ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet. Dabei wurden *E. coli* XL1-Blue MRA-Zellen mit Bakteriophagen infiziert, die Fragmente der genomischen Sequenz der Maus enthalten. Zunächst wurden diese Bakterien in LB-Medium über Nacht kultiviert. 100 µl dieser Kultur wurden mit 50 ml LB-Medium, 10 mM MgCl₂ und 0,2% (w/v) Maltose versetzt. Die Bindung von Maltose an seinen Rezeptor induziert die Expression des Lam B Proteins. Lam B ist Bestandteil der Bakterienmembran und dient dem Bakteriophagen zur Adhäsion an die Zellmembran. Nach einer Inkubation von 4 h wurden ca. 4×10^5 pfu der Phagen hinzugegeben, für weitere 30 min inkubiert und auf 22 x 22 cm großen Platten mit 50 ml TOP-Agarose ausplattiert. Die anschließende Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Um die Phagen auf eine geeignete Matrix zu transferieren, wurden zwei Nylonmembranen (Nylon

Hybond N⁺ Filter, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für 2 min bzw. 5 min auf die TOP-Agarose gelegt. Anschließend wurden die Membranen je 5 min in Denaturierungslösung, Neutralisierungslösung und 2 x SSC gewaschen, bei 80°C getrocknet und fixiert. Die Filter wurden mit markierten Sonden hybridisiert und die entstandenen Signale auf den Film den Phagen zugeordnet. Für weitere *Screening*-Runden wurden Phagen aus den Platten vorausgegangener Runden ausgestochen, Verdünnungen (10^{-5} - 10^{-8} pfu) hergestellt, und erneut auf kleineren Platten (Durchmesser 90 mm) in entsprechend kleinerem Volumen ausplattiert. Nach 5-6 Runden war es möglich, Einzelplaques auszustechen und die DNA dieser Phagen aufzureinigen.

20 x SSC:	3 M	NaCl
	0,3 M	Na ₃ Citrat
Denaturierungslösung:	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
Neutralisierungslösung:	0,5 M	Tris-HCl, pH 7,2
	1,5 M	NaCl

2.2.2.2 *Shotgun*-Methode zur Fragmentierung von DNA

20 µg der zu fragmentierenden DNA wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß in 20 µl TE 1-3 x für 30 sec mit maximaler Intensität beschallt (Branson Sonifier 450, Danbury, CT, USA). Fragmente von 600-1200 bp wurden in einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt, eluiert und mit Hilfe des *Sure Clone Kits*[®] in den pUC 18 Vektor kloniert.

2.2.2.3 PCR (*Polymerase Chain Reaktion*)

Die Methode der PCR wurde angewendet, um spezifische DNA-Fragmente zu amplifizieren bzw. zu mutieren. Dabei wurden je nach verwendetem *Primer*, Herkunft der DNA und Größe des erwünschten Fragments die optimalen Reaktionsbedingungen empirisch ermittelt. Im Allgemeinen wurde folgender Ansatz gewählt: 50 pmol *Primer*, 10 ng cDNA, 10 bis 20 ng Plasmid-DNA oder 20 bis 40 ng genomische DNA, 1 *unit* Taq-Polymerase (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim), 200 µM dNTP's, 10 µl 10 x PCR-

Puffer mit Mg²⁺ (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) ad 100 µl mit destilliertem Wasser.

Allgemeines Reaktionsschema:

1 x	5 min	95°C	Initiale Denaturierung
30 x	1 min	94°C	Denaturierung
	1 min	T _a ¹ (entsprechend dem Primer)	Primer-Anlagerung
	2 min	72°C	Primer Verlängerung
1 x	6 min	72°C	Finale Verlängerung

Verwendete Primer:

Herstellung der 5' UTR Sonde für das *Screening* der λ-Fix *Library*:

Fw: VARP5U-AM 5'-TGA AGG GGT CAA CGT GAG-3'

Rv: RARP5U-AM 5'-CAT CCT GTT TGG CAC CC-3'

35 Zyklen, T_a: 55°C auf Rattentestis cDNA-Library

Amplifikation der Neomycinresistenz-Kassette zur weiteren Klonierung:

Fw: NeoF 5'-CAG TGA ATT CTC GAG CAG TG-3'

Rv: NeoR 5'-CCA TGA TAT CGC CAA GCT TG-3'

Herstellung einer Sonde für die Genotypisierung von ES-Zellen und Mäusen im Bereich des 4. Introns von *Arfrp1*:

Fw: ARPINT4-F 5'-GCA AAA GGA ACC TGG AAC TG-3'

Rv: ARPINT4-R 5'-CTG AAA GTG CTC AAC TCA GG-3'

35 Zyklen, T_a: 54°C auf 5,6 kb Fragment des *Arfrp1-Gens* in pGL3[®]-Basic

¹ T_a: *Annealing*temperatur

2.2.2.4 Southern-Blot-Analyse

Die *Southern-Blot*-Analyse stellt eine klassische Methode dar, um spezifische DNA-Sequenzen, die über Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt wurden, über radioaktive Hybridisierung zu detektieren. Nukleinsäurefragmente wurden über ein Agarose-Gel aufgetrennt und mittels *Kapillarblotting* auf eine Nylonmembran (Nylon Hybond N⁺ Filter, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) übertragen (Southern, 1975). Als *Blotting*puffer wurde 4 N NaOH verwendet. Die Nylonmembran wurde nach dem *Blotting* in 2 x SSC gewaschen, die DNA durch Backen bei 80°C für 2 h fixiert.

2.2.2.4.1 Gel-Elektrophorese von DNA

Für die Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten wurden diese in 20 µl mit 5 µl Probenpuffer auf 0,7 bis 2% Agarosegele (w/v) (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden) in TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid beladen. Als Größenstandards wurden 100 bp und 1 kb Leitern verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100 V.

Probenpuffer:	60% (v/v)	Glycerin, wasserfrei
	0,25% (w/v)	Orange G
	200 mM	Tris-Acetat, pH 8,0
	5 mM	EDTA

2.2.2.4.2 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Die Herstellung radioaktiv markierter Sonden erfolgte nach der *Random-Primer-Labeling*-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983). 50-100 ng DNA wurden mit 1-1,5 µg eines Gemisches statistischer Hexanukleotid-*Primer* (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden) 5 min bei 95°C denaturiert und 5 min auf Eis gekühlt. Durch Zusatz von 25 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 2 *units* Klenow-Fragment in einem Gesamtvolumen von 20 µl 1 x OLB und Inkubation über 1-2 h bei 37°C wurde die radioaktive Markierung der Zweitstrangsynthese gestartet. Die Reaktion wurde durch die Fällung mit dem 0,33-fachen Volumen TE, 7,5 M

Ammoniumacetat, 10 µg Heringssperma-DNA und dem 0,66-fachen Volumen absolutem Ethanol gestoppt, 30 min bei -80°C gefällt, und bei 13 000 x g zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in 200 µl TE aufgenommen und die Aktivität der Sonde im Szintillationszähler bestimmt.

5x OLB:	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,9
	0,1 M	MgSO ₄
	1 mM	DTT
	je 0,6 mM	dATP, dGTP, dTTP

2.2.2.4.3 Hybridisierung von an Nylonmembran gebundenen Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Sonden

Um eine unspezifische Bindung der radioaktiven Nukleinsäuren zu verhindern, wurde die Nylonmembran je nach Größe mit 5-20 ml Prähybridisierungspuffer in einer Glasröhre 1 h bei 42°C in einem Hybridisierungssofen (Biometra, Göttingen) inkubiert. Der Puffer wurde dann entfernt und die (vorher über 5 min bei 95°C denaturierte) radioaktive DNA-Sonde in einer entsprechenden Menge Prähybridisierungspuffer zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte 8-14 h bei 42°C . Anschließend wurde die Sonde abgenommen und der Filter gewaschen. Je nach gewünschter Stringenz wurden unterschiedliche Waschbedingungen gewählt. Ein *Southern-Blot* mit genomischer Maus-DNA zur Genotypisierung der Mäuse wurde beispielsweise 2 x mit 0,8 x SSC/0,1% SDS für 30 min bei 55°C , und anschließend 2 x mit 0,2 x SSC/0,1% SDS für 30 min bei 55°C gewaschen.

Prähybridisierungspuffer:	50% (v/v)	Formamid
	600 mM	NaCl
	40 mM	NaH ₂ PO ₄
	4 mM	EDTA
	0,1% (w/v)	BSA
	0,1% (w/v)	PVP
	0,1% (w/v)	Ficoll
	0,5% (w/v)	SDS

2.2.3 Untersuchung des Promotorbereiches von *Arfrp1*

Der Promotorbereich von *Arfrp1* wurde untersucht, um die Proteine zu identifizieren, die die Transkription von *Arfrp1* kontrollieren. Dazu wurden Deletionsmutanten mit Hilfe der Endonuclease III und Punktmutationen mit Hilfe der PCR hergestellt und in einem Luciferase Assay untersucht. Im Anschluss wurden Sequenzbereiche des Promotors in einem *Electro-Mobility-Shift-Assay* untersucht.

2.2.3.1 Herstellung von Mutationen im 5'-flankierenden Bereich des *Arfrp1*-Gens

Zur Identifizierung des *Arfrp1*-Promotors und mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurde der 5'-flankierende Bereich des *Arfrp1*-Gens deletiert und die *Core*-Sequenz putativer Transkriptionsfaktorbindungsstellen mutiert.

2.2.3.1.1 Herstellung der Deletionsmutanten mit Hilfe der Endonuclease III

Deletionsmutanten des Promotors von *Arfrp1* wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Dieses Verfahrens basiert darauf, dass nach Erzeugung entsprechender Überhänge durch Restriktionsenzyme, hier *Xho* I und *Kpn* I, ein 3'-überhängender DNA-Strang mit der Endonuclease III abgedaut wird und anschließend der übrige Einzelstrang bis zur doppelsträngigen DNA mit der S1-Nuclease abgedaut wird. 10 µg des Promotorbereichs von *Arfrp1* wurde aus dem Vektor pGL3-Basic[®] mit den oben genannten Enzymen geschnitten. Nach einer Ethanol-fällung und anschließender Zentrifugation wurde das DNA-Pellet in 60 µl EN III Puffer aufgenommen und mit 150 *units* Endonuclease III versetzt. Alle 30 sec wurden 2,5 µl der Lösung entnommen, und die Reaktion durch Zugabe von eiskaltem 7,5 µl S1-Reaktionsmix gestoppt. Die S1-Nuclease wurde durch eine Inkubation der Lösung bei 30°C aktiviert. Anschließend wurde durch die Zugabe von 1,0 µl S1-Stop-Puffer und Inkubation bei 70°C die Aktivität des Enzyms gestoppt. Die deletierten DNA-Stränge

wurden über eine Agarose-Gel Elektrophorese aufgetrennt, aus der Agarose eluiert und erneut in den Vektor pGL3-Basic[®] kloniert.

10 x EN III Puffer:	0,66 M 66 mM 1 mM	Tris-HCl, pH 8,0 MgCl ₂ KCl
S1-Reaktionsmix:	172 µl 27 µl 60 <i>units</i>	H ₂ O 10 x S1-Puffer S1-Nuclease
10 x S1-Puffer:	5 ml 1,1 ml 5,0 ml 20 ml	5 M NaCl 3 M K-Acetat, pH 4,5 Glycerol 1 M ZnSO ₄
S1-Stop-Puffer:	0,3 M 50 mM	Tris-Base EDTA, pH 8,0

2.2.3.1.2 Herstellung von Mutationen im Promotor von *Arfrp1*

Um spezifische Mutationen in den zuvor ermittelten Bindungsstellen potenzieller Transkriptionsfaktoren im Promotor von *Arfrp1* herzustellen, wurde folgende PCR-Strategie angewandt.

Als Ausgangstemplate diente der Wildtyp-Promotor von *Arfrp1* (-118 / +112) im pGL3-Basic[®]-Vektor. Hierauf wurden zwei PCR's durchgeführt, wobei die Mutation in der ersten PCR in den *forward Primer* und in der zweiten PCR in den *reverse Primer* eingebracht wurde. Die verwendeten *Primer*-Kombinationen stellen sich wie folgt dar:

PCR 1:

Forward Primer: Mut-pGL3-F

Reverse Primer: MutArpNfKBr oder MutArpCreIr oder MutArpCetr oder ArpEtsMutr

PCR 2:

Forward Primer: MtuArpNfKBf oder MutArpCreIf oder MutArpCetf oder ArpEtsMutf

Reverse Primer: Mut-pGL3-R

Die Produkte dieser beiden PCR`s wurden in einer weiteren PCR wiederum als *Template* eingesetzt. Dabei wurden die *Primer* Mut-pGL3-F und Mut-pGL3-R verwendet. Das Produkt dieser PCR bestand aus dem *Insert* mit der eingebrachten Mutation sowie aus Überhängen, die die *Multi-Cloning-Site* enthalten. Dieses Produkt wurde mit Hilfe des Klenow-Fragments *gebluntet*, in die *Sma* I Schnittstelle des pGL3-Basic[®]-Vektor kloniert, um eine ausreichende Menge des mutierten DNA-Fragments zu erhalten.

Um die mutierte DNA in der richtigen Orientierung mit dem Luciferase-Gen zu fusionieren, wurde sie mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Bgl* II geschnitten in den pGL3-Basic[®]-Vektor ligiert.

Folgende Primer wurden zur Herstellung der Mutationen verwendet:

a.) Mutation der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors NfκB:

Fw: MutArpNfKBf 5'-CTC CGC CAT ATA CTT CCG CC-3'

Rv: MutArpNfKBr 5'-GGC GGA AGT ATA TGG CGG AG-3'

b.) Mutation der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors cRel:

Fw: MutArpCreff 5'-CGG GCA CAA TAG CCG GAG AG-3'

Rv: MutArpCrelr 5'-CTC TCC GGC TAT TGT GCC CG-3'

c.) Mutation der ersten Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors cEts1:

Fw: MutArpCetf 5'-GCA CTT CCG CAT TCG AGC CG-3'

Rv: MutArpCetr 5'-CGG CTC GAA TGC GGA AGT GC-3'

d.) Mutation der zweiten Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors cEts1

Fw: ArpEtsMutf 5'-GAA GCT GCA ATT ATT AGT ACC TG-3'

Rv: ArpEtsMutr 5'-CAG GTA CTA ATT GCA GCT TC-3'

e.) Vektor*primer* für die Mutationen:

Fw: Mut-pGL3-F 5'-CCC ATT CGC CAT TCA GGC TG-3'

Rv: Mut-pGL3-R 5'-CAG CGT AAG TGA TGT CCA CC-3'

Für alle Mutationen wurden dieselben Bedingungen gewählt:

35 Zyklen, T_a: 60°C

2.2.3.2 Luciferase-Assay

Zur Identifizierung des *Arfrp1*-Promotors wurden 118 bp über PCR oder durch Deletion mit der Endonuclease III untersucht und in den pGL3[®]-Basic-Vektor kloniert. Die zu untersuchenden Plasmid-DNA-Konstrukte wurden gemeinsam mit einem für β -Gal kodierenden Kontrollvektor wie unter 2.2.1.6 beschrieben mit FuGene[®] 6 Reagenz co-transfiziert. Mit diesem β -Gal Kontrollvektor (pSVL- β -Gal) lässt sich durch Messung der β -Galaktosidase-Aktivität die Transfektionseffizienz bestimmen. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 100 μ l 1 x *Reporter Lysis Buffer* versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Das Protein-Lysat wurde 30 sec bei 14 000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand zur Messung abgenommen. Zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden 83,3 ml β -Gal-Mix mit 16,6 μ l ONPG-Lösung (1 mg/ml 2-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und 2 μ l Protein-Lysat bei 37°C 15 min inkubiert und die Farbveränderung photometrisch bei 420 nm bestimmt. Mit folgender Formel konnte die Aktivität dann berechnet werden:

$$\beta\text{-Gal.-Aktivität} = \frac{\text{OD}_{420} \times 6000}{\text{Inkubationszeit (min)}}$$

(Quelle: *Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer* (Promega, Madison, USA))

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit 20 μ l des Protein-Lysats, 100 μ l des Substrats Luciferin durch Messung im Luminometer LB 9507 (EG & G Berthold, Bad Wildbad) für 10 sec. Der gemessene Wert des Luminometers wurde dann auf die Transfektionseffizienz bezogen:

$$\text{Luciferase-Aktivität} = \frac{\text{Wert des Luminometers}}{\beta\text{-Gal.-Aktivität}}$$

(Quelle: *Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer* (Promega, Madison, USA))

Die Promotorregion des zu untersuchenden genomischen DNA-Bereichs kontrolliert die Expression der Luciferase im pGL3-Basic[®] Vektor. Die bestimmte Luciferase-Aktivität entspricht damit der Promotoraktivität des zu untersuchenden Bereichs.

β-Gal-Mix:	60 mM	Na ₂ HPO ₄
	40 mM	NaH ₂ PO ₄
	1 mM	KCl
	1 mM	MgCl ₂

2.2.3.3 Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)

Electrophoretic-Mobility-Shift-Assays dienen dem Nachweis DNA-bindender Proteine, beispielsweise Transkriptionsfaktoren. Der Nachweis beruht auf einem veränderten Laufverhalten von Protein-DNA-Komplexen im Vergleich zur reinen DNA in einer Gelelektrophorese. Bei einem *Supershift* wird das Laufverhalten zusätzlich durch die Zugabe eines Antikörpers verändert, indem sich ein Antikörper-Protein-DNA-Komplex bildet.

2.2.3.3.1 Präparation der Kernextrakte aus COS-7-Zellen

Die Kernextraktion aus COS-7-Zellen wurde nach der Methode von Sadowski *et al.* (1989) durchgeführt. Dazu wurden konfluent gewachsene Zellen nach folgendem Schema gewaschen: 1 x mit PBS, 1 x mit 5 ml PBS/ 1 mM Na₃VO₄/ 5 mM NaF und 1 x mit *Hypotonic-Buffer*. Die Zellen wurden dann in 500 µl *Hypotonic* + NP40 abgerubbert, und in Mikoreagenzgefäße überführt. Die Überstände mit Membranen und Zytosol wurden nach Zentrifugation (20 sec, 14 000 rpm, JA-20 Rotor) verworfen und das Pellet mit Zellkernen in 150 µl *Hightsalt Buffer* resuspendiert und 30 min inkubiert. Durch den *Hightsalt Buffer* wurden die Kerne zerstört und die Kernproteine in Lösung gebracht. Die Zellfragmente werden anschließend durch Zentrifugation (20 min, 14 000 rpm, JA-20 Rotor) entfernt. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

PBS-Puffer:	140 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	8 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
<i>Highsalt Buffer:</i>	1 x	<i>Highsalt normal</i>
	20 mM	NaF
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	Na-Pyrophosphat
	1 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF
	1 µg/ml	Aprotinin
	1 µg/ml	Leupeptin
	1 µg/ml	Pepstatin
2 x <i>Highsalt normal:</i>	840 mM	NaCl
	40 mM	HEPES, pH 7,9
	2 mM	EDTA
	2 mM	EGTA
	20%	Glycerol
2 x <i>Hypotonic Buffer:</i>	40 mM	HEPES, pH 7,9
	2 mM	EDTA
	2 mM	EGTA
<i>Hypotonic normal:</i>	1 x	<i>Hypotonic Buffer</i>
	20 mM	NaF
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	Na-Pyrophosphat
	1 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF
	1 µg/ml	Aprotinin
	1 µg /ml	Leupeptin
	1 µg/ml	Pepstatin
<i>Hypotonic + NP40:</i>	0,2% (v/v)	NP-40
	in	<i>Hypotonic normal</i>

2.2.3.3.2 Eingesetzte Oligonukleotide und deren radioaktive Markierung

Im Gegensatz zu radioaktiv markierten Sonden werden Oligonukleotide für einen EMSA nach der *End-Labeling* Methode markiert. Die Oligonukleotide sind so konstruiert, dass sie nach Erhitzen auf 95°C und sehr langsamem Abkühlen doppelsträngig wurden, und dabei 3'-Überhänge entstehen. Ca. 3 pmol dieser DNA wurden in einem Endvolumen von 40 µl 1 x EMSA-OLB mit 50 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-dTTP und 5 *units* Klenow-

Fragment für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert, damit die überhängenden Enden aufgefüllt und markiert wurden. Nach Abschluss der Markierungsreaktion wurde die radioaktive Oligonukleotid-DNA über eine Säule aus dem *QIAquick Nucleotide Removal Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 100 μ l Wasser aufgenommen. Die Aktivität der Oligonukleotide wurde in einem Szintillationszähler gemessen und auf ca. 50 000 cpm/ μ l eingestellt.

5x EMSA-OLB:	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,9
	0,1 M	MgSO ₄
	1 mM	DTT
	je 0,6 mM	dATP, dGTP, dCTP

EMSA Gel (4,5% Polyacrylamid/Glycerin Gel):		
6,75 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 40%, 19:1	
1,5 ml	10 x TBE	
49,25 ml	H ₂ O	
2 ml	87% Glycerin	
40 ml	TEMED	
400 ml	10% APS (w/v)	

5 x Gelshift <i>Buffer</i> (GSB):	50 mM	HEPES pH 7,8
	5 mM	EDTA
	25 mM	MgCl ₂
	50%	Glycerin

Das Gel wurde bei 180 V für 30 min einem Vorlauf unterzogen, um das ungebundene APS herauslaufen zu lassen. 9,5 µl Kernextrakte (1µg/µl) wurden pro Probe vorgelegt, mit 9,5 µl EMSA-*Cocktail* gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Gemisch wurde dann mit 1 µl radioaktiver Oligonukleotid-DNA (50 000 cpm) versetzt. Für einen *Supershift* durchgeführt wurde die Proteinlösung zunächst 1 h mit 2 µl Antikörper inkubiert und dann die radioaktive DNA zugegeben. Die Elektrophorese wurde bei 180 V in 0,25 x TBE durchgeführt, das Gel in 10% Methanol/10% Essigsäure fixiert, auf einem Geltrockner getrocknet und ein Autoradiogramm hergestellt.

EMSA- <i>Cocktail</i> :	4 µl	5 x GSB
	0,1 µl	DTT (1 M in H ₂ O)
	1 µl	PolydIdC (1 mg/ml in TE, pH 8,0)
	2 µl	BSA, acetylated (10 mg/ml, Promega)
	2,33 µl	H ₂ O
	0,2 µl	PMSF (200 mM in Ethanol)

Verwendete Oligonukleotid-Sequenzen:

„Sonde A“. Die unterstrichenen Bereiche stellen Mutationen dar:

ArpGS2373f:	5'-TAG CCT TCT GCC CTC CGC CGG GCA CTT CCG CCG GAG-3'
ArpGS2400r:	5'-GGC TCT CCG GCG GAA GTG CCC GGC GGA GGG CAG AAG-3'
ArpGS1M2f:	5'-TAG CCT TCT GCC CTC CGC CGG GCA <u>CAA TAG</u> CCG GAG-3'
ArpGS1M2r:	5'-GGC TCT CCG <u>GCT ATT</u> GTG CCC GGC GGA GGG CAG AAG-3'
ArpGS1M3f:	5'-TAG CCT TCT GCC CTC CGC CGG GCA CTT CCG <u>CAT TCG</u> -3'
ArpGS1M3r:	5'-GGC <u>TCG AAT</u> GCG GAA GTG CCC GGC GGA GGG CAG AAG-3'

„Sonde B“. Die unterstrichenen Bereiche stellen Mutationen dar:

ArpGS2405f:	5'-AGC TGC CGG AAG TAC CTG CGC GCG GGG-3'
ArpGS2436r:	5'-GCG GCC CCG CGC GCA GGT ACT TCC GGC-3'
GS2-M4-f:	5'-AGC TGC <u>AAT TAG</u> TAC CTG CGC GCG GGG-3'
GS2-M4-r:	5'-GCG GCC CCG CGC GCA GGT ACT <u>AAT TGC</u> -3'

2.2.4 Herstellung der *Arfrp1*-Knockout-Mäuse

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit den *Knockout*-Mäusen wurden in enger Zusammenarbeit mit Dr. Markus Moser (Institut für Pathologie, RWTH-Aachen) und Dr. Reinhard Kluge (Institut für Versuchstierkunde, RWTH-Aachen) durchgeführt. Die *Arfrp1*-*Knockout*-Maus wurde hergestellt, um Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des Gens zu ziehen.

2.2.4.1 Herstellung des *Arfrp1*-Knockout-Konstrukts

Um das *Knockout*-Konstrukt von *Arfrp1* herzustellen war es nötig, ein Konstrukt mit einem größerem Abschnitt des *Arfrp1*-Gens zu klonieren, in dem dann ein wesentlicher Bereich des Gens durch eine Neomycinresistenz-Kassette ersetzt wurde. Die Neomycinresistenz-Kassette sollte zwischen zwei dem Zielgen homologen DNA-Bereichen liegen. Je größer die Abschnitte flankierender DNA sind, desto größer ist die

Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination. Außerdem muss das Konstrukt in einem linearisierbaren Vektor vorliegen.

Der Vektor mit der Neomycinresistenz-Kassette wurde freundlicherweise von Dr. Saftig (Institut für Biochemie II, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung des Zielkonstrukts wurde dieser mit dem Restriktionsenzym Sal I linearisiert, die überhängenden Enden durch Behandlung mit Klenow-Fragment abgedaut und im Anschluss mit *Ava* I vom Vektor getrennt. Aus der Phagenbank wurde ein ca. 5,6 kb großer Bereich des *Arfrp1*-Gens isoliert und in den pGEM[®]-5Zf(+) Vektor kloniert. Dieser Genabschnitt enthält den 5'-untranslatierten Bereich, das Exon 2 mit dem Startcodon sowie Exon 3 und 4 des *Arfrp1*-Gens. So war es möglich, die Exons 2 und 3 mit den Restriktionsenzymen *Rsr* II (Schnittstelle bei 3019 bp) und *Avr* II (Schnittstelle bei 3604 bp) folgendermaßen auszuschneiden: Mit *Avr* II wurde geschnitten und die überhängenden Enden mit Klenow-Fragment abgedaut, danach wurde mit *Rsr* II geschnitten. Da *Rsr* II und *Ava* I kompatible Enden besitzen, war es nun möglich, die Neomycinresistenz-Kassette gerichtet einzuklonieren.

2.2.4.2 Kultivierung der embryonalen Stammzellen

Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind Zellen, die aus der inneren Zellmasse (ICM) sehr früher Embryonalstadien gewonnen werden. Verwendet wurde die ES-Zelllinie R1, die sich aus den frühen männlichen Embryos des Mausstammes 129/SvJ ableitet. ES-Zellen sind totipotent, das bedeutet, dass eine ungewollte Differenzierung in spezifische Zelltypen möglich ist. Um dieses zu verhindern, wurden Kulturen auf embryonalen *Feeder*-Zellen gezüchtet. *Feeder*-Zellen sezernieren LIF und andere Wachstumsfaktoren, die eine Differenzierung verhindern. Die Zellen wurden jeden zweiten Tag passagiert und erhielten täglich frisches Medium.

ES-Medium:	2 mM	L-Glutamat
	5 ml	100 x nicht essentielle Aminosäuren
	1000 U/ml	LIF (Gibco BRL [®] , Eggenstein)
	in DMEM <i>High Glucose</i> /Na-pyruvate	

2.2.4.3 Feeder-Zellen-Herstellung und Gewinnung

Embryonale *Feeder*-Zellen sind eine Mischpopulation aus Rumpfzellen eines 13-14 Tage alten Embryos, ohne Darm, Leber, Nieren und Milz, mit einem Hauptanteil an embryonalen Fibroblasten. Gewonnen wurden die *Feeder*zellen von Müttern, die mit einem Kollagen-9^{-/-} Männchen, das auf beiden Allelen ein Neomycinresistenz-Gen besitzt, gekreuzt wurden. Die Antibiotikaresistenz ist notwendig, da bei der Kultivierung der ES-Zellen zur Selektion der homolog rekombinierten Stammzellen Neomycin, bzw. Geneticin 418 (G418) als Selektionsmarker verwendet wurde. Die Embryos wurden unter sterilen Bedingungen präpariert, zerteilt und trypsinisiert. Die Trypsinierung wurde durch die Zugabe von Medium gestoppt, die Zellen zentrifugiert (5 min bei 1000 rpm in einer Tischzentrifuge), in frisches 10% FCS haltiges DMEM-Medium aufgenommen und auf je 2 Kulturflaschen verteilt. Nach 3 Tagen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Röntgenstrahlen behandelt, um die Zellen im Wachstum zu arretieren. Im Anschluss wurden Gefrierkulturen hergestellt.

2.2.4.4 Elektroporation der ES-Zellen mit dem *Knockout*-Vektor

Der *Knockout*-Vektor wurde durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *Not I* linearisiert und durch eine Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt. 100 µg dieser DNA wurden mit Ethanol gefällt und bei -20°C bis zur Elektroporation aufbewahrt. Durch 15 min Zentrifugation bei 4°C und 21 000 x g wurde das Konstrukt pelletiert und in 1 ml PBS aufgenommen. ES-Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert, trypsinisiert und nach erneuter Zentrifugation wurden 10⁷ Zellen in einer Elektroporationsküvette mit 15 µg DNA versetzt. Die Elektroporation fand in einem Bio-Rad *Gene Pulser*[®] II-Elektroporator bei 0,8 kV und 3 µF statt. Anschließend wurden die Zellen in ES-Medium aufgenommen und auf 8 Kulturschalen mit *Feeder*-Zellen verteilt.

2.2.4.5 Nachweis des deletierten *Arfrp1*-Allels in ES-Zellen und Genotypisierung der Mäuse

Um die Mutation der *Arfrp1*-Allele zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Methoden, PCR und *Southern-Blot*-Analyse, angewendet (siehe Kap. 2.2.2.3 und 2.2.2.4).

Für die Genotypisierung mittels PCR wurden folgende *Primer* verwendet. Abb. 21 gibt dabei eine schematische Übersicht der Lage der *Primer*:

Fw: NEO-400-KO (B1)	5'-CGA GGA TCT CGT CGT GCC C-3'
Fw: ARP-200-KO (A1)	5'-GGT CCA CAA CCC AGC TGA C-3'
Rv: KO-ARP-R (C1)	5'-CCC AAA ACA TGA GAC GAG CCT TCC-3'
Fw: NestNeo400KO (B2)	5'-GCC TGC TTG CCG AAT ATC ATG-3'
Fw: NestArp200KO (A2)	5'-CAG CTG ACC AGT GGT CAA AAC-3'
Rv: NestKOArprev (C2)	5'-CAC AGT GCC AAC TGG AAA GAG-3'

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

30-40 Zyklen, T_a : 58°-60°C auf 20 ng genomischen DNA.

Bei der Genotypisierung von Nachkommen heterozygoter Eltern wurden die Primer A1, B1 und C1 im Verhältnis 1:1:1 in einer PCR eingesetzt, um in einem Schritt zwischen Wildtyp-Tiere (200 bp großes PCR-Fragment), heterozygoten Tieren (200 bp großes PCR-Fragment und 400 bp großes PCR-Fragment) und *Knockout*-Tieren zu unterscheiden (400 bp großes PCR-Fragment).

Für die Genotypisierung mittels *Southern-Blot*-Analyse wurde wie in Kap. 2.2.2.3 beschrieben eine Sonde im Bereich des vierten Introns (bp 3092-3472) von *Arfrp1* hergestellt. Nach Inkubation von ca. 20 µg DNA mit dem Restriktionsenzym *Stu* I über Nacht und der Auftrennung in einem 0,8% Agarosegel erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran, die mit der Int4-Sonde hybridisiert wurde.

2.2.4.6 Selektion der Neomycinresistenten ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden in ES-Medium mit 400 µg/ml Geneticin 418 (G418) so lange kultiviert, bis Zellen, die nicht antibiotikaresistent waren, starben (ca. 5 Tage). Nach insgesamt 8 Tagen konnten 288 resistente Klone mit einer Pipette in 24-Well-Multischalen überführt werden. Pro *Well* war 1 ml G418-haltigem Medium in denen *Feederzellen* wuchsen vorgelegt. Nach etwa 3-5 Tagen wurden die Klone trypsiniert und jeweils 80% eines Klons in 10% DMSO eingefroren, die übrigen 20% wurden für die DNA Präparation weiter kultiviert. Durch *Southern-Blot-Analyse* konnten dann Klone mit homologer Rekombination identifiziert werden.

ES-Gefriermedium:	70% (v/v)	DMEM <i>High Glucose</i> /Na-puruvate
	20% (v/v)	FCS
	10% (w/v)	DMSO

2.2.4.7 Injektion und Transfer von ES-Zellen in die Blastozysten

Uteri von C57/B6 Mäusen wurden 2,5 Tage *post conceptionem* präpariert und die Blastozysten mit Hilfe einer Spritze mit M2-Medium herausgespült. Zu diesem Differenzierungszeitpunkt besaßen die Blastozysten noch ihre vollständige *Zona pellucida* und es erfolgte noch keine Nidation. Stammzellklone, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hatte, wurden trypsiniert, in wenig ES-Medium aufgenommen und mittels einer Glaskapillare unter mikroskopischer Betrachtung in das Blastozoel injiziert. Durch die Injektion kollabierten die Blastozysten, und die ES-Zellen vermischten sich mit den Embryonalzellen der Blastozyste. Nach wenigen Stunden erfolgte der Transfer der chimären Embryos in scheinchwangere C57/B6 Weibchen. Diese wurden 3 Tage vor dem geplanten Transfer mit vasktomierten Männchen gepaart und *gepluggte* Weibchen dann für den Transfer eingesetzt. Die scheinchwangeren Weibchen wurden betäubt, ein kleiner Schnitt wurde am Rücken zwischen Rippen und Hüfte in der Höhe des Ovars durchgeführt, und der Uterus wurde am Fettpolster des Ovars leicht herausgezogen. Mit einer Nadel wurde die Uteruswand geöffnet und die Blastozysten mit einer Glaskapillare in den Uterus transferiert. Der

Schnitt wurde genäht und mit einer Klammer geschlossen. Nach etwa 18 Tagen wurden die chimären Mäuse geboren. Der Chimärismus konnte nach wenigen Tagen am Verhältnis von brauner (129/SvJ) und schwarzer (C57/B6) Fellfärbung geschätzt werden.

M2-Medium:	94,66 mM	NaCl
	4,8 mM	KCl
	1,71 mM	CaCl x 2 H ₂ O
	1,19 M	KH ₂ PO ₄
	1,19 M	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	4,15 mM	NaHCO ₃
	20,85 mM	HEPES
	23,28 mM	Na-Laktat
	0,33 mM	Na-Pyruvat
	5,56 mM	Glucose

2.2.4.8 Zucht der *Arfrp1-Knockout*-Mäuse

Chimäre Mäuse wurden entweder mit 129/SvJ oder mit C57/B6 gekreuzt, um *Arfrp1*^{+/-}-Tiere zu erhalten. Diese für das Merkmal heterozygoten Tiere wurden untereinander gekreuzt, um auch homozygote Tiere zu erhalten.

2.2.5 Untersuchung des Phänotyps der *Arfrp1*-Mutanten

Um die physiologische Funktion des *Arfrp1*-Gens aufzuklären, wurde der Phänotyp der *Arfrp1*-Mutanten untersucht.

2.2.5.1 Northern-Blot-Analyse

Die *Northern-Blot*-Analyse stellt eine klassische Methode dar, um RNA zu detektieren. Dabei wird RNA nach einer Gel-Elektrophorese aufgetrennt und spezifische RNA durch radioaktive Markierung detektiert.

2.2.5.1.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben der Maus

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Leber, Niere und Hoden der Maus wurden 0,2-0,5 g der Gewebe in 8 ml 4 M Guanidiniumthiocyanat(GTC)-Lösung mit 540 μ l β -Mercaptoethanol gegeben und in einem Ultraturax homogenisiert. GTC, eines der stärksten denaturierenden Salze, wirkte dabei als Inhibitor von Ribonukleasen. Nach Zugabe von 40 μ l 10%-N-Lauroyl-Sarcosin wurde für 10 min bei 10 000 rpm (JA-20 Rotor) zentrifugiert und der Überstand vorsichtig auf ein CsCl-Kissen (3 ml 5,7 M CsCl mit 1,5 μ l β -Mercaptoethanol) pipettiert. Die Proben wurden mindestens 22 h (bei 33 000 rpm, SW-40 Rotor) bei 20°C ultrazentrifugiert und der Überstand abgehoben. Das Pellet wurde vorsichtig mit 70% Ethanol gewaschen, über Eis getrocknet und die RNA in 300 μ l DEPC-Wasser resuspendiert.

DEPC-Wasser: 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat
Die Lösung wurde nach intensivem Rühren autoklaviert.

2.2.5.1.2 Agarose-Gel-Elektrophorese von RNA unter denaturierenden Bedingungen

Um die Bildung von Sekundärstrukturen innerhalb der RNA zu vermeiden, die bei physiologischen Salzkonzentrationen auftreten können, wurde die Gel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Denaturierendes Gel:
Für 250 ml: 2,5 g Agarose
 218 ml DEPC-Wasser
aufkochen und unter Rühren auf 60°C abkühlen lassen.
 25 ml 10x MOPS
 7,5 ml Formaldehyd, pH 4

Die RNA wurde mit 150 μ l Ethanol gefällt, in einer Tischzentrifuge bei 14 000 rpm und 4°C abzentrifugiert, das Pellet in 10 μ l DEPC-Wasser aufgenommen und mit weiteren 10 μ l RNA-Probenpuffer versetzt. Die RNA wurde für 15 min bei 60°C denaturiert und pro Probe mit 0,6 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Die Elektrophorese fand in 1 x MOPS bei 4-6 V/cm Gel statt.

RNA-Probenpuffer	96 μ l	Formamid
	20 μ l	10 x MOPS
	35 μ l	Formaldehyd, pH 4
	22 μ l	50% Glycerin
	20 μ l	0,1% Bromphenolblau
1x MOPS-Puffer:	40 mM	MOPS
	10 mM	Na-Acetat
	1 mM	EDTA, pH 7,2

2.2.5.1.3 Transfer von RNA auf eine Nylonmembran

Der Transfer von RNA aus einem denaturierenden Gel erfolgte nach der Kapillarblotting-Methode auf Nylon N⁺ Filter (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Dabei diente 10 x SSC als *Blotting* Puffer. Im Anschluss wurde die Membran in 2 x SSC gewaschen und die RNA unter UV-Licht bei 0,4 J/cm² fixiert.

2.2.5.2 Western-Blot-Analyse

Die *Western-Blot*-Analyse stellt in Anlehnung an die *Southern-Blot*-Analyse eine klassische Methode dar, um aufgetrennte Proteine durch einen Antikörper nachzuweisen. Dabei werden im Unterschied zur *Southern-Blot*-Analyse Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt.

2.2.5.2.1 Herstellung von kernlosen Gesamtmembranpellets

Die Gewebe (je 0,5 g von Thymus, Leber, Niere und Hoden der Maus) wurden in 4 ml TES in einem Ultraturrax zerkleinert und 10 min bei 600 x g zentrifugiert. Das Pellet, das die Kerne und nicht homogenisierte Gewebsfragmente enthielt, wurde verworfen. Der Überstand wurde bei 4°C bei 200 000 x g für 1 h zentrifugiert, das Pellet in 100-200 μ l TES homogenisiert und bei -80°C gelagert.

TES-Puffer:	20 mM	Tris, pH 7,4
	1 mM	EDTA
	8,7%	Saccharose

2.2.5.2.2 Bestimmung der Protein-Konzentrationen

Die Bestimmung der Protein-Konzentrationen kernloser Gesamtmembranpellets erfolgte mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kits* (Pierce, Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers (Microwell Plate Protocol).

2.2.5.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gele zur Auftrennung von Proteinen

Durch Anlagerung von SDS-Molekülen an Proteine werden Tertiär- und Quartärstrukturen zerstört sowie Ladungsunterschiede neutralisiert. Daher ist es möglich, durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Membranproteine wurden mit 1 x Laemmli-Puffer und 60 mg/ml DTT zum Lösen von Disulfidbrücken bei 95°C gekocht und durch SDS-PAGE getrennt. Die Prozentigkeit des Gels richtete sich nach dem erwarteten Molekulargewicht (Laemmli *et al.*, 1970).

2 x Laemmli-Puffer:	20%	Glycerin
	8%	SDS
	10 mM	EDTA
	0,25 M	Tris
	1%	Bromphenolblaulösung
unterer Gelpuffer:	1,5 M	Tris
	0,4%	SDS
oberer Gelpuffer:	0,5 M	Tris
	0,4%	SDS
14% SDS-Gel:		
Trennbereich:	1,56 ml	unterer Gelpuffer
	2,8 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 40%, 19:1
	1,64 ml	H ₂ O
	6 mg	Ammoniumpersulfat
	6 µl	TEMED

Kammereich:	520 μ l	oberer Gelpuffer
	260 μ l	Acrylamid/Bisacrylamid 40%, 19:1
	1,22 ml	H ₂ O
	2 mg	Ammoniumpersulfat
	2 μ l	TEMED

2.2.5.2.4 Transfer elektrophoretisch getrennter Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des TankBlot auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Schleicher & Schuell, Dassel) (TankBlot TE 22 *Mighty Small*[®] Transphor, Hoefer Scientific Instruments, San Fransisco, CA, USA) transferiert. Dazu wurde das SDS-Gel mit Transferpuffer 10 min equilibriert, und anschließend 1 h bei 200 mA auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

Transferpuffer:	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
	0,1% (w/v)	SDS

2.2.5.2.5 Immuno-Assay

Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde der Nitrozellulosefilter zunächst 1 h mit Waschpuffer A/0,1% Tween 20, und anschließend mit Antikörper 1:500 in Waschpuffer A/0,1% Tween 20 8-14 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Nitrozellulosefilter jeweils 5 min gewaschen: 2 x mit Waschpuffer A, 4 x mit Waschpuffer B, 2 x mit Waschpuffer A. Danach wurden die Filter 2 h bei RT mit 0,25 μ Ci [¹²⁵I]Protein A (30 mCi/mg, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in Waschpuffer A/0,1% Tween 20 inkubiert. Das ungebundene radioaktive Protein A wurde nach dem oben beschriebenen Waschvorgang entfernt, die Filter 1 h bei RT getrocknet und ein Autoradiogramm erstellt.

Waschpuffer A:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl

Waschpuffer B:	0,2% (w/v)	SDS
	0,5% (w/v)	Triton X-100 (Serva)
	0,5% (w/v)	BSA (Sigma)
	0,9% (w/v)	NaCl
	pH 7,0	

2.2.6 Histologie der Embryos der Maus

Um die Embryos der Maus histologisch zu untersuchen, wurden heterozygote Tiere verpaart und die Uteri nach 5,5-9,5 Tagen *post conceptionem* präpariert. Über Nacht wurden diese in 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert, durch eine aufsteigende Alkoholreihe behandelt und in Paraffin eingebettet. Diese Paraffinblöcke wurden in Serie geschnitten und nachfolgend entweder H/E gefärbt oder mit Hilfe des TUNEL-Assays untersucht.

2.2.6.1 *In-situ* Hybridisierung (ISH) an Schnitten von Embryos der Maus

Paraffinschnitte von Embryos (Tag 11 bis Tag 18 p. c.) wurden 3 x 10 min in 100% Xylol inkubiert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70%) entparaffiniert. Anschließend wurden sie mit DEPC-Wasser gewaschen, mit Proteinase K-Puffer 30 min behandelt und 5 min in 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS nachfixiert. Um unspezifische Bindungen der Sonde zu vermeiden, wurden geladene Gruppen wie folgt acetyliert und behandelt: 2 x DEPC-Wasser, 1 x 0,1 M Triethanolamin in DEPC-Wasser, 5 min Acetat-Puffer, 10 min in 125 µl Acetat-Puffer in 50 ml Essigsäureanhydrid. Dem Waschen in DEPC-Wasser schloss sich eine aufsteigende (70%, 80%, 90% 100%) Alkoholreihe und das Trocknen der Schnitte an der Luft an. Die Sonde wurde mit dem Hybridisierungsmix bei 80°C denaturiert und anschließend 30 µl auf jeden Schnitt pipettiert und mit Parafilm abgedeckt. Nach Inkubation von 8-14 h wurden die Schnitte wie folgt behandelt: der Parafilm wurde in 5 x SSC bei 55°C entfernt, 2 x 30 min in Waschpuffer 1 bei 55°C gewaschen, 30 min bei 37°C in RNase A Lösung in 2 x SSC inkubiert, erneut 3 x 30 min in Waschpuffer 1 bei 55°C gewaschen.

Eine anschließende aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol in DEPC-Wasser und 2 x 100% Ethanol) und das Trocknen an der Luft dienten der Entwässerung. Über Nacht wurden die Schnitte auf einen Röntgenfilm gelegt, um ein Autoradiogramm zu erstellen. Am nächsten Tag wurden die Objektträger in 50% Fotoemulsion *Ntb-2 Nuclear Track Fotoemulsion* (Kodak, Rochester, NY, USA) getaucht und dann für 1-2 Wochen exponiert. Die durch die radioaktive Strahlung zu metallischem Silber reduzierten Silberionen konnten im Dunkelfeld als weiße Punkte erkannt werden.

Proteinase K Puffer:	100 mM	Tris, pH 8,0
	50 mM	EDTA
	10 µg/ml	Proteinase K
Acetat Puffer:	1,5 ml	Triethanolamin
	100 ml	DEPC-Wasser
	pH 8,0	
Hybridisierungsmix:	50% (v/v)	Formamid
	10% (w/v)	Dextransulfat
	10 mM	Tris
	2 x	SSC
	5 mM	EDTA
	3 mg	tRNA
	3 mg	ssDNA
	10 mM	DTT
	10 mM	β-Mercaptoethanol
Waschpuffer 1:	50%	Formamid
	2 x	SSC
	20 mM	β-Mercaptoethanol

2.2.6.1.1 Herstellung der RNA-Sonden durch *in-vitro* Transkription

Für die Herstellung der verwendeten Sonden wurde das SP6/T7 Transkriptionskit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) nach der Anleitung des Herstellers mit 40 µCi [α ³³P]dUTP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) angewendet. Nach der Transkription wurden die Sonden über Microspin[®] S20-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Angaben des Hersteller gereinigt.

Für die Herstellung der *Sense*-Sonde wurde mit *Eco* RI linearisiert und mit T7 behandelt, für die Herstellung der *Antisense*-Sonde wurde mit *Xho* I linearisiert und mit T3 behandelt.

2.2.6.2 *In-vitro* Kultivierung von Blastozysten

Um festzustellen, ob das Fehlen des *Arfrp1*-Gens im Blastozystenstadium eine Rolle spielt, wurden Blastozysten *in vitro* kultiviert. Dazu wurden *Arfrp1*^{+/-}-Mäuse verpaart, und 3,5 Tage nach der Verpaarung die Uteri der Weibchen präpariert, und die Blastozysten mit M2-Medium unter einem Mikroskop herausgespült. Nach Befreiung der Blastozysten von Blutspuren und Uterusproteinen durch mehrmaliges Auf- und Abspülen in M2-Medium wurden die Blastozysten auf eine Petrischale übertragen. In dieser war zuvor 0,1% Gelatine-Lösung 30 min stehen gelassen und im Anschluss abgesogen worden. Dabei blieb eine feine Gelatineschicht am Boden der Petrischale zurück, an der die Blastozysten nach ca. 2 Tagen bei 37° C in M2-Medium haften konnten. Nach Haftung der Blastozysten wurde das Wachstum beobachtet und täglich fotografiert. Die Blastozysten wurden nach Ablauf einer Woche über PCR genotypisiert. (siehe Kap. 2.2.2.3).

2.2.6.3 Untersuchung an präparierten Embryos

Um festzustellen, ob die Störung in der Entwicklung der *Arfrp1*^{-/-}-Embryos schon vor Tag 7,5 *post conceptionem* stattgefunden hatte, wurden Embryos zu diesem Zeitpunkt präpariert, untersucht und fotografiert. Dazu wurden heterozygote Mäuse über Nacht verpaart und die Uteri 7,5 Tage später präpariert. Aus den Uteri wurden schließlich Embryos isoliert. Diese wurden unter dem Mikroskop untersucht und auf 1% Agarose in einer Lösung aus 1 mg/ml BSA fotografiert. Im Anschluss wurden die gesamten Embryos in DNA-Lysepuffer über 12 h bei 37°C lysiert und über PCR genotypisiert.

2.2.6.4 H/E (Hämalaun/Eosin)-Färbung

Zur histologischen Bewertung der Paraffinschnitte wurde eine H/E-Färbung durchgeführt. Schnitte wurden entparaffiniert und rehydriert, anschließend in Hämatoxylin-Lösung 10 min gefärbt und 8 min in Leitungswasser gebläut. Danach erfolgte eine 1-minütige Färbung in 1% (w/v) Eosin. Die Schnitte wurden nach einer aufsteigenden Alkoholreihe mit DePeX (Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg) eingedeckelt.

Hämatoxylin-Lösung:	2,5 g	Hämatoxylin
	328 ml	H ₂ O
	172 ml	87% Glycerin
	25 g	NH ₄ Al(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O
	0,1 g	Na-Iodat
	10 ml	Essigsäure

2.2.6.5 TUNEL-Assay

Apoptotische Zellen von Mausembryos wurden an Paraffinschnitten mit Hilfe des TUNEL-Tests (*TdT-FragEL DNA Fragmentation Detection Kit*[®]) nachgewiesen. Die Paraffinschnitte wurden zunächst 2 x 5 min in 100% Xylol entparaffiniert, 2 x 5 min in absolutem Ethanol und jeweils 3 min in einer absteigenden Alkoholreihe (90%, 80%, 70% Ethanol) rehydriert. Anschließend wurden sie mit Proteinase K (20 µg/µl in 10 mM Tris) 20 min bei Raumtemperatur (RT) permeabilisiert, die endogene Peroxidase mit 3% Wasserstoffperoxid inaktiviert und die Schnitte mit TdT-Equilibrierungspuffer versetzt. Die 3'-OH Enden der DNA-Fragmente wurden mit 3 µl *Terminale Desoxynukleotidyl Transferase* Enzym in 57 µl *Labeling Reaction Mix* bei 37°C 90 min markiert, die Reaktion mit Stopplösung terminiert und mit *Blocking Buffer* bei RT 10 min und dann mit Konjugat (2 µl 50 x Konjugat in 98 µl *Blocking Buffer*) 30 min inkubiert. Die markierte DNA wurde mit Diaminobenzidin detektiert. Um die histologischen Strukturen besser erkennen zu können, erfolgte anschließend eine Gegenfärbung mit Methylgrün.

3 ERGEBNISSE

3.1 Das murine *Arfrp1*-Gen

3.1.1 Isolierung des murinen *Arfrp1*-Gens

Um das *Arfrp1*-Gen zu charakterisieren, wurden Klone aus einer λ -Fix[®] II-Bibliothek des Mausstammes 129/SvJ isoliert und untersucht. *Gescreened* wurden jeweils ca. 4×10^5 Plaques mit zwei unterschiedlichen Sonden: die ARFRPrf-Sonde (943 bp), die der gesamten cDNA der Ratte entsprach, und die über PCR auf der Ratten cDNA hergestellte 5'-UTR-Sonde (47-140 bp). Mit der ARFRPrf-Sonde wurden zwei positive Klone (Klon 1 und Klon 2) identifiziert, vereinzelt und isoliert. Diese Klone wurden durch Restriktionsverdau, *Southern*-Blot-Analyse und Erstellung einer Restriktionskarte untersucht. Da die Hybridisierung der *Southern*-Blots beider Klone mit einer Sonde des 5'-UTR keine Signale ergab, wurde deutlich, dass diese Klone lediglich Teilfragmente des 3'-Bereichs der genomischen *Arfrp1*-DNA enthielten. Deshalb wurde mit der 5'-UTR Sonde erneut die Phagenbank untersucht. Vier positive Phagenklone (Klon 3, 4, 5 und 6) identifiziert, vereinzelt und isoliert. Da Hybridisierungen der *Southern*-Blots von Klon 3 und Klon 4 mit beiden Sonden Signale ergaben, enthielten diese Klone sowohl den 5'-Bereich als auch Bereiche des Leserahmens des murinen *Arfrp1*-Gens.

Zur Identifizierung der kodierenden Bereiche des *Arfrp1*-Gens wurden geeignete, im *Open Reading Frame* (ORF) schneidende Restriktionsenzyme gewählt (siehe Abb. 5) und Einzel- und Doppelrestriktionsverdau durchgeführt. Abb. 5 zeigt Restriktionsverdau und *Southern*-Blot-Analyse der Klone 1, 3 und 4.

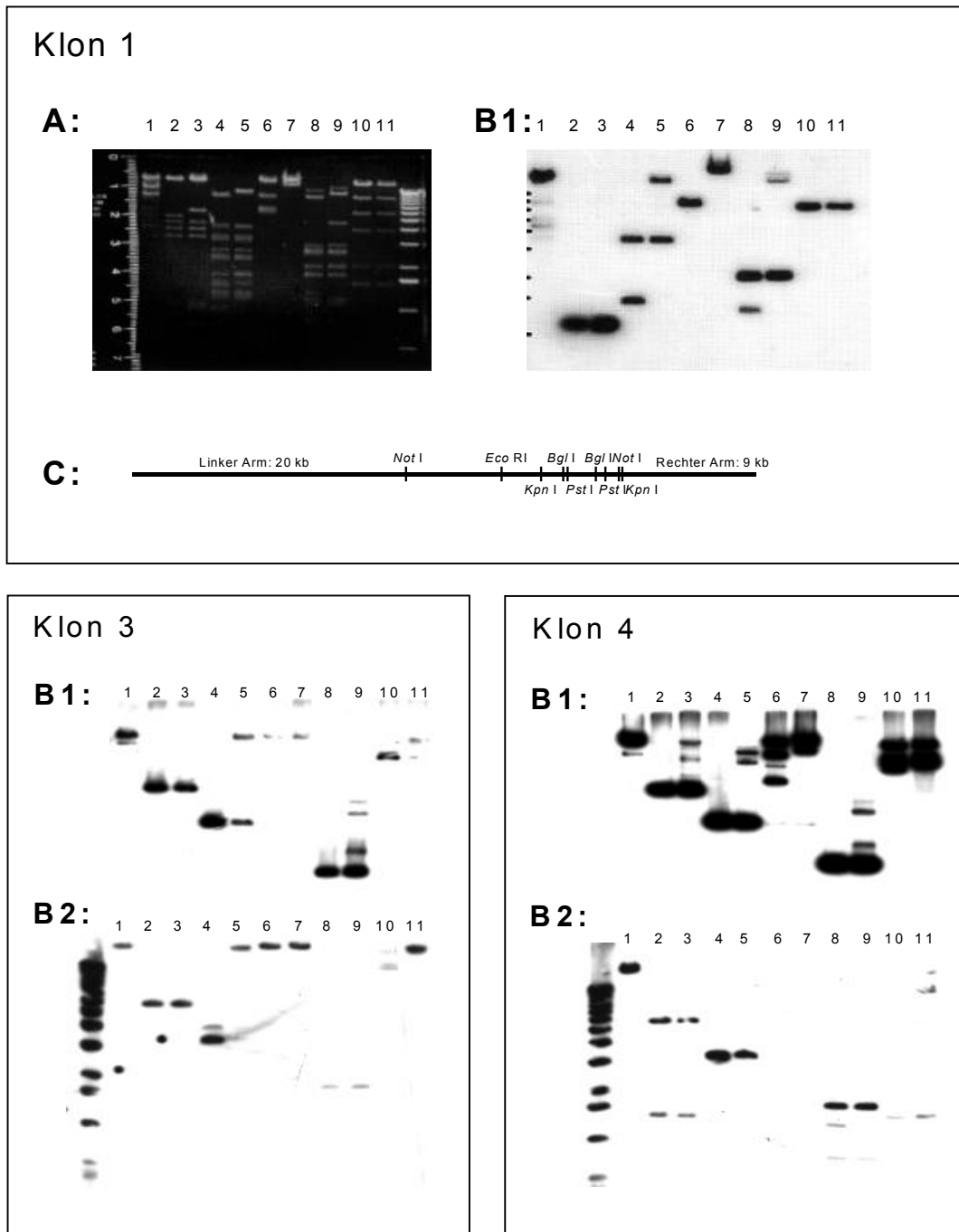


Abb. 5: Restriktionsverdau, Southern-Blot-Analyse und Restriktionskarte verschiedener Phagenklone

A: Phagen-DNA (5 µg) wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Spur 1: *Not* I, 2: *Not* I/*Nco* I, 3: *Nco* I, 4: *Not* I/*Bgl* I, 5: *Bgl* I, 6: *Not* I/*Eco* RI, 7: *Eco* RI, 8: *Not* I/*Pst* I, 9: *Pst* I, 10: *Not* I/*Kpn* I, 11: *Kpn* I. B: Die Fragmente wurden in einem 0,8% (w/v) Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert *Southern*-Blot-Analyse und Hybridisierung mit der ARFRPrf-Sonde (Ratten cDNA 1-943 bp) (B1), oder mit der 5'-UTR-Sonde (Ratten cDNA 47-140 bp) (B2). C: Herstellung einer Restriktionskarte des Phagenkons.

Not I schneidet die gesamte genomische Sequenz aus dem Phagen, so dass man 3 Banden erhält: der linke Phagenarm hat eine Länge von ca. 20 kb, der rechte von ca. 9 kb, die dritte Bande entspricht der Größe der gesamten einklonierten genomischen Region. Aus der Größe aller entstandenen genomischen Fragmente wurden, soweit möglich, Restriktionskarten der Klone erstellt, wie in Abb. 5 für Klon 1, 3 und 4 gezeigt wird. Ein Restriktionsverdau des Klon 3 mit *Nco* I ergab mit beiden Sonden ein 5-6 kb großes Fragment. Damit wurde der 5'-Bereich des *Arfrp1*-Gens auf diesem Fragment lokalisiert. Dieser wurde für weitere Analysen aus dem Phagen geschnitten und in den Vektor pGEM[®]-5Zf(+) kloniert. Weiterhin wurden zwei *Pst* I-Fragmente mit einer Größe von 0,7 und 1,6 kb aus Klon 3 und ein 7,5 kb großes *Not* I/*Eco* RI-Fragment aus Klon 1 in den pBlueskript[®] II-KS kloniert. Durch die *Shotgun*-Methode (siehe Kap. 2.2.2.2) wurden diese Fragmente zerkleinert, sequenziert und die Organization des murinen *Arfrp1*-Gens aufgeklärt. Eine Lücke im Bereich des Intron 6 wurde durch PCR-Amplifikation der genomischen Sequenz mit spezifischen *Primern* geschlossen (ARFRP1 Int6F und ARFRP1 Int6R, siehe Kap. 2.2.2.3). Das Ergebnis ist in Abb. 6 dargestellt.

-163	cctctgcggc	ccgcaacccc	acctccggcc	ggcgctcgca	ggctagaagg	gcttccgccc
-103	tcgccagcca	agctcacgcy	ctagccttct	gccctccgcc	gggcacttcc	gccggagagc
-43	cgaagctgcc	ggaagtacct	gcgcgcgggg	gccgctggga	tgcGATTCCG	CCCGTGCTCC
18	GTCCTTCGCT	CCTTGTTCGG	TCAGGCACTG	TGAGGGGTCA	GCGTGAGGTC	GGTGGGGTTA
78	GGAACGCGGC	GGCGGCGGCG	GCGGCGGCGG	CGGCTCCTCC	TCCAAGATCT	GAGCAGGTAC
138	GGgtgggcct	cagctggact	gaggggcccg	ggttctaaag	tcctggaaca	gggggacgga
198	agtggcttca	gctgctgggt	cccaggctcc	gtggggcccgg	cgggggcggg	aagccgaagc
258	cgaccctcct	caaggagctct	gcctctctgg	tcgcttccct	gacttaagtc	gccggccgcy
318	tttctctggt	ctgagctgag	ggttccgaaa	gaggagcctt	aggaaggcgg	agcagagcag
378	gccggccacgg	gcttttcagg	actccgaatt	gatggctgat	tatgaaagat	gacattaagt
438	gggagtggcc	caagctctagc	acgtggctcag	cgatggcatc	gggggaatca	gggtcagggg
498	ttttaacaga	agagggcggga	tgggggcccga	gagtccaggt	ccgcgagggc	acacatttga
558	aaactagcag	gagagggcggg	ccgctgatga	agcggggcagg	gcaggagggc	gatgccccgc
618	gtacacacat	tgacatctct	cagGGTGCCA	GAACAGGATG	TACACGCTGC	TTTCGGGATT
678	<u>Y K Y</u>	<u>M F O K</u>	<u>D E Y</u>	<u>C I L</u>	<u>I L G L</u>	<u>D N A</u>
	GTACAAGTAC	ATGTTCCAGA	AGGATGAATA	CTGCATCCTG	ATCCTGGGCC	TGGACAATGC
738	<u>G K T</u>	gtaggtccct	gctctctcac	cagttcccat	tccttgccctg	atctaacccc
798	cgcccccaag	ctacaggtta	gtagtcacca	gcctcctgaa	gatcaagcca	caggcagagg
858	cgtgcatggc	tgcatgggtg	tgaagggata	ggtaggggaa	acaccagaaa	actactctag
918	ctgctgctatc	taaccccctc	tctttttttc	ctcagACTT	TCCTGGAACA	GTCAAAAACA
978	<u>R F N K</u>	<u>N Y K</u>	<u>G M S L</u>	<u>S K I</u>	<u>T T T</u>	<u>V G L</u>
	CGCTTTAACA	AGAACTACAA	GGGGATGAGT	CTATCCAAAA	TCACCACTAC	CGTGGGTCTA
	<u>-G1</u>				<u>-PM2</u>	
1038	AACAgtaagg	gggcacctta	gggatatgat	cttaggaggt	cccttagaga	tggatgctgt
1098	aaggtccaca	accagactga	ccagtggctca	aaaccctgtc	tttctattct	gtgttcaagt
1158	tccttaggat	tggtaccaga	atggttfgtc	ccatcctggg	gagagctgga	acctgtgtg
1218	taaaggtcag	gagctagctc	tttctgtact	ctttccagTT	<u>G T V D</u>	<u>V G K</u>
					GGCACTGTGG	ACGTGGGAAA
1278	<u>A R L M</u>	<u>F W D</u>	<u>L G G</u>	<u>Q E E L</u>	<u>Q S L</u>	<u>W D K</u>
	GGCTCGTCTC	ATGTTTTGGG	ACTTAGGTGG	GCAGGAAGAG	CTGCAGTCTT	TGTGGGACAA
1338	Ggtaagacac	attacctggt	tgatcctggt	tttctctaga	tggccccctca	tagtcttttc
1398	tgtgagagtt	ccacatttac	cccaaagatt	ttctaatttt	ttatttttaag	tttttctggt
1458	ttttcgagac	aggttttctc	tggttgtagc	ctggctgtcc	tggaaactcac	tctgtagacc
1518	aggctggcct	tgaactcaga	aatctgcctg	ccctctgcctc	ccaaagtgct	gggattcaaa
1578	ggcgtgtgcc	accactgcgg	ggtttlaagt	tatttttatt	gggggagggg	tgcgtgtcac
1638	agcatgctg	tgggcgacgg	ggctaatttg	tagactgttt	ttctcacctt	aatgtgggtt
1698	ccaaggatca	aaactcggatt	atcaggcttg	tgtagcaacc	acttttacct	gctfatcata
1758	cacatggctc	tgtctaaaagg	tttttctctg	gatoctatcc	caggttccca	agttgctttc
1818	tgctcactc	tggtaaaaaac	cagggctaga	gtcaccacga	aagtgcacac	aagggaaattc
1878	ccccagggag	taaccaatct	tttcttcaat	cccaaagaad	gaagcattgt	tcattagggt
1938	agtctatgca	gagcgcttac	tgaggaactc	agtgaggact	atagcctatc	ctctaacagg
1998	tggataaaaa	tggcagttca	tagacagggg	gggcccacaa	cctgtgttct	ctgagctgtg
2058	ctgcttcatt	ctagcttggt	cttttagatg	gccttttaac	cttccaaagga	gggtgttctc
2118	agaggcagac	agcgccttct	tctttttttt	tttttttttt	tttttttatt	fattfattat
2178	atgtaagtac	actgtagctg	tcttcagaca	ctccagaaga	gggagtcaga	tcttgttaca
2238	gatggttgtg	agccaccatg	tggttgctgg	gatttgaact	ccggaccttc	gggagagcag
2298	tcgggtgctc	tfaccactg	agccaatctc	ccagcccagc	gccttcttct	ttaggcattg
2358	gttttagaca	cctgaaaact	ccctctgtat	acattcctcc	actggcgtct	cttccaccca
2418	gcctattagg	caactaagctc	agcactgaac	agaacaagcc	ttgactttcc	ttcagcagtc
2478	ctttgttttg	tagttggtac	ggtcactttg	cgcagtcocag	tgctttaatc	caggtgcctt
2538	agttacagtg	atgtcctatc	aaagtgaaca	cttagcagtg	gcttctattg	ccttgatgaa
2598	tggaaacctat	actgataagt	tcctctcactc	tggccactgt	tctctgtctc	gaatggatcc
2658	actgatgggc	aagttgctct	ccacagtggg	tgctctgggt	aaccttgaga	tagaaactaa
2718	gtccccatgt	gtgctgctta	tatctgcctt	aggatttttg	tatgtacttt	ctgaccaag
2778	cagtatatct	tgtagcagta	tatctfgtat	accaagcctg	gcagatgtga	taagtggatc
2838	tagctacttg	gttccctaagt	cacataaagac	atttcttaca	acctttgaag	ctgctaagtac

Abb. 6: Teil 1 (siehe Beschriftung S. 55)

2989	tgccctgctga	ctcactgact	tcaactgggat	gagacctcat	atcatcctct	attatcataa
2995	atcccctcata	aatacagtag	gacctgcccag	ttctcatgcc	tccagcaata	ggctaacccta
3018	ctgcccctgcc	ccagagctgg	cagctfctgt	gccaggccca	ttgcaaacct	gtatgggtct
3078	ggctgcaaaag	ccctgcaaaa	ggaaccttgg	actggcctcc	aggactccat	gggaagtgta
3138	gggtgggaag	gggtttcact	gactggaatg	aagtaactcct	tgtccactca	gtggtagtac
3198	ctcaatcctac	cctgtctgta	gcatgttatt	ttaccagtca	gtggttgactt	ctcactgaga
3305	ccggatcagg	gaaccagaaat	ggctctggaga	taaagtggca	agtgttaggct	atttgtcca
3331	tacttataagg	cacagtgctc	ccattgttgt	gtggatctfcc	atctccttgg	cttactttgt
3337	cctatctgttc	ctgtgttfaac	aatactgtcc	cttgtttgttg	aaagcccagg	actggctaca
3343	tccaaccctgc	agaagcctga	gttgagcact	ttcagtftgtg	ttcagggcagg	gtagtgtcat
3355	agacagtggcc	gacctcagcc	ctgagcctct	tttgcttctc	caacctctag	gcctgtctcc
3558	tactcttttc	ttaacatcat	cttagccagg	gcaacagggtg	ggttctcagg	aggagcctcc
3618	tggcagaagg	tagttgatca	ccctgctaga	gtcagcaagt	tgtcctcaaa	ggtgctttgg
3678	tatcttfaact	actaaatcagt	ctcagaaaaac	tttttagcaa	ctctcccac	tgggttgtgc
3738	ccatttttgg	ccctaggatg	gcaaaagattc	ccaccattcg	atgctctgtc	cttcctcttc
3798	agggcctctt	ctgctagtgtg	tgacaacagg	tctcactatc	cagctatgag	tacctctcgc
			Exon 5			
3858	ccagctttaa	tcctcttctc	tctagTACTA	TGCAGAGTGC	CATGGTGTCA	TCTATGTAAT
	D S T	D E A E R	L S E	A E C	H G V I	Y V I
3918	TGATTCAC	GATGAAGAAA	GGTGTTCAGA	ATCAAAAGAG	GCATTTGgtg	agtgtagcat
3978	ggccactctg	ggaagaagag	atgattggga	agacctatgt	ctagggaaat	gtgtggggag
4038	ggatgtacta	atgggtggta	tcagtatagt	ctggatcctc	ccaatgtgtct	ggaaactttcg
4098	ttgagggagg	ctgggctaac	acctggatgc	cagtgccaag	aaagcctcag	tcaatgtgtct
4158	tgggctgtct	agtatataag	gggaagggtg	gaagggatct	gtttgtatac	acctgttagcc
4218	tgggcagagc	ctgcagctcat	gaacaggaca	ctgggtgcaa	ggcaccacct	ctcctgcftt
			Exon 6			
4278	cctcagAGAA	GGTGGTTTCG	AGTGAAGCAC	TGGACGGTGT	TCCCATCCTG	GTGTTGCCA
	K V V S S	S E A L	D G V	P I L V	L A N	
4338	ACAAGCAGGA	TGTGGAGgtg	agccccacaa	agctgctata	gagcctctat	cgacattgca
	K Q D V E					
4398	agaaaagtga	catgtatgcc	tcttcagatt	tccagaactt	ggtgtccatc	catccccaatc
4458	tcctctctgc	cttctctggc	acccttcttc	cacactctta	ggatctctac	cttgccaactc
4518	tcagtttctc	tctgtgtgtc	acaaaagaact	gtcactatta	gaaccagcat	cttctacta
4578	gatgtagaat	ccaagagtgt	ggatcacct	gtcttccaaa	gggaggaccg	gggctttgtg
4638	tctacggatg	ccctcagagg	ttctgagagt	atgagcctac	agaaaagacc	agggtggaagc
4698	tctctggact	aaataagtgg	gtgtgggagt	gcctcagaga	tgtctagggtg	atfaagaact
4758	taaaatgccc	ttccagaaga	cccaagtftg	attcccagta	cccattgtcag	gtggctcaca
4818	gccatctggg	actccagctt	ttgggtatct	gacacctctg	gctttagttag	gtacttttagt
4878	gtgttcactg	tacataacct	ccagatatac	atacataata	tataaaaaaa	aaagcaaatct
4938	tcagttttct	aaagtggggg	ggaaaagtga	agacaatgga	caaaccttta	gatgtgtaca
4998	ttcccttttg	acttctggct	afacaaaagc	cctaccgtct	tactaaagag	gctctgtata
5058	gtaagagctg	tagaggacat	gatggccaac	agtatctgga	gggccaagg	actcttactt
5118	tccgtagggc	ccatgtatct	accattctc	atctgacatg	acctgtcctc	cactcattttg
5178	cgtagagacg	taagttaagtc	tctgttactt	ggctgaggaa	cacaggggta	ttctcttaaa
5238	tgaacagggg	gacagaggag	ccattgaaata	ctaccgaggc	ttctcaaccc	tagggcattg
5298	ggccctgccc	cactttggcat	ttgagctcct	gacttagttc	ccagtgctct	gctgttagat
5358	gttctgggga	ttagtcttgg	agggtgtgag	gaaggftttc	ttgggctatg	tgtggatttc
5418	taaagccatc	agcagtagac	ttgtttgacc	tgtgtgttga	ccaactgggtt	ctatggaggat
5478	ccaggaaccc	tgagttagct	caccctacaca	gaatttttag	ggtgattgac	tatggccatc
5538	cagaaaagccc	aagtgaataa	acaagctata	tggagctaga	agtgggaatg	ttcctcagag
			Exon 7			
5598	tctcactttc	cctgccagAC	TTGCCLTCTCC	IATTCCTGACA	TCAAGACTGA	ATTCAGTGAC
	C T C K	I G R R D C	L T Q A	C S A	L T G	
5658	TGTACCTGTA	AGATTGGCCG	GCGAGATTGT	CTGACCCAGG	CCIGCTCTGC	CCTCACAGGg
5718	tgagttgagt	gaggtcttac	tctgcagagt	cttcagggcc	aagattagcc	ctgtctcaca
			Exon 8			
5778	catactgtct	ccacagCAAA	GGAGTTCGAG	AGGGCATCGA	ATGGATGGTG	AAGTGTGTCG
	K G V R E	G I E	W M V	K C V V		
5838	TGCGGAATGT	TCACCGGCCA	CCACGGCAGA	GGGACATCAC	ATAAGGACCT	CCAACCTCAG
5898	TCTTGACTG	TTCGTCTCCT	AGTGTGGAA	GAGTATTCTC	TGCTGGCTTC	TATCTACTG
5958	ACACRGGGG	TTGAGCTGCC	TTTGTCTGTT	CATTCTTTTA	TTTGCTTTAT	GTTTCTCTA
6018	AGACAAACTT	TTCTCTGTGT	CTGGAAAAGT	GTAGGTATTC	AGAGACAAAC	ATGGGGCAGG
6078	CCAACGATCC	AAATCTACAT	GCCCTACACC	TCCATCCCCT	GACAGAGATT	TAGAGCCCTG
6138	CCTGATAGAC	ATGTCAGGGT	CTGGAACCCT	CCCAACCTTG	TGAGGACAGG	GAGGCATGAG
6198	GCCATGCCTA	GGCCTGTTAG	TTAGCCTGGT	TCAAAGTGGA	ATTTGAGGTC	ATCCTACT

Abb. 6: Teil 2 (siehe Beschriftung S. 55)

Abb. 6: Genomische Sequenz des murinen *Arfrp1*-Gens

Exons sind mit Großbuchstaben, Introns mit Kleinbuchstaben, die Proteinsequenz in fettgeschriebenen Großbuchstaben dargestellt. Der Transkriptionsstart von *Arfrp1* wird mit +1 bezeichnet, negative Zahlen beschreiben den Promotor. Der Transkriptionsstart von *Arfrp1* und des 5'-flankierenden Gens wurden über EST-Vergleich ermittelt. Unterstrichen wurden GTP/GDP-Bindungsmotive.

3.1.2 Die genomische Organisation des murinen *Arfrp1*-Gens

Das *Arfrp1*-Gen verteilt sich über 8 Exons. Das Start-Codon befindet sich auf dem zweitem Exon, wichtige Motive der G-Proteine verteilen sich folgendermassen: Das PM1-Motiv befindet sich auf Exon 2, G1 und PM2 auf Exon 3, PM3 auf Exon 4, G2 auf Exon 6 und G3 auf Exon 7. Eine Analyse der Sequenzen im Bereich der Intron/Exon-Übergänge zeigt eine fast 100%ige Übereinstimmung mit *Donor*-(GT) und *Acceptor*-(AG) Spleiss-Sequenzen (siehe Tab. 1); (Breathnach *et al.*, 1981, Senapathy *et al.*, 1990).

Exon	Start bp Nr.	Intron/Exon	Exon/Intron	Ende	Länge bp
1	1		CAGGTACGG <i>gtgggcctc</i>	139	139
2	641	<i>atctctcag</i> GGTGCCAGA	GGGAAGACG <i>gtaggtccc</i>	745	106
3	951	<i>tttcctcag</i> ACTTTCCTG	GTCTAAACA <i>gtaaggggg</i>	1039	88
4	1254	<i>tctttccag</i> TTGGCACTG	TGGGACAAG <i>gtaagacac</i>	1336	82
5	3881	<i>tccttctag</i> TACTATGCA	GGCATTGG <i>tgagtgtag</i>	3963	82
6	4282	<i>tttcctcag</i> AGAAGGTGG	GATGTGGAG <i>gtgagcccc</i>	4352	70
7	5614	<i>ccctgccag</i> ACTTGCCTC	CCTCACAGG <i>gtgagttga</i>	5714	100
8	5792	<i>tctccacag</i> CAAAGGAGT			
		Konsensussequenz : cag N	 G gta		

Tab. 1: Exon/Intron Organisation des *Arfrp1*-Gens

Die Sequenzen der Exons sind mit Großbuchstaben dargestellt, die der Introns in Kleinbuchstaben.

Der Transkriptionsstart von *Arfrp1* wurde über Datenbankvergleiche mit bekannten *Expressed Sequence Tags* (EST's) ermittelt. Das längste EST der Maus in 5'-Richtung wurde ermittelt (Acc No.: AK005174). Das putative Ende des Gens wurde ebenfalls durch Datenbankrecherche und der Identifizierung von EST's (Acc. No. BE122311, BE951195 und BE956923), die das Polyadenylierungssignal enthalten, bestimmt (siehe Abb. 11).

3.1.3 Vergleich des *Open Reading Frame* (ORF) von *Arfrp1* in unterschiedlichen Spezies

Die cDNA der Spezies Mensch und Ratte wurden mit dem *Open Reading Frame* (ORF) der Maus verglichen. Um den ORF der Maus zu ermitteln, wurde die Sequenz der Exons zusammengesetzt. Der Vergleich in Abb. 7 zeigt Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen den Spezies. In den meisten Fällen ergibt sich daraus keine Änderung der Peptidsequenz. Allerdings unterscheiden sich sechs Aminosäuren der menschlichen Sequenz von der Sequenz der Maus und der Ratte. ARFRP1 enthält auch die charakteristischen GTP/GDP-Bindungsmotive PM1-3 und G1-3. Unterschiede der Aminosäuresequenz befinden sich nicht im Bereich dieser Bindungsmotive.

3.1.4 Sequenzvergleich von ARFRP1 mit anderen GTPasen

Abb. 8 zeigt den Sequenzvergleich von ARFRP1 mit anderen Ras-verwandten GTPasen. ARFRP1 besitzt die höchste Homologie zu den ARF-Proteinen ARL3 (43,7%) und ARF1 (36,5%). Identische Aminosäuren befinden sich hauptsächlich in konservierten Motiven der GTPasen.

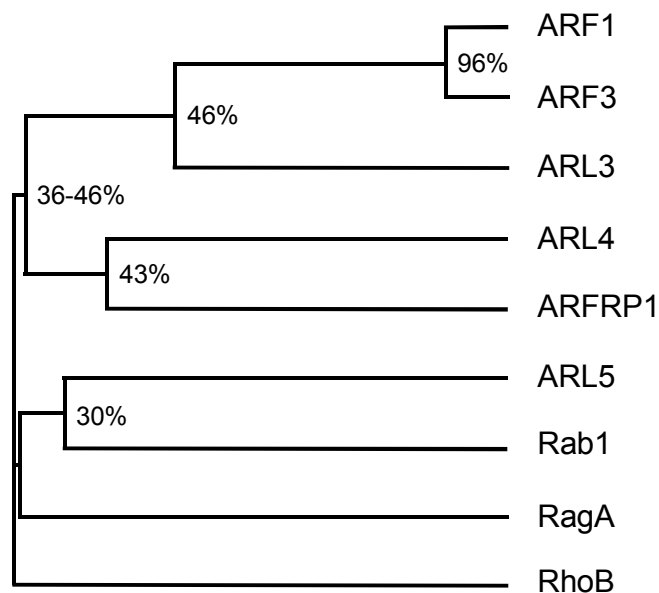


Abb. 8: Dendrogramm eines Sequenzvergleichs von ARFRP1 mit anderen GTPasen der Ras-Familie

Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programms CLUSTAL erstellt, Identitätsvergleiche mit dem Programm BESTFIT. Die miteinander verglichenen Proteine waren alle von der Spezies Mensch und weisen folgende *Acc. No.* auf: ARF1: NP001649, ARF3: 001650, ARL3: 004302, ARL4: NP005729, ARFRP1 (entspricht humanem ARFRP1): 003215, ARL5: 036229, Rab1: 004152, RagA: 006561 und RhoB: PO1121.

Der Vergleich der genomischen Organisation der GTPasen (Abb. 9) macht deutlich, dass *Arfrp1* mehr Exons besitzt als andere Ras-verwandte GTPasen und sich auch deutlich von der Organisation anderer ARF- und ARL-Proteine unterscheidet. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass sich ARFRP1 während der Evolution zu einem frühen Zeitpunkt von der Entwicklung anderer GTPasen getrennt hat.

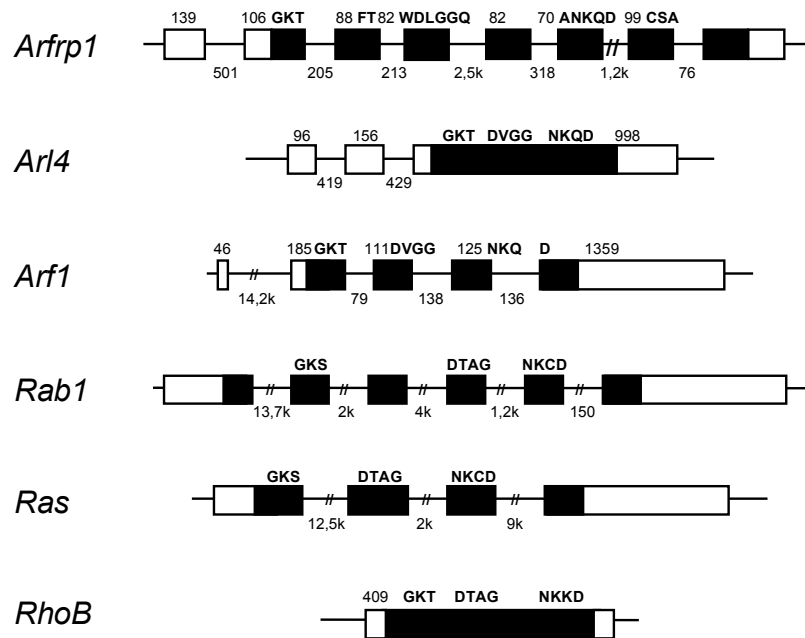


Abb. 9: Vergleich der genomischen Organisation von *Arfrp1* mit anderen GTPasen der Ras-Familie
Referenzen für die genomische Organisation der GTPasen sind: *Arf1*: Lee *et al.*, 1992, *Arf3*: Tsai *et al.*, 1991, *Rab1*: Wichmann *et al.*, 1989, *Ki-Ras*: McGrath *et al.*, 1983, *RhoB*: Fritz *et al.*, 1997. Rechtecke stellen Exons der GTPasen dar, ausgefüllte Rechtecke stellen ORFs dar. Die Zahlen oberhalb der Gene stellen die Länge der Exons (bp) dar, die unterhalb der Gene die Länge der Introns (bp). Die Buchstaben oberhalb der Gene entsprechen Aminosäuren von GTP-bindenden Motiven: PM1 (GKT oder GKS), PM2 (T), PM3 (DVGG oder DTAG), G1 (F, Y oder K), G2 (NKQD, NKKD oder NKCD) und G3 (CSA).

3.2 Das humane *ARFRP1*-Gen

Das humane *ARFRP1*-Gen ist auf dem Chromosom 20q13.3 lokalisiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LokusLink>, im Bereich Unigene). *Upstream* des humanen *ARFRP1* befindet sich ein neues, unbekanntes Gen, welches dem der Maus entspricht (siehe Kap.3.3). Allerdings ist der Abstand des Gens im Menschen mit ca. 100 bp größer als in der Maus. *Downstream* vom *ARFRP1* befinden sich nach Bai *et al.* (2000) mindestens zwei weitere Gene: ein Gen der Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptor-Familie (M68/DcR3) und ein Gen der Strathmin-Onkogen-Familie (SCLIP). Weiterhin beschreibt das Programm *Lokus Link-Unigene* in näherer Umgebung weitere Gene, von denen ein *GLUT4-Enhancer Factor* bekannt ist.

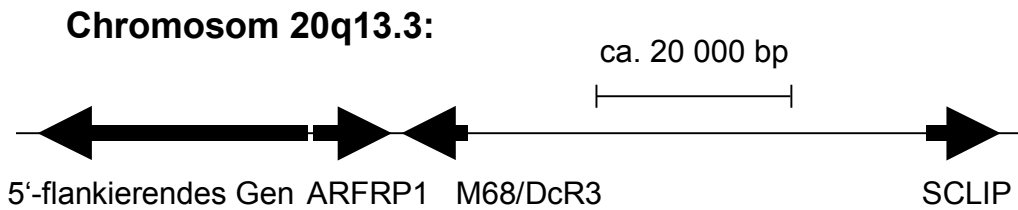


Abb. 10: Genomische Struktur von Chromosom 20q13.3 im Bereich von ARFRP1
 ARFRP1 und seine Nachbargene sind durch große Pfeile gekennzeichnet. Dabei stellt die Pfeilrichtung die Orientierung der Transkription des Gens dar. M68/DcR3: Gen der Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptor-Familie, SCLIP: Gen der Strathmin-Onkogen-Familie (nach Bai *et al.*, 2000).

Die Intron/Exon-Verteilung des murinem *Arfrp1*-Gens ist im Bereich des *Open Reading Frame* (ORF) mit dem humanem *ARFRP1*-Gen identisch (siehe Abb. 11), allerdings unterscheiden sich die Introngrößen. Aufgrund von EST's konnte der Transkriptionsstart des menschlichen Gens ermittelt werden (siehe Abb. 11).

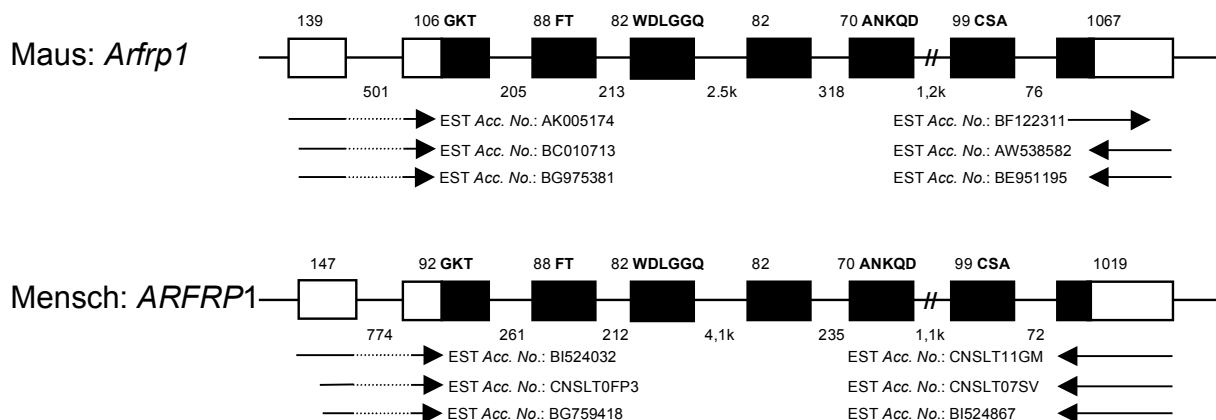


Abb. 11: Vergleich der Organisation des murinem *Arfrp1*-Gens mit dem humanem *ARFRP1*-Gen
 Der Vergleich des Maus-Gens mit dem menschlichen Klon RP4-583P15 wurde mit dem Programm BESTFIT durchgeführt. Rechtecke stellen Exons, die dunklen Bereiche ORF's dar. Die Zahlen oberhalb der Gene stellen die Länge der Exons (bp) dar, die unterhalb der Gene die Länge der Introns (bp). Die Buchstaben oberhalb der Gene entsprechen Aminosäuren von GTP-bindenden Motiven (siehe Abb. 9). Durch Pfeile sind EST's dargestellt.

3.3 Promotoranalyse des *Arfrp1*-Gens

Untersuchungen des Promotors eines Gens können aufschlussreiche Hinweise zur Regulation des Gens liefern. Da regulatorische Elemente oft zwischen den Spezies Maus und Mensch konserviert sind, wurde der 5'-flankierende Bereich des murinen

Arfrp1-Gens mit dem des humanen *ARFRP1*-Gens verglichen (siehe Abb. 12) und potentielle regulatorische Elemente durch Datenbankvergleich ermittelt. Dabei wurden Regionen identifiziert, die sowohl eine große Homologie zwischen Maus und Mensch zeigten, als auch potentielle Bindungsstellen für regulatorische Elemente aufwiesen.

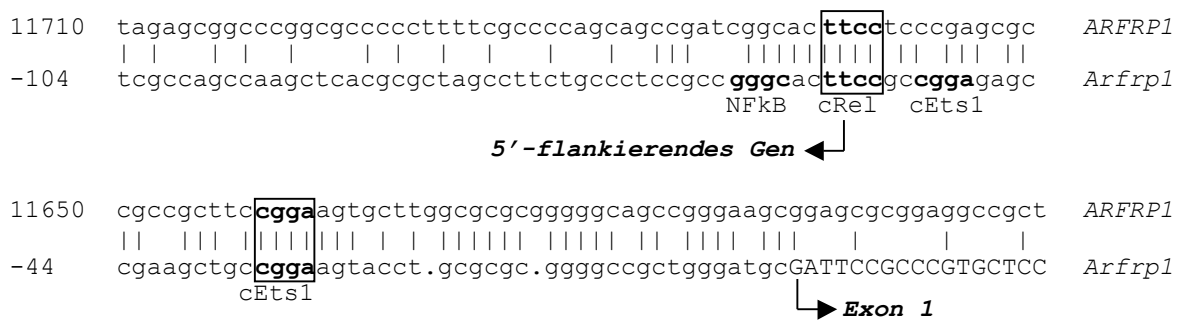


Abb. 12: Potentielle regulatorische Elemente im 5'-flankierenden Bereich des menschlichen und murinen *Arfrp1*-Gens

Potentielle regulatorische Elemente wurden über Datenbankvergleich ermittelt. Verwendet wurden die Programme MATINSPECTOR (GBF-Braunschweig) und FACTOR (HUSAR/Heidelberg). Markiert wurden nur die *Core-Matrix*-Bereiche, dabei wurden Elemente, die in beiden Sequenzen vorkommen, eingerahmt und Elemente, die nur in der Maus vorkommen, unterstrichen. Gesamte Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren: NFκB: GGGCacttc (Ruben *et al.*, 1991), cRel: gggcacTTCC (Hahn *et al.* 1990), cEts1: gcCGGAagagc, bzw. gcCGGAagta (Gegonne *et al.*, 1992). Pfeile stellen den Transkriptionsstart dar. Die Nummerierung bezieht sich bei der menschlichen Sequenz auf den Klon RP4-583P15 (*Acc.No.* AL121845) des Humanen-Genom-Projekts. Bei der Maus bezieht sich die Nummer +1 auf den Transkriptionsstart.

Um den Promotorbereich von *Arfrp1* zu charakterisieren, wurde der 5'-flankierende Bereich sowohl über Reporteragen-Assays, als auch in *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assays* (EMSA) untersucht. Über Datenbankvergleich wurden EST's identifiziert, die deutlich machten, dass sich lediglich 60 bp *upstream* des Transkriptionsstarts von *Arfrp1* ein weiteres bislang noch unbekanntes Gen befindet (*Acc. No.:* AW782448) (vgl. Kap. 3.2). Dies war ein Hinweis darauf, dass sich der Promotorbereich von *Arfrp1* auf diese 60 bp eingrenzt.

3.3.1 Analyse des *Arfrp1*-Promotors mittels Luciferase-Assays

Reporteragen-Assays dienen dazu, den Promotor eines Gens zu charakterisieren. Der Vektor pGL3-Basic® ist so konstruiert, dass auf die *Multi Cloning Site* die cDNA des

Luciferase-Gens folgt. Wurden Promotor-Bereiche vor das *Luciferase*-Gen kloniert, eukaryotische Zellen mit diesen Konstrukten transfiziert und anschließend das umgesetzte Substrat der exprimierten Luciferase gemessen, so ließ sich die Promotoraktivität charakterisieren.

3.3.1.1 Analyse von Deletionen des *Arfrp1*-Promotors mit Hilfe von Luciferase-Assays

Um die tatsächlichen regulatorischen Elemente des *Arfrp1*-Promotors zu ermitteln, wurden Deletionsmutanten des 5'-flankierenden Bereichs des *Arfrp1*-Gens hergestellt und vor das *Luciferase*-Gen kloniert. Abb. 13 zeigt die 5'-Deletionsanalyse des Promotorbereichs des *Arfrp1*-Gens. Dabei wurde die Promotoraktivität des Konstrukts mit der größten Aktivität, das auch gleichzeitig das längste Konstrukt war (-118 bp vor dem Transkriptionsstart bis +112 bp nach Transkriptionsstart), als 100% definiert. Nach Deletion der Basen -76 bis -53 waren nur ca. 25% der Ausgangsaktivität nachzuweisen. Nach Deletion der Basen -45 bis -23 war keine Promotoraktivität mehr nachzuweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Proteine, die die Transkription von *Arfrp1* kontrollieren, innerhalb dieser beiden Bereiche binden.

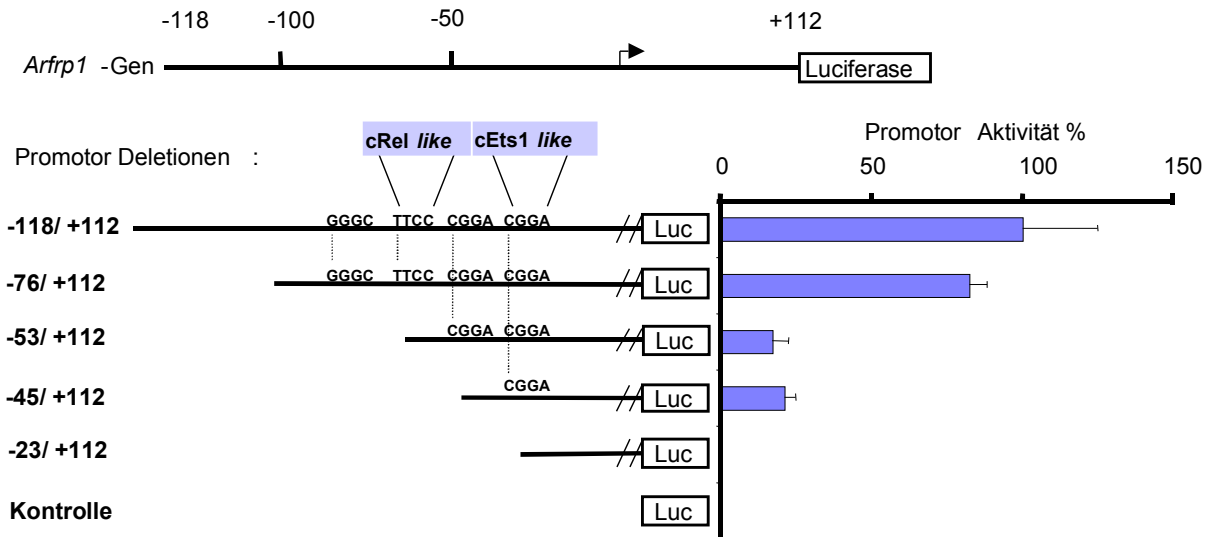


Abb. 13: Luciferase-Assays der Deletionen des *Arfrp1*-Promotors

Deletionen des 5'-flankierenden Bereichs wurden vor das *Luciferase*-Gen in pGL3-Basic[®] kloniert. COS-7-Zellen wurden mit diesen Konstrukten und mit pSVL- β -Gal als Kontrolle transient transfiziert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen wurden gemittelt und mit \pm S.E.M dargestellt. Als Kontrolle diente der pGL3-Basic[®] Leervektor.

3.3.1.2 Charakterisierung der Promotoraktivität nach Mutation putativer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

Um die für die Promotoraktivität wichtigen Sequenzbereiche zwischen den Basen -75 und -53 und den Basen -45 und -23 einzugrenzen und Hinweise auf mögliche regulatorische Elemente zu bekommen, wurden Mutationen des aktivsten Konstrukts hergestellt. Dabei wurden die über Datenbankrecherche ermittelten, potentiell regulatorischen Bindungselemente mutiert. Alle Mutationen wurden in *Core-Matrix*-Bereichen vorgenommen. Die Benennung der Mutationen erfolgte folgendermassen: Mut 1: Mutation der $\text{Nf}\kappa\text{B}$ -Bindungsdomäne, Mut 2: Mutation der cRel-Bindungsdomäne, Mut 3: Mutation des ersten cEts1-Bindungsereichs und Mut 4: Mutation der zweiten cEts1-Bindungsdomäne.

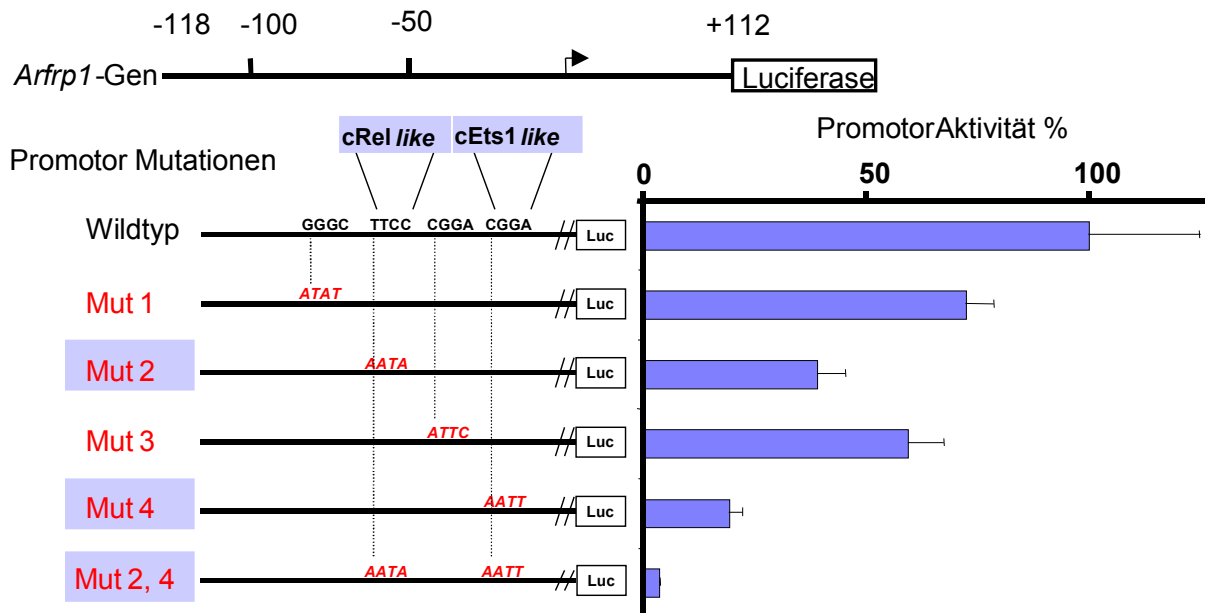


Abb. 14: Luciferase-Assays der Mutationen des *Arfrp1*-Promotors

Mutationen des *Arfrp1*-Promotorbereichs wurden vor das Luciferase-Gen in pGL3-Basic® kloniert. Gemeinsam mit pSVL- β -Gal wurden diese transient in COS-7-Zellen transfiziert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen wurden gemittelt und mit \pm S.E.M dargestellt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem pGL3-Basic® Leervektor transfiziert wurden. Mutationen wurden in folgenden potentiellen Bindungsstellen der regulatorischen Elemente eingeführt: Mut 1: NF κ B, Mut 2: cRel, Mut 3: erste cEts1-Bindungsdomäne, Mut 4: zweite cEts1-Bindungsdomäne.

Nach Mutation der cRel- (Mut 2) und der zweiten cEts1-Bindungsstelle (Mut 4) war die Promotoraktivität auf ca. 40% bzw. ca. 25% reduziert. Wurden die Bindungsdomänen für beide Transkriptionsfaktoren (cRel und cEts1) mutiert, konnte kaum noch Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lieferten einen ersten Hinweis dafür, dass die Basen -58 bis -54 und -35 bis -31 essentiell für die Promotoraktivität des *Arfrp1*-Gens sind, und ließen vermuten, dass die zwei Transkriptionsfaktoren cRel und cEts1 für die Regulation der *Arfrp1*-Expression von Bedeutung sind.

3.3.2 Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay des *Arfrp1*-Promotor-Bereichs

Mittels *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay* (EMSA) können Bindungen zwischen potentiellen Transkriptionsfaktoren und deren Bindungsdomäne nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob die Bereiche, die bereits über Luciferase-Assay ermittelt wurden, tatsächlich für die Transkription von *Arfrp1* essentiell sind, wurden zwei Sonden in einem EMSA eingesetzt und Transkriptionsfaktoren in Form von Kernproteinen aus COS-7-Zellen hinzugefügt. Man erkennt, dass die Zugabe von Kernextrakten sowohl eine Retardierung von Sonde A (enthält den Bereich der cRel-Bindungsstelle) als auch von Sonde B (enthält den Bereich der cEts1-Bindungsstelle) hervorrufen. Kernproteine konnten folglich an die Sonden binden. Wurden Sonden mit Mutation 2 oder Mutation 4 (siehe Kap. 3.3.1.2) eingeführt, wurde dieselbe Retardierung nicht mehr nachgewiesen (siehe Abb. 15). Eine Bindung der Kernproteine war an diesen mutierten Sonden nicht mehr möglich. Diese Ergebnisse lieferten einen weiteren Hinweis für die Bedeutung der Basen -58 bis -54 und -35 bis -31 bei der Bindung der regulatorischen Kernelemente im Promotorbereich des *Arfrp1*-Gens.

Um zu prüfen, ob die Retardierung der Sonden A und B von den über Datenbankrecherche ermittelten potentiellen Transkriptionsfaktoren hervorgerufen wurde, wurden dem obigen Versuchsansatz polyklonale Antikörper, die spezifisch cRel und cEts1 präzipitieren, zugefügt. Bindet der Antikörper an den DNA-Protein-Komplex, findet eine weitere Retardierung des Komplexes im Gel statt. Dieses Verfahren nennt man *Supershift*. Abb. 16 demonstriert allerdings, dass die Zugabe der Antikörper keinen zusätzlichen *Supershift* hervorruft, der nach Bindung der Transkriptionsfaktoren erwartet wurde.

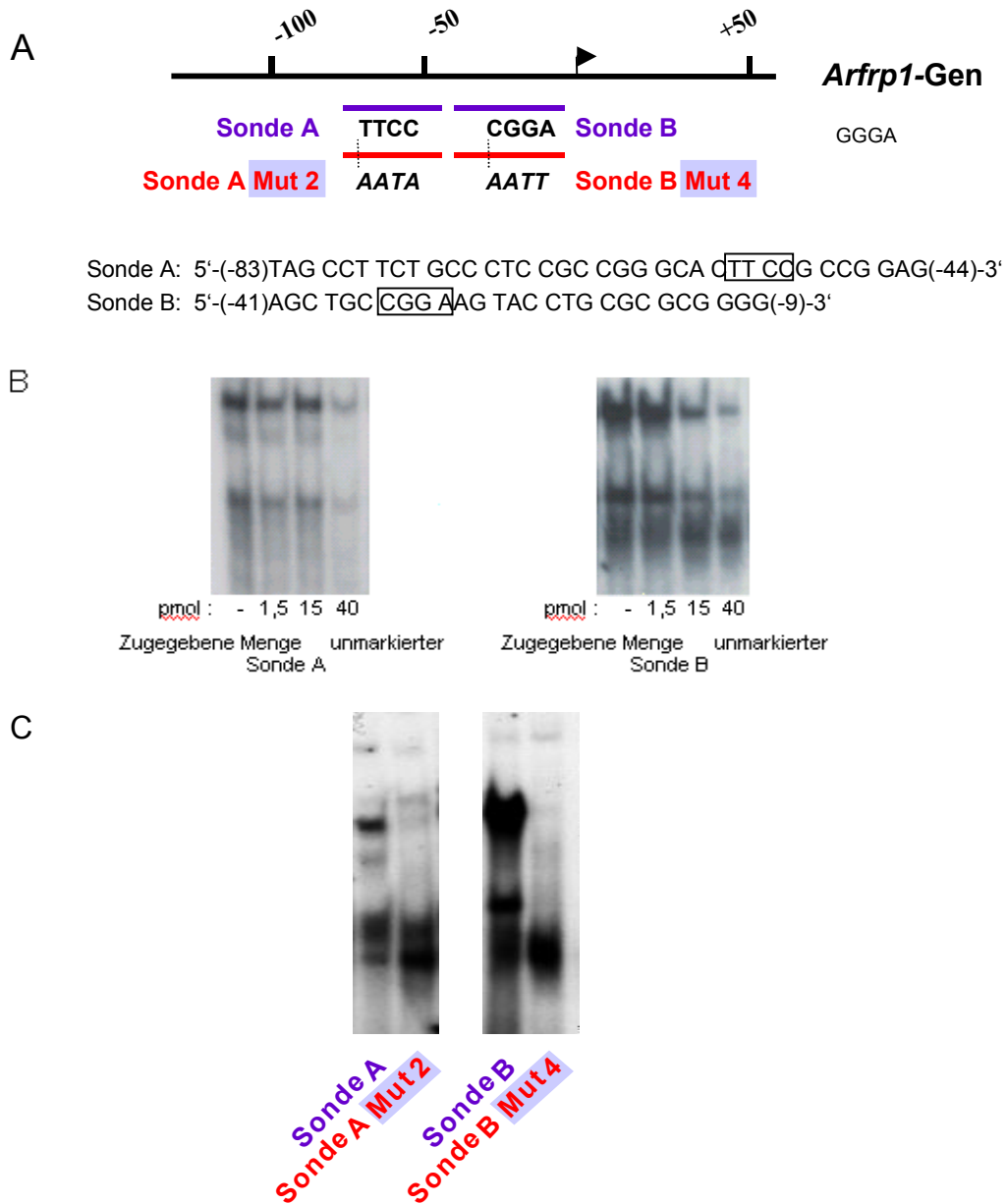


Abb. 15: Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay mit Sonden im Promotor von *Arfrp1*

A: Übersicht über die Lage der Sonden. Sonde A umfasst die bp –83 bis –44, Sonde B –41 bis –9. Mut 2 und Mut 4 stellen dieselben Mutationen dar, die bereits in den Luciferase-Assays erprobt wurden (siehe Kap. 3.3.1.2), in denen entweder die *Core*-Sequenz der cRel (Mut 2) oder der cEts1-Bindungsstellen (Mut 4) mutiert wurde. B: Kontrolle der Spezifität der Sonden. Zur Kontrolle der Spezifität der Sonden A und B wurden ansteigende Mengen der unmarkierten Sonden dem Gemisch zugefügt. C: Mutation der *Core*-Sequenz von cRel und cEts1. Nach Mutation der *Core*-Sequenzen der cRel und cEts1-Bindungsstellen ist kein *Shift* nachweisbar. Nach Inkubation der ³²P-markierten Sonden (20 000 cpm-50 000 cpm) mit 9,5 µg Kernproteinen aus COS-7-Zellen wurden die DNA-/Proteinkomplexe in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Trocknen des Gels erfolgte die Exposition auf einem Film für sechs Tage.

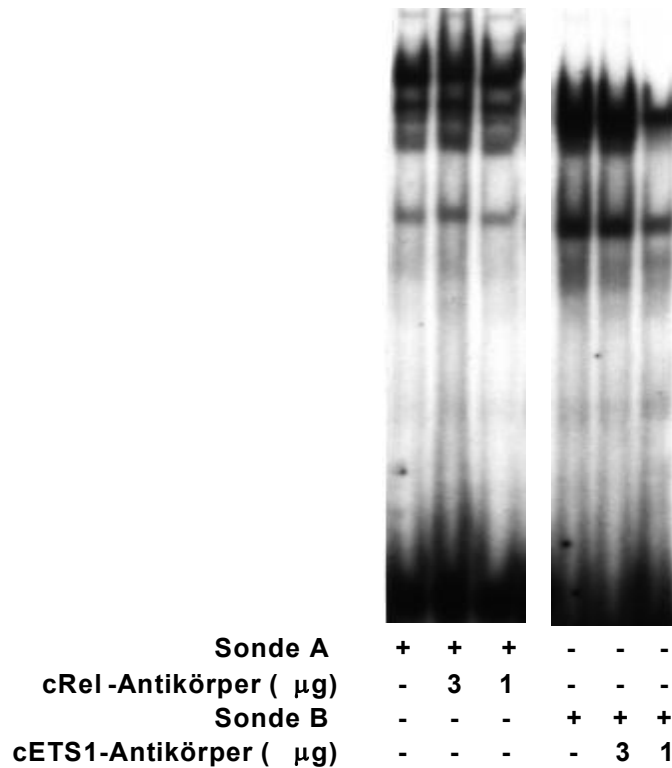
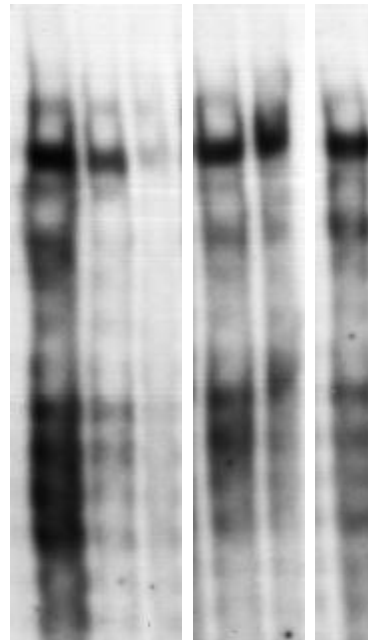


Abb. 16: Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay in An- und Abwesenheit von Antikörper gegen cRel und cEts1 (Supershift)

Nach Inkubation der ³²P-markierten Sonden (20 000 cpm-50 000 cpm) mit 9,5 µg Kernproteinen aus COS-7-Zellen wurden die DNA-Proteinkomplexe in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Trocknen des Gels erfolgte die Exposition auf einem Film für sechs Tage. Für den *Supershift* wurden die Kernextrakte zunächst 1 h mit entsprechender Menge Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) vorinkubiert.

Um zu untersuchen, ob an den beiden mittels Luciferase-Assay und EMSA ermittelten DNA-Bereichen dasselbe regulatorische Protein bindet, wurde ein EMSA durchgeführt, in dem die radioaktiv markierte Sonde A durch nicht-radioaktive Sonden verdrängt wurde. Abb. 17 zeigt, dass die unmarkierte Sonde B in steigender Konzentration tatsächlich in der Lage ist, die radioaktive Sonde A aus dem DNA-Proteinkomplex zu verdrängen. Enthielt Sonde A die Mutation 2, konnte sie dagegen die radioaktive Sonde A nicht aus dem DNA-Proteinkomplex verdrängen. Um zu zeigen, dass eine beliebige DNA nicht in der Lage ist die Sonde A zu verdrängen, wurde eine Kontroll Oligo-DNA dem Versuchsansatz zugesetzt. Wie der rechte Bildteil der Abb. 17 zeigt, ließ sich die radioaktiv markierte Sonde A nicht aus dem DNA-Proteinkomplex verdrängen.



Unmarkierte Sonde B (pmol)	-	1,5	40	-	-	-
Unmarkierte Sonde A mit Mut 2 (pmol)	-	-	-	-	40	-
Kontroll Oligo -DNA (pmol)	-	-	-	-	-	40

Abb. 17: Konkurrenz der Sonde A im *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay*

Nach Inkubation der ³²P-markierten Sonde A (50 000 cpm) mit 9,5 µg Kernproteinen aus COS-7-Zellen wurden, wie unter Abb. 16 beschrieben, zu den einzelnen Spuren unterschiedliche Mengen unmarkierte Sonde B, oder unmarkierte Sonde A mit Mutation 2, oder Kontroll Oligo-DNA hinzugefügt. Die DNA-Proteinkomplexe wurden in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Trocknen des Gels erfolgte die Exposition auf einem Film für sechs Tage.

3.4 Die *Arfrp1*-Knockout Maus

Um Erkenntnisse über die Funktion von ARFRP1 im gesamten Organismus zu gewinnen, wurde das *Arfrp1*-Gen in der Maus ausgeschaltet.

3.4.1 Konstruktion des *Arfrp1*-Knockout-Vektors

Nach Kartierung und Sequenzierung des *Arfrp1*-Gens konnte das *Knockout*-Konstrukt kloniert werden (siehe Kap. 2.2.4.1). Dabei wurden die Exons 2 und 3, die den Translationsstart und die Motive PM1, PM2 und G1 kodieren, gegen eine Neomycinresistenz-Kassette ausgetauscht. Außerdem enthielt das *Knockout*-Konstrukt etwa 2,5 kb des 5'- und 3'flankierenden Bereichs, um eine homologe Rekombination zu ermöglichen.

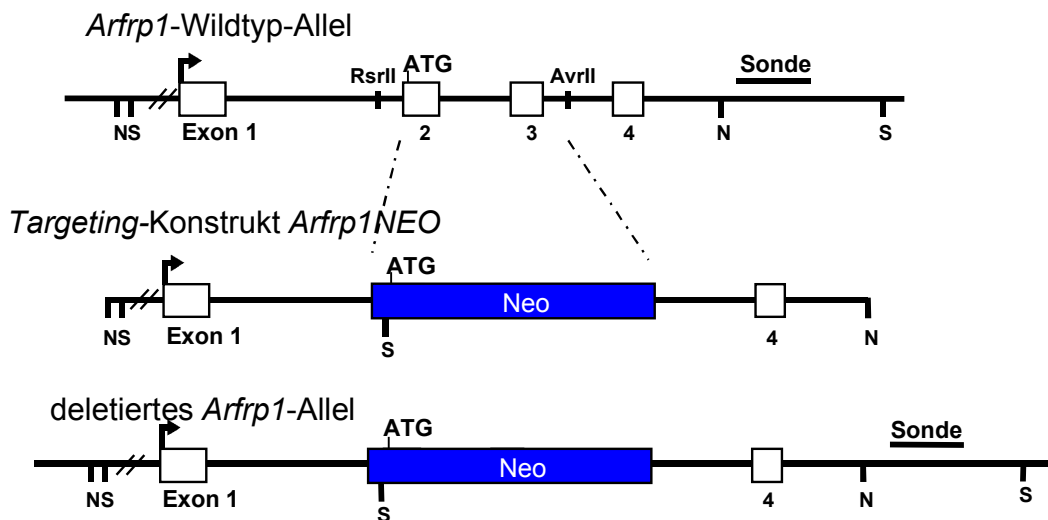


Abb. 18: Strategie zur Herstellung des Targeting-Konstrukts für die Deletion des *Arfrp1*-Gens
 Großbuchstaben bezeichnen die Schnittstellen für Restriktionsenzyme: N: *Nco* I, S: *Stu* I, R: *Rsr* II, A: *Ava* II. Mit der Sonde, die außerhalb des Targeting-Konstrukts liegt, wurden durch einen Restriktionsverdau mit *Stu* I homologe Rekombinationsereignisse nachgewiesen (siehe Abb. 19). Auch die Genotypisierung der Mäuse erfolgte über diese Methode (siehe Abb. 23).

Nach Linearisierung des Targeting-Konstrukts enthaltenden Vektors mit dem Restriktionsenzym *Not* I wurde dieser mittels Elektroporation transfiziert. Die

elektroporierten Zellen wurden auf *Feederzellen* kultiviert, und nach 24 h wurde eine Selektion gegen Neomycin mit G418 begonnen. Nach sechs Tagen konnten einzelne resistente Zellklone identifiziert werden, von denen 288 geerntet und auf homologe Rekombination des *Targeting*-Konstrukts untersucht wurden.

3.4.2 Homologe Rekombination in ES-Zellen

Durch Deletion von Exon 2 und 3 des *Arfrp1*-Gens und Einfügen der Neomycinresistenz-Kassette war das Restriktionsmuster eines *Knockout*-Allels im Vergleich zu einem Wildtyp-Allel verändert worden. Diese Veränderung konnte sowohl für eine Genotypisierung der G418-resistenten ES-Zellen, als auch später für die Genotypisierung der Mäuse verwendet werden. In Abb. 19 ist der Nachweis der homologen Rekombination in ES-Zellen gezeigt. Dabei erkennt man, dass die Einführung der Neomycinresistenz-Kassette eine zusätzliche *Stu I*-Schnittstelle erzeugte, so dass ES-Zellen mit homologer Rekombination nach Hybridisierung mit der externen Sonde in einem *Southern*-Blot eine zweite, (3,5 kb große) zusätzliche Bande zur Wildtyp-Bande aufwiesen.

DNA von Embryonalen Stammzellen :

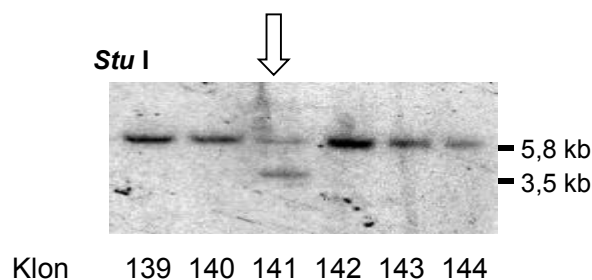


Abb. 19: *Southern*-Blot-Analyse der embryonalen Stammzellen

Beispielhaft wurden die ES-Klone 139-144 abgebildet. 20 µg ES-Zell-DNA wurden mit dem Restriktionsenzym *Stu I* über Nacht verdaut und nach Auftrennung in einem Agarosegel (0,8%) und Transfer auf eine Nylonmembran mit einer Sonde, die direkt außerhalb des *Targeting*-Bereichs liegt, hybridisiert. Sonde: Int4-Sonde (bp 5535-5915). Wildtyp-Klone zeigten eine einzelne Bande bei 5,8 kb, heterozygote Tiere zeigten zwei Banden, bei 5,8 kb und bei 3,5 kb.

3.4.3 Zucht der *Arfrp1*-defizienten-Mäuse

Zwei der vier homolog rekombinierten Stammzellklone wurden erneut in Kultur genommen und für die Injektion vorbereitet. Aus trächtigen Weibchen des Stammes C57/B6 wurden Blastozysten isoliert. ES-Zellen wurden unter einem Injektionsmikroskop mit einer Glaskapillare aufgesaugt und vorsichtig in das Blastozoele injiziert. War die Integration der ES-Zellen in die Blastozysten erfolgreich, entstanden sogenannte Chimäre. Diese waren mosaikartig aus einer Mischung von Zellen unterschiedlicher Herkunft aufgebaut. Die chimären Blastozysten wurden dann in den Uterus scheinchwangerer C57/B6 Mäuse transferiert. Von dem Stammzellklon 141 wurden 32 Blastozysten in 3 Weibchen transferiert. Nach ca. 18 Tagen wurden 13 chimäre Mäuse (5 Männchen, 8 Weibchen) geboren. Der Grad des Chimerismus konnte an der Fellfarbe abgelesen werden, da C57/B6-Mäuse schwarzes Fell besaßen und die Zellen des Stammes SvJ/129 braunes Fell kodierten. Lediglich zwei Männchen zeigten einen höheren Grad an Chimärismus und damit einen hohen transgenen Anteil, was an den braunen Flecken innerhalb des schwarzen Fells zu erkennen war. Nach sechs Wochen wurden diese Männchen mit C57/B6-Weibchen verpaart. Von den beiden chimären Männchen des Stammzellklons 141 erzeugte nur eines braune Nachkommen. Die F1-Generation bestand zu 60% aus braunen Nachkommen, die dann genotypisiert wurden.

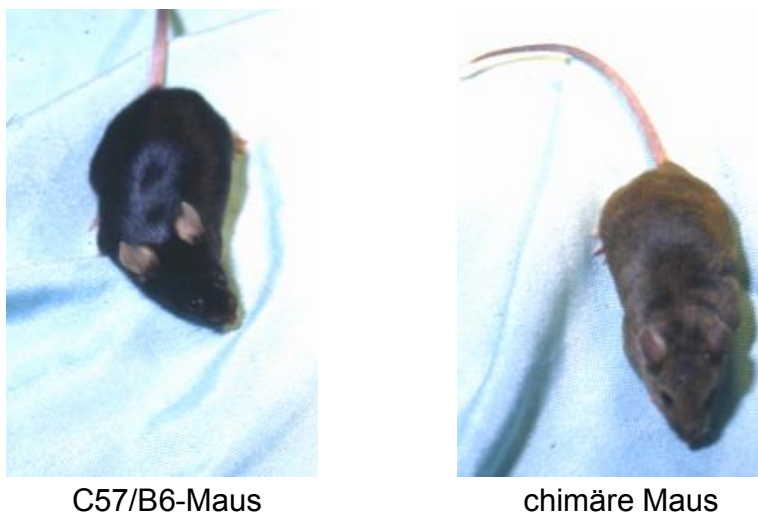


Abb. 20: Chimäre Maus im Vergleich zu einer C57/B6 Maus

3.4.4 PCR-Analyse und *Southern-Blot* der genomischen Mausschwanz-DNA

Eine Genotypisierung der Mäuse erfolgte entweder über PCR oder über *Southern-Blot*-Analyse. Um zwischen dem *Arfrp1*-Wildtyp-Allel und dem deletierten *Arfrp1*-Allel unterscheiden zu können, wurden *Primer* ausgewählt (siehe Abb. 21), die in einer PCR auf genomischer DNA eine ca. 200 bp große Bande beim Wildtyp-Allel ergaben (*Primer* A1 oder A2 mit C1 oder C2) und eine ca. 400 bp große Bande im Falle des deletierten *Arfrp1*-Allels (*Primer* B1 oder B2 mit C1 oder C2).

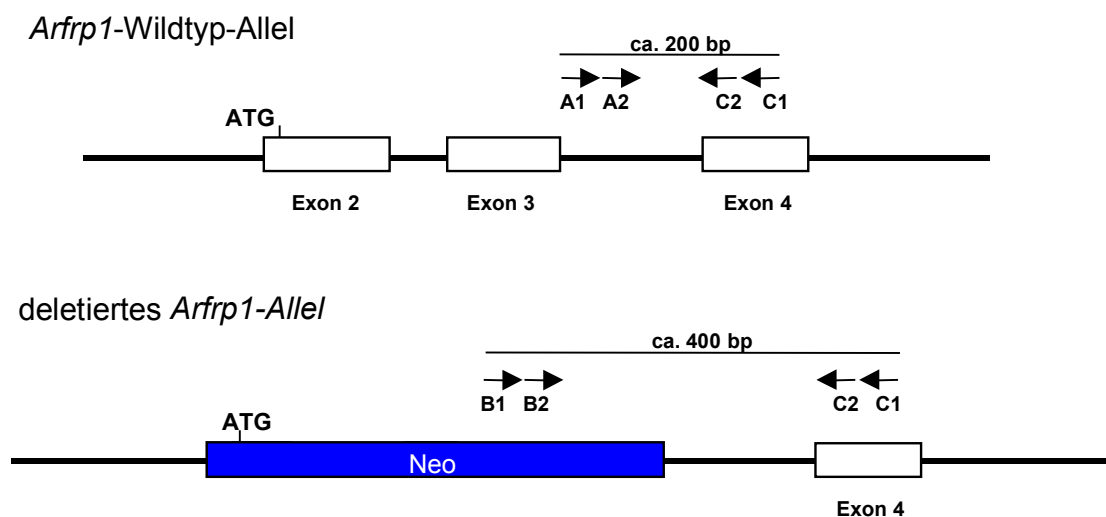


Abb. 21: Schematische Übersicht der PCR-Analyse der transgenen *Arfrp1*-Mäuse

Schematische Übersicht über die Unterschiede zwischen dem *Arfrp1*-Wildtyp-Allel und dem deletierten *Arfrp1*-Allel. ATG: Start Codon. Pfeile repräsentieren eingesetzte *Primer*, wobei A1: ARP-200-KO, A2: NestArp200KO, B1: NEO-400-KO, B2: NestNeo400KO, C1: KO-ARP-R und C2: NestKOArprev (siehe Kap. 2.2.2.3). PCR-Produkte: 200 bp: Bande des *Arfrp1*-Wildtyp-Allels, 400 bp: Bande des deletierten *Arfrp1*-Allels.

Bei einer Genotypisierung von Wildtyp-Mäusen erhielt man folglich eine einzelne Bande von ca. 200 bp Länge, von heterozygoten Mäusen erhielt man zwei unterschiedlich große Banden von ca. 200 und ca. 400 bp Länge und von *Knockout*-Mäusen eine einzelne Bande von ca. 400 bp Länge. Wie Abb. 23 exemplarisch zeigt wurde kein Tier identifiziert, das nur das 400 bp große PCR-Fragment aufweist.

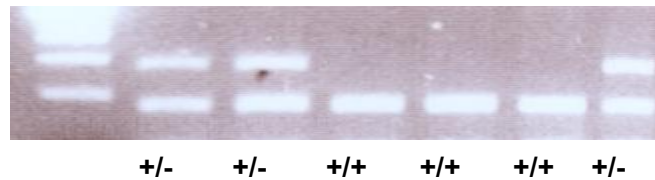


Abb. 22: PCR-Analyse von genomischer Mausschwanz-DNA

20 ng genomischer Mausschwanz-DNA wurden mittels PCR mit den *Primern* A1, B1 und C1 analysiert (siehe Abb. 21). Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und die DNA durch Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen.

Eine aufwendigere, aber zuverlässigere Methode der Genotypisierung war die *Southern-Blot-Analyse*. Dazu wurde genomische Mausschwanz-DNA über Nacht mit dem Restriktionsenzym *Stu* I verdaut, nach Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese auf eine Nylonmembran transferiert und mit der *Int4*-Sonde (bp 3092-3472) hybridisiert.

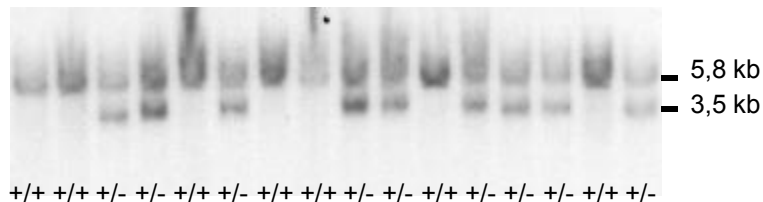


Abb. 23: Southern-Blot-Analyse von genomischer Mausschwanz-DNA der *Arfrp1*-Knockout-Mäuse

Nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym *Stu* I über Nacht und der Auftrennung in einem Agarosegel (0,8%) erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran, die mit der *Int4*-Sonde (bp 3092-3472) hybridisiert wurde.

Heterozygote Tiere der F1-Generation wurden gekreuzt, mit dem Ziel *Arfrp1^{-/-}*-Mäuse zu erhalten. Die Genotypisierung der F2-Nachkommen erfolgte wie oben beschrieben. Bei dieser Kreuzung hätte man nach Mendel folgende Verteilung der Nachkommen erwartet: 1:2:1 (*Arfrp1^{+/+}*: *Arfrp1^{+/-}*: *Arfrp1^{-/-}*). Tatsächlich konnten bei 94 genotypisierten Nachkommen der F2-Generation keine *Arfrp1^{-/-}*-Mäuse identifiziert werden. Dieser Befund ließ vermuten, dass Mutanten, denen das *Arfrp1*-Gen fehlt, nicht lebensfähig sind.

3.5 Analyse des Phänotyps der *Arfrp1*-Knockout-Mäuse

Da, wie von verschiedenen Autoren beschrieben (Makris *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Selley *et al.*, 2001), auch schon bei heterozygoten Tieren ein Phänotyp auftreten kann, wurden *Arfrp1*^{+/-}-Mäuse untersucht. Da durch das Ausschalten des *Arfrp1*-Gens die Embryos offensichtlich letal geschädigt waren, wurden *Arfrp1*^{-/-}-Embryos morphologisch untersucht.

3.5.1 Analyse der *Arfrp1*^{+/-}-Mäuse

Um zu prüfen, ob Tiere mit einem deletierten *Arfrp1*-Allel wie erwartet geringere Mengen ARFRP1 exprimieren, wurden die mRNA aus Hoden, Leber, Niere und Thymus von *Arfrp1*^{+/-} im Vergleich zu *Arfrp1*^{+/+}-Tieren analysiert. Zur Hybridisierung wurde die ARFRP1rf-Sonde (siehe Kap. 3.1.1) eingesetzt, die die gesamte Ratten cDNA umfasst. Abb. 24 zeigt, dass trotz des Ausschaltens eines Allels (*Arfrp1*^{+/-}) gleiche RNA-Mengen nachgewiesen werden konnten.

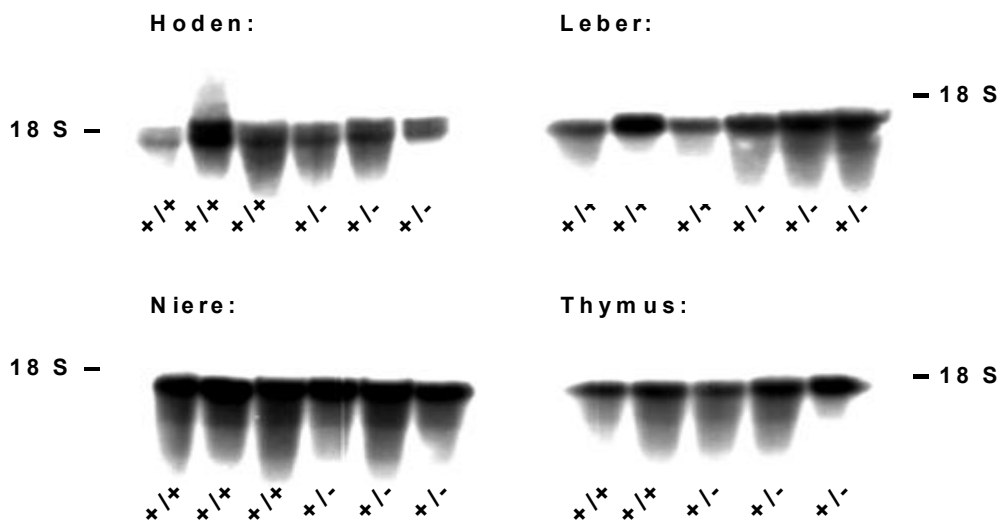


Abb. 24: Northern-Blots von Geweben von *Arfrp1*^{+/+}- und *Arfrp1*^{+/-}-Tieren

Gesamt-RNA wurde aus verschiedenen Organen isoliert und jeweils 30 µg über ein denaturierendes Gel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde diese mit einer ³²P-markierten ARFRP1rf - Sonde (Ratten cDNA 1-943 bp) hybridisiert und ein Autoradiogramm erstellt. 18 S und 28 S RNA wurden über eine Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht, sie dienten als Größenmarker und zeigten, dass identische RNA-Mengen aufgetrennt wurden.

Um zu prüfen, ob sich die Proteinmenge von ARFRP1 in Wildtyp- und heterozygoten Tieren unterscheidet, wurden *Western*-Blots hergestellt. Gesamtmembranpellets aus Leber, Niere und Hoden wurden, gelelektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem ARFRP1-Antikörper (polyklonaler Antikörper gegen GST-ARFRP1 der Ratte) inkubiert (siehe Abb. 25). ARFRP1 wies ein apparentes Molekulargewicht von 26 kDa auf. In allen untersuchten Geweben waren keine Unterschiede der ARFRP1-Expression zwischen *Arfrp1*^{+/+}- und *Arfrp1*^{+/-}-Tieren zu erkennen.

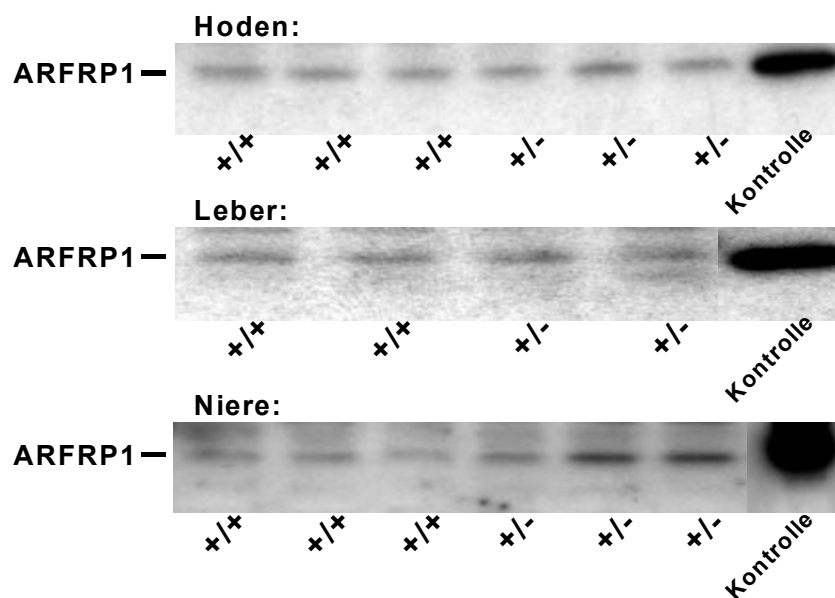


Abb. 25: *Western*-Blots von Gesamtmembranpellets der Hoden, Leber und Niere von *Arfrp1*^{+/+}- und *Arfrp1*^{+/-}-Tieren

20 µg der Proteine wurden über SDS-PAGE (14%) aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen ARFRP1-Antikörper inkubiert. Der immunchemische Nachweis erfolgte mit Hilfe von ¹²⁵I-Protein A. Als Kontrolle dienten 5 µg Protein aus COS-7 Zellen, die ARFRP1 transient überexprimieren.

Um Unterschiede zu Wildtyp-Tieren in Wachstum und Gewichtsverlauf von *Arfrp1*^{+/-}-Mäusen zu ermitteln, wurde der Gewichtsverlauf beobachtet. *Arfrp1*^{+/-}-Mäuse wurden dabei mit Geschwister-Wildtyp-Tieren verglichen und über einen Verlauf von 30 Wochen gewogen. Abb. 26 zeigt den Gewichtsverlauf dieser beiden Populationen. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der körperlichen Entwicklung dieser beiden Populationen.

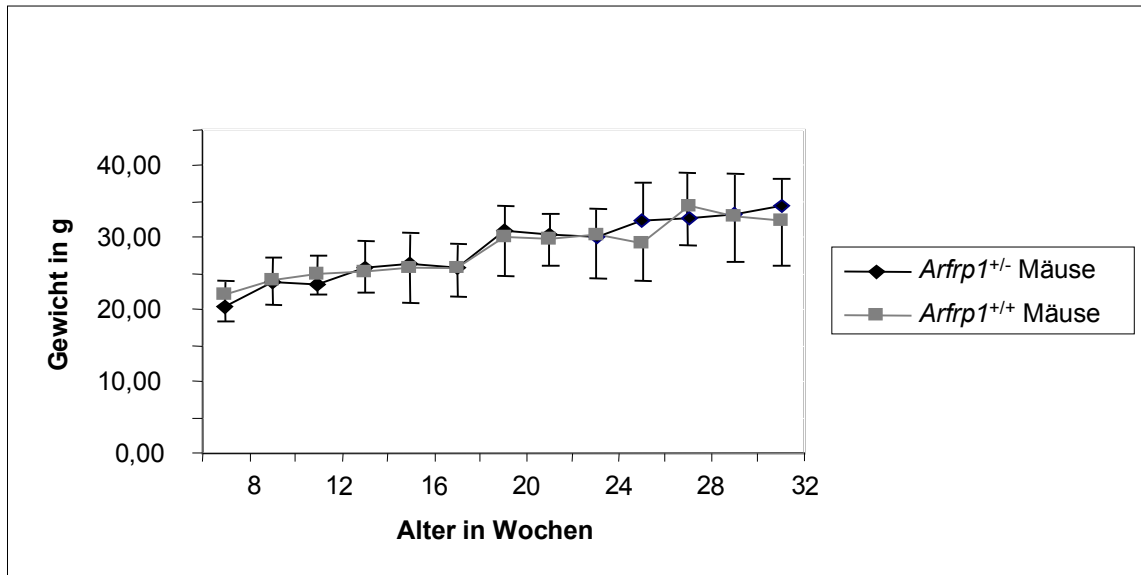


Abb. 26: Gewichtsverlauf von *Arfrp1*^{+/-}- und *Arfrp1*^{+/+}-Mäusen

Zwei Populationen von Mäusen wurden über den Zeitraum von 30 Wochen gewogen. Dabei wurden von insgesamt 224 Tieren 457 Messpunkte erhoben und mit \pm S.E.M. dargestellt.

Die Ergebnisse der *Northern*-Blots und *Western*-Blots zeigten, dass die Deletion von *Arfrp1* auf einem Allel zu keiner Reduktion der *Arfrp1*-mRNA und des ARFRP1-Proteins führt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass *Arfrp1*^{+/-}-Mäuse keinen Phänotyp aufweisen, worauf auch die identischen Gewichtsverläufe von *Arfrp1*^{+/-}- und *Arfrp1*^{+/+}-Tieren hinweisen.

3.5.2 Untersuchung der Embryos von *Arfrp1*-Mutanten

Zur Analyse des letalen Phänotyps von *Arfrp1*^{-/-}-Mäusen sollte geprüft werden, ab welchem Stadium der embryonalen Entwicklung ARFRP1 exprimiert wird. Abb. 27 zeigt einen *Northern*-Blot von RNA aus 4,5 bis 18,5 Tage alten Embryos der Maus. Zu allen Zeitpunkten wurde ARFRP1 schon exprimiert, allerdings steigt die Konzentration zum Tag 7,5 der embryonalen Entwicklung. Dies ist ein Hinweis darauf, dass ARFRP1 bereits in frühen Phasen der embryonalen Entwicklung exprimiert wird.

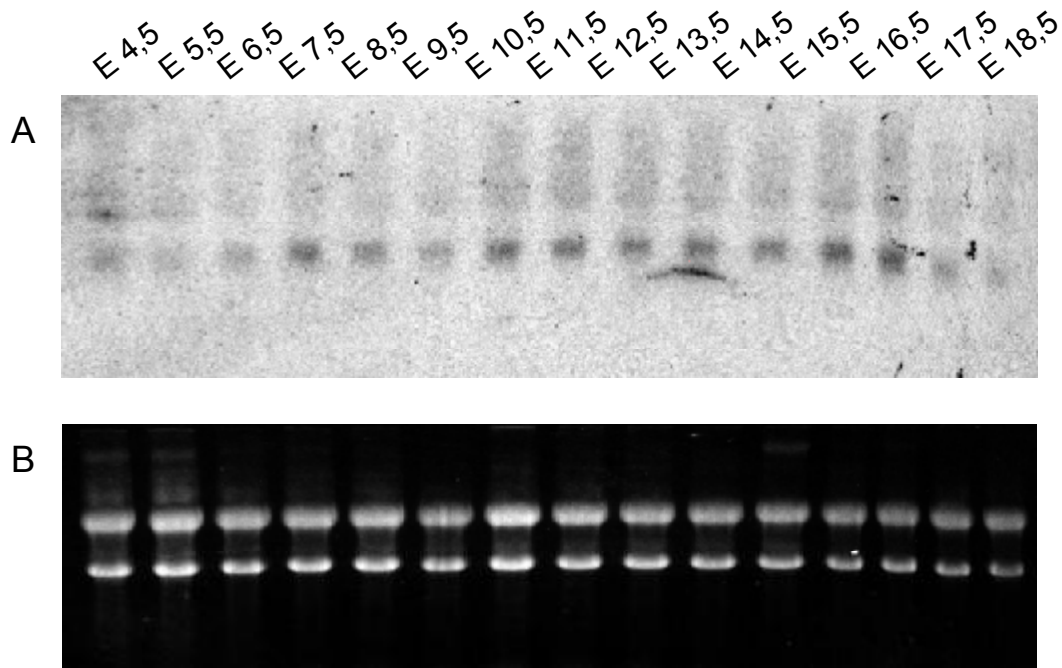


Abb. 27: Expression von ARFRP1 in 4,5 bis 18,5-Tage alten Embryos

A: Ein Blot der Fa. Seegene® mit je 20 µg Gesamt-RNA aus Embryos der Maus im Alter von Tag 4,5 bis Tag 18,5 wurde mit einer radioaktiven ARFRP1-Sonde hybridisiert. B: Mitgelieferte Kontrolle der Fa. Seegene®: 18 S und 28 S RNA wurden über eine Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht, sie dienen als Größenmarker und zeigen, dass identische RNA-Mengen aufgetrennt wurden.

3.5.2.1 *In-Situ*-Hybridisierung an gesamten Embryos

Zur Bestimmung des Expressionsmusters von ARFRP1 wurden *in-Situ*-Hybridisierungen an Paraffinschnitten von Mausembryos unterschiedlicher Embryonalstadien durchgeführt. Schnitte von in Paraffin eingebetteten Mausembryos von Tag 11, 14 und 16 wurden mit *Arfrp1*-spezifischen RNA-Sonden hybridisiert. Abb. 28 zeigt repräsentativ *in-situ*-Hybridisierungen an Paraffinschnitten von Tag 16,5 *post conceptionem*. Man erkennt an den hellen Bereichen in Schnitt A, dass ARFRP1 im Embryo ubiquitär exprimiert wird. Die Negativ-Kontrolle (Schnitt B) zeigt nur in einigen Bereichen einen unspezifischen Hintergrund. Allerdings ist dieser Hintergrund in einzelnen Geweben (z. B. Leber und Darm) unterschiedlich stark, was eine genauere Beurteilung der ARFRP1 Expression erschwert.

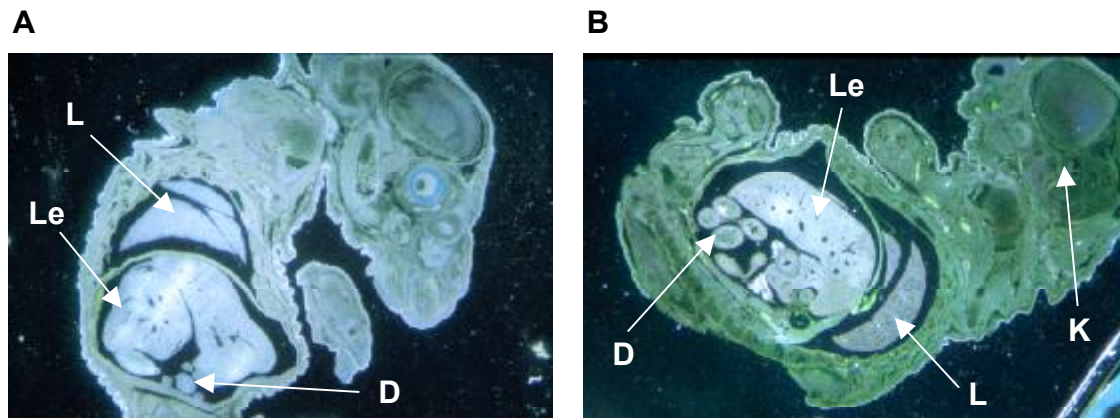


Abb. 28: In-Situ Hybridisierung von 16,5 Tage alten Embryos

Mikroskopische Aufnahmen unter einem Dunkelfeldmikroskop. Paraffinschnitte von 16,5 Tage alten Embryos wurden mit ^{33}P -markierten Sonden hybridisiert und mit Fotoemulsion überschichtet. A wurde mit einer *Antisense*-Sonde hybridisiert, während B zur Negativ-Kontrolle mit einer *Sense*-Sonde hybridisiert wurde. Die Vergrößerung beträgt ca. 25x. D: Darm, K: Kopf, L: Lunge und Le: Leber.

3.5.2.2 *In-vitro* Zucht von Blastozysten

Um festzustellen, ab welchem Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung Unterschiede im Wachstum und in der Entwicklung der *Arfrp1^{-/-}*-Embryos im Vergleich zu *Arfrp1^{+/-}*- und *Arfrp1^{+/+}*-Tieren auftreten, wurde das Wachstum von Blastozysten *in vitro* beobachtet. Dazu wurden aus einer Verpaarung von *Arfrp1^{+/-}*-Tieren Blastozysten aus dem Uterus des Weibchens gespült und eine Woche *in vitro* gezüchtet. Abb. 29 zeigt die anschließende Genotypisierung der Blastozysten mit Hilfe einer PCR. Insgesamt wurden bei 32 untersuchten Blastozysten *Arfrp1^{+/+}*, *Arfrp1^{+/-}* und *Arfrp1^{-/-}* in einem Verhältnis von 12:16:4 identifiziert.

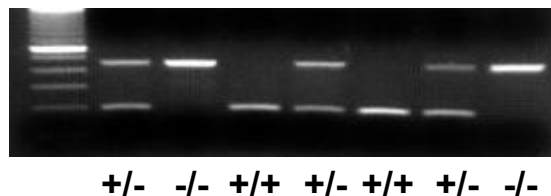


Abb. 29: Genotypisierung der Blastozysten

Die Genotypisierung von acht Blastozysten über PCR wurde beispielhaft abgebildet. Dabei wurde die gesamte Blastozyste lysiert und mittels PCR mit den *Primern* A1, B1 und C1 analysiert (siehe **Abb. 21**). Die PCR-Produkte wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt, und die DNA durch Ethidiumbromid Färbung nachgewiesen.

Nach einer Ruhepause von zwei Tagen wurden die Blastozysten täglich fotografiert. Abb. 30 zeigt *Arfrp1*^{+/+}, *Arfrp1*^{+/-} und *Arfrp1*^{-/-}-Blastozysten unterschiedlichen Alters. Während der 9,5 Tage langen Beobachtung zeigte sich, dass sowohl trophoblastische Zellen als auch Zellen der intrazellulären Masse (ICM) proliferieren. Die ICM stellt Zellen dar, die ungerichtet differenzieren und als Mischung unterschiedlicher Zellen vorliegen. Zwischen den Blastozysten der unterschiedlichen Genotypen konnten allerdings keine Unterschiede festgestellt werden.

Da ein Phänotyp durch das Fehlen von ARFRP1 im Blastozystenstadium nicht nachzuweisen war, wurde die Entwicklung der Embryos zu späteren Stadien untersucht.

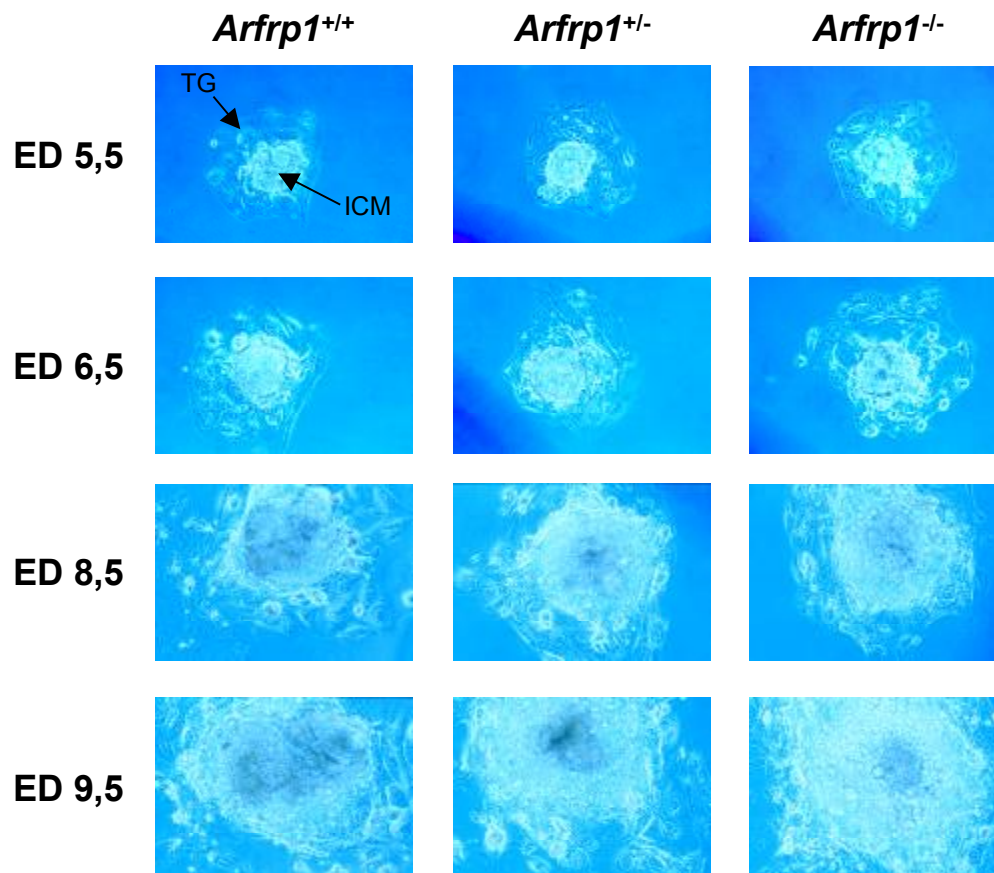


Abb. 30: Mikroskopische Untersuchungen von *in vitro* gezüchteten Blastozysten.

Um Blastozysten für eine *in-vitro* Zucht zu gewinnen, wurden heterozygote Mäuse verpaart. 3,5 Tage nach der Verpaarung wurden 32 Blastozysten aus den Uteri von vier verschiedenen Weibchen gespült, auf 0,1% Gelatine mit M2-Medium überschichtet und über den Zeitraum von einer Woche beobachtet. Bei einer Vergrößerung von 200-fach wurde täglich fotografiert. ED: embryonaler Entwicklungstag, TG: trophoblastische Zellen, ICM: intrazelluläre Masse.

3.5.2.3 Untersuchung präparierter Embryos zum Tag 7,5 *post conceptionem*

Da auf Grund der Untersuchungen an Blastozysten die Vermutung bestand, dass ARFRP1 in einer späteren Phase der embryonalen Entwicklung eine essentielle Funktion einnimmt, wurden heterozygote Mäuse gekreuzt. Embryos wurden zum Tag 7,5 *post conceptionem* präpariert und im Anschluss genotypisiert. Abb. 31 zeigt einen Vergleich von *Arfrp1^{+/+}*-, *Arfrp1^{+/-}*- und *Arfrp1^{-/-}*-Embryos:

Dabei ist zu erkennen, dass *Arfrp1^{-/-}*-Embryos am Tag 7,5 deutlich kleiner und schlechter entwickelt sind als ihre Geschwister vom anderen Genotyp. Sie sind vermutlich in einer Entwicklungsphase gestört und unterscheiden sich demnach von den anderen Embryos. Das mütterliche Gewebe (M) ist hingegen bei allen Genotypen etwa gleich entwickelt.

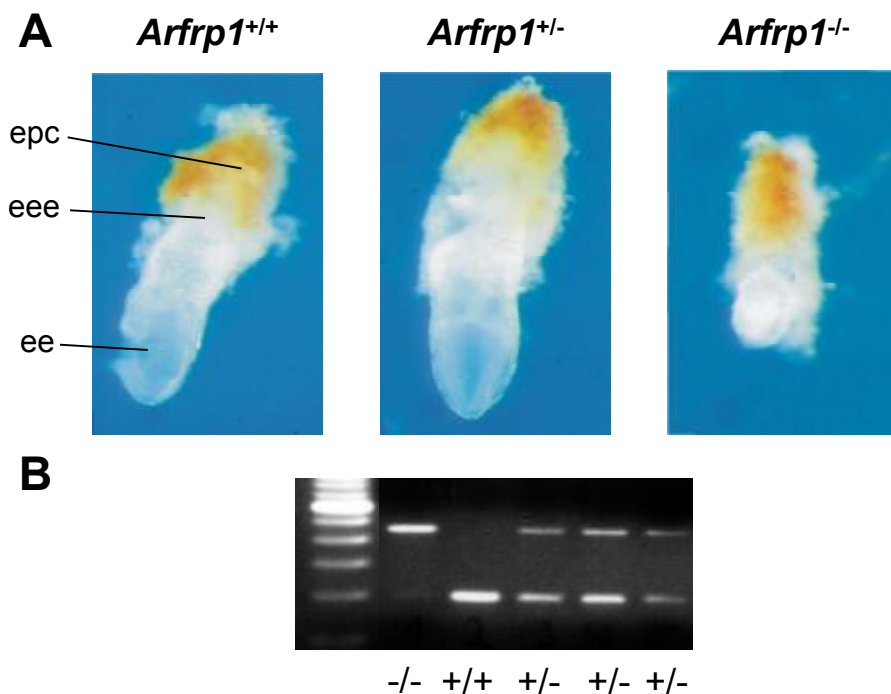


Abb. 31: Vergleich von *Arfrp1^{+/+}*-, *Arfrp1^{+/-}*- und *Arfrp1^{-/-}*-Embryos zum Tag 7,5 *post conceptionem*. A: Embryos aus einer Kreuzung von heterozygoter Mäusen wurden zum Tag 7,5 *post conceptionem* präpariert und verglichen. epc:, eee: Extraembryonisches Ektoderm, ee: Embryonisches Ektoderm. B: Genotypisierung der Embryos über PCR. Bei 11 untersuchten Embryos wurde eine Verteilung von 1:7:3 (+/+:+/-:-/-) gefunden.

3.5.2.4 H/E-Färbung und TUNEL-Assays

Bei den histologischen Untersuchungen an Paraffinschnitten von Embryos konnte in der H/E-Färbung beobachtet werden, dass einzelne Embryos eines Entwicklungstages eine unterschiedliche Morphologie besaßen (siehe Abb. 32). Anhand dieser Unterschiede wurden die Embryos als Kontroll-Tiere oder *Arfrp1*^{-/-}-Tiere klassifiziert. Um festzustellen, ob diese Unterschiede durch das Absterben des gesamten Embryos oder bestimmter Bereiche des Embryos entstanden sind, wurden Paraffinschnitte von 5,5 bis 9,5 Tage alten Embryos mit Hilfe des *TdT-FragEL DNA Fragmentation Detection Kit* untersucht. Abb. 32 zeigt Serienschnitte von 5,5 bis 9,5 Tage alten Embryos jeweils als H/E-Färbung und nach einem TUNEL-Assay. Am Tag 5,5 zeigten alle untersuchten Embryos die gleiche Morphologie. Im Zentrum befindet sich der primitive Embryo umgeben von mütterlichem Gewebe. Zum Zeitpunkt ED 6,5 erkennt man in der Kontrolle den Embryo im Stadium des Eizylinders. Sowohl embryonale als auch extraembryonale Regionen sind gut strukturiert. In *Arfrp1*^{-/-}-Embryos sind die Zellen schlechter differenziert. In dem mit dem TUNEL-Assay behandelten Schnitt erkennt man in der proamniotischen Höhle braune, apoptotische Zellen, am Rand des Embryos scheinen sich die Zellen weiterzuentwickeln.

Am nächsten Tag der embryonalen Entwicklung sind die Unterschiede zwischen Kontroll-Embryos und *Arfrp1*^{-/-}-Embryos noch deutlicher zu erkennen. Normale Embryos weisen gut definierte Strukturen auf: man erkennt die drei Keimblattschichten Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Die *Arfrp1*^{-/-}-Embryos waren dagegen deutlich kleiner als die Kontroll-Embryos, eine Differenzierung zu den Keimblattschichten war nicht zu erkennen. Im Zentrum des Embryos wurde verstärkt Apoptose nachgewiesen. Zwischen Tag 7,5 und 8,5 waren bei Kontroll-Embryos deutliche Fortschritte in der Entwicklung zu erkennen. Sie wiesen deutliche Strukturen primitiver Organe auf. Embryos, in denen das *Arfrp1*-Gen ausgeschaltet war, hatten sich nicht weiterentwickelt. Vermutlich hat zu diesem Zeitpunkt die Resorption durch das mütterliche Gewebe bereits begonnen.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass Bereiche des *Arfrp1*^{-/-}-Embryos absterben und dies zur Degradation und schließlich zur Resorption des gesamten Embryos führt. Bei Untersuchungen von 5,5 Tage alten Embryos wurden keine Auffälligkeiten in der Entwicklung und kaum apoptotische Zellen gefunden. Da ab dem Tag 6,5 der embryonalen Entwicklung ein Bereich mit apoptotischen Zellen identifiziert wurde, scheint das Fehlen des *Arfrp1*-Gens in einem Entwicklungsstadium zwischen Tag 5,5 und Tag 6,5 zum programmierten Zelltod zu führen. Da zu diesem Zeitpunkt die Gastrulation stattfindet, ist zu vermuten, dass die Entwicklung einer oder mehrerer Keimblattschichten durch das Ausschalten des *Arfrp1*-Gens negativ beeinflusst ist.

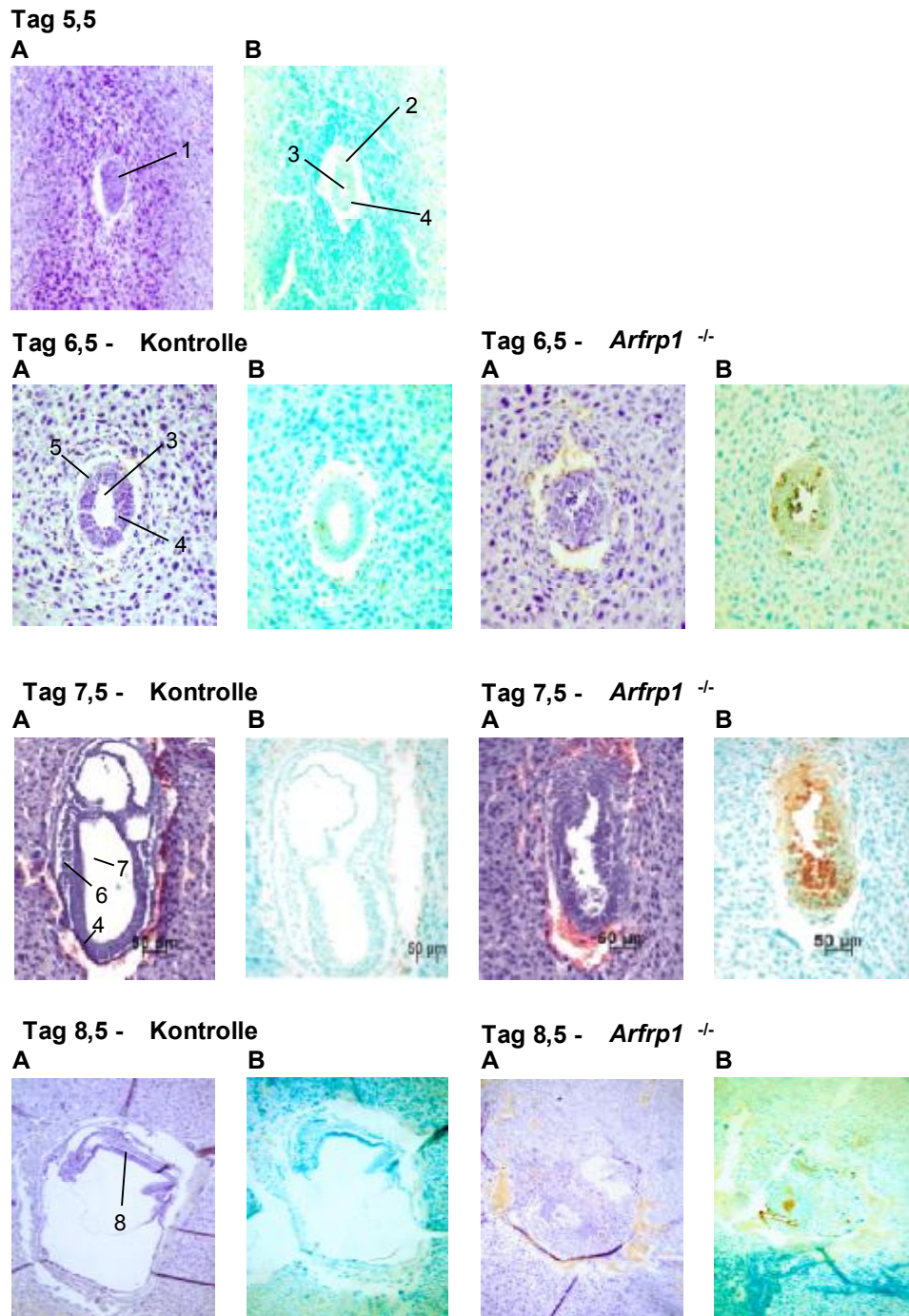


Abb. 32: H/E-Färbung und TUNEL-Assays von Schnitten von Embryos in Uteri an embryonalen Entwicklungstagen 5,5 bis 8,5

6,5 und 7,5 Tage alte Embryos wurden in Paraffin eingebettet und Serienschritte hergestellt. Aufeinander folgende Schnitte wurden als H/E-Färbung oder mit Hilfe des TUNEL-Assays (*TdT-FragEL DNA Fragmentation Detection Kit*) untersucht. A: H/E-Färbung, B: TUNEL-Assay. Tag 5,5, 7,5 und 8,5 stellen Sagittalschnitte, Tag 6,5 Transversalschnitte dar. 1: Embryo im Stadium des Eizylinders, 2: Extraembryonisches Ektoderm, 3: Proamnionhöhle, 4: Embryonisches Ektoderm, 5: Embryonisches Endoderm, 6: Mesoderm, 7: Amnionhöhle, 8: starke Gewebsdifferenzierung.

Da eine genaue Genotypisierung der Embryos bisher nicht möglich war, stellt Tab. 2 eine Übersicht über die Anzahl der gesunden und apoptotischen Embryos dar:

Embryonaler Tag	Anzahl der Embryos	TUNEL pos.
5,5	11	0
6,5	13	3
7,5	14	5
8,5	9	1
9,5	8	2
Gesamtzahl:	55	11
Gesamtzahl ohne embryonalen Tag 5,5:	44	11

Tab. 2: Zusammenstellung der Beurteilung von Embryos im Alter zwischen 5,5 und 9,5 Tagen post conceptionem

Arfrp1^{+/-}-Mäuse wurden verpaart und Serienschnitte der Uteri wie in Kap.2.2.6.3 hergestellt. Die Schnitte wurden mit H/E gefärbt oder einem TUNEL-Assay unterzogen. Alle phänotypisch unauffälligen (*Arfrp1^{+/+}* und *Arfrp1^{+/-}*) und TUNEL-positiven (*Arfrp1^{-/-}*) Embryos wurden zusammengestellt.

Die Auflistung in Tab. 2 verdeutlicht, dass am Tag 5,5 der embryonalen Entwicklung alle untersuchten Embryos unauffällig waren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass ARFRP1 für die Entwicklung bis zu diesem Zeitpunkt keine essentielle Rolle spielt. Fasst man die phänotypische Auswertung der folgenden Entwicklungstage zusammen, so zeigten von 44 Embryos 33 einen normalen Phänotyp und 11 Embryos Bereiche mit apoptotischen Zellen. Diese Verhältnis entspricht exakt der nach Mendel erwarteten Verteilung.

4 DISKUSSION

4.1 Die komplexe genomische Organisation von *Arfrp1* und die Stellung von ARFRP1 innerhalb der ARF-Familie

Die genomische Organisation von *Arfrp1* unterscheidet sich deutlich von anderen *Arf* oder *Arf*'s und auch von anderen *Ras*-GTPasen. Die 5'-UTR, der ORF und das 3'-UTR des *Arfrp1*-Gens verteilen sich auf acht Exons (mit sieben Introns), während andere Gene der *Ras*-homologen GTPasen sich auf maximal sechs Exons verteilen (siehe Abb. 9). *Arf1* und *Arf3* sind sehr ähnlich organisiert, der ORF wird von 4 Exons kodiert. Der ORF von *Arf4*, einem eng mit *Arfrp1* verwandten Gen, ist sogar nur auf einem einzigen Exon lokalisiert, so dass vermutet wird, dass das Gen durch Retroposition eines *Arf* oder *Arf-like* Gens entstanden ist (Jacobs *et al.*, 1999).

Es wird immer noch kontrovers diskutiert, ob die Introns eines Gens in der evolutionären Entwicklung früh oder spät gebildet wurden. Vertreter der *Introns Early*-Theorie sind der Auffassung, dass Introns sehr alt sind und im Laufe der Evolution verloren wurden (Gilbert *et al.*, 1997). Andere Experten hingegen vertreten mit der *Introns Late*-Theorie die Meinung, dass *spliceosomale* Introns sich erst später in der Evolution in Gene der Eukaryoten eingefügt haben (Cho and Doolittle, 1997; Logsdon, 1998).

Aussagen über die evolutionäre Entwicklung von *Arfrp1* müssen daher anhand anderer Hinweise getroffen werden: In Hefe existiert ein dem ARFRP1 homologes Protein *yArf3* (Huang *et al.*, 1998). Diese Tatsache zeigt, dass ARFRP1 schon in frühen, primitiven Zellen Bedeutung erlangt hat. Die These, dass ARFRP1 früh in der Entwicklungsgeschichte aufgetreten ist und eine essentielle Bedeutung erlangte, wird durch die Tatsache gestützt, dass ARFRP1 in den meisten Spezies von *Drosophila* bis zum Menschen exprimiert wird.

Innerhalb der ARF-Familie nimmt ARFRP1 eine Sonderstellung ein. Das Protein weist eine Insertion von acht Aminosäuren zwischen dem PM1- und PM2-Motiv auf und besitzt einen deutlich längeren C-Terminus. Es unterscheidet sich in seiner posttranslationalen Modifikation und seiner subzellulären Lokalisation von ARF und ARL-Proteinen. Da keine Isoformen von ARFRP1 existieren, ist ARFRP1 der einzige Vertreter dieser Subfamilie innerhalb der ARF-Familie. Es haben sich keine anderen ARFRP1-verwandten Proteine entwickelt, die die anscheinend essentielle Funktion von ARFRP1 im Laufe der Evolution übernehmen konnten.

4.2 Die Chromosomale Lokalisation von *Arfrp1*

Arfrp1 ist auf dem Chromosomabschnitt 20q13.3 gemeinsam mit vier weiteren Genen lokalisiert. Dieser Abschnitt wurde von Bai *et al.* (2000) im Rahmen der Untersuchung des Proteins M68/DcR3 charakterisiert. Dieses Protein ist ein Mitglied der Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptor-Familie und wird in menschlichen Lungen- und Gastrointestinaltumoren stark amplifiziert vorgefunden. Auch in 44% der menschlichen Adenokarzinome wird M68/DcR3 hochreguliert. Dem Protein wird eine Rolle bei der Fas-regulierten Apoptose zugesprochen; M68/DcR3 bindet dabei an den Apoptose-induzierenden Liganden Fas-L.

Da die gesamte Region 20q13.3 mit Gen-Amplifikation und Reorganisation in menschlichen Tumoren in Verbindung gebracht wird, liegt die Vermutung nahe, dass auch *Arfrp1* eine Rolle in diesem Zusammenhang spielt. Von Bai *et al.* (2000) und Schürmann *et al.* (unveröffentlicht) wurde untersucht, ob auch *Arfrp1* in Tumoren hochreguliert wird. Die Ergebnisse zeigen jedoch keine Amplifikation der RNA von *Arfrp1* unter diesen Bedingungen und lassen vermuten, dass *Arfrp1* keine mitogene Funktion hat.

4.3 Der Promotorbereich des *Arfrp1*-Gens

Durch Vergleich mit EST-Sequenzen anderer auf dem Chromosom 20q13.3 lokalisierter Gene ist der Promotorbereich auf 60 bp vor dem Transkriptionsstart von *Arfrp1* eingrenzbar (siehe Abb. 12). Der Vergleich der genomischen Sequenz der Maus mit der cDNA der Ratte und mit EST-Sequenzen der Maus liefert NF κ B-, cRel-, zwei cEts1-, Elk1- und IK2- als mögliche Bindungsdomänen für Transkriptionsfaktoren. Der Vergleich der Sequenzen des Promotors von *Arfrp1* innerhalb der Spezies Maus und Mensch liefert lediglich eine Übereinstimmung der Bindungsbereiche cRel und cEts1 (siehe Abb. 12).

Mit Hilfe von seriellen 5'-Deletionen konnten zwei Bereiche identifiziert werden, die für die Promotoraktivität von *Arfrp1* essentiell sind (siehe Abb. 13). Auch in einem *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay* wurde bestätigt, dass Kernextrakte an diese DNA-Sequenzen binden (siehe Abb. 15). Mutationen erwiesen, dass diese Regionen exakt den Bindungssequenzen der Transkriptionsfaktoren cRel und cEts1 entsprechen (siehe Abb. 14 und Abb. 15). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass cRel und cEts1 die Transkription des *Arfrp1*-Gens regulieren.

In einer Verdrängungsreaktion wurde die (radioaktiv markierte) Sonde A, welche die Bindungsdomäne cRel enthielt, durch die (nicht-radioaktiv markierte) Sonde B, welche die Bindungsdomäne cEts1 enthielt, verdrängt. Dies lässt darauf schließen, dass beide ermittelten DNA-Bereiche an die selben Kernproteine binden (siehe Abb. 17). Dabei war der DNA-Bereich mit der cETS1-Bindungsdomäne in der Lage, den DNA-Bereich mit der cRel-Bindungsdomäne aus einem Komplex mit entsprechenden Kernproteinen zu verdrängen. Demnach könnte die Transkription von dem gleichen Faktor reguliert werden.

cRel ist ein Transkriptionsfaktor, der zur NF κ B/Rel Familie gehört. Fünf Mitglieder der Familie sind in Säugern bekannt. Die Expression dieser Proteine wird u. a. von Ras (Mitin et al., 2001) aber auch von Rho, Cdc42 und Rac1 (Perona et al., 1997; Karnoub

et al., 2001) reguliert. Rel-Proteine sind hauptsächlich für ihre Rolle in der Immunantwort bekannt, speziell als koordinierende Elemente bei der Antwort des Organismus auf Infektionen, Stress oder Verletzungen (Sha, 1998).

NF κ B/Rel-Proteine sind ubiquitär im Zytoplasma der meisten eukaryotischen Zellen vorhanden und binden als Homo- oder Heterodimere an die DNA. Nur als Dimere sind sie in der Lage, eine Genexpression auszulösen (Gosh *et al.*, 1998). Eine Möglichkeit besteht darin, dass cRel für die Transkription von *Arfrp1* ein Heterodimer bildet. Das zweite, bislang noch unbekannte Protein, würde demnach an der zweiten Region des *Arfrp1*-Promotors binden.

Da cRel auch eine Rolle in der Transkription von anti-apoptotischen Proteinen spielt (Bernard *et al.*, 2001a+b) und *Arfrp1*^{-/-}-Mutanten Apoptose zeigten, wäre cRel als regulatorisches Element im *Arfrp1*-Promotor denkbar. Dann müsste spekuliert werden, dass ARFRP1 als anti-apoptotisches Protein in der Gastrulationsphase fungiert und durch dessen Ausschalten verstärkt Apoptose stattfindet (siehe Abb. 32 und Kap. 4.4). Tatsächlich haben Untersuchungen ergeben, dass ein Rel-homologes Protein in *Xenopus* während der embryonalen Entwicklung eine basale Rolle in der Regulation der Zelldifferenzierung spielt (Yang *et al.*, 1998).

Der Transkriptionsfaktor cEts1 gehört zu einer sehr großen Familie der DNA-Expression-regulierenden Elemente. Man findet sie in allen Spezies, von spongoiden bis zu menschlichen Zellen (Sementchenko and Watson, 2000). cEts1 löst die Transkription verschiedenster Gene aus und spielt dabei in Säugerzellen eine Rolle bei Entwicklungsprozessen. So werden Gene, die zelluläre Proliferation, Differenzierung, Migration, Apoptose und Zell-Zell-Interaktionen regulieren, von Ets-Faktoren kontrolliert (Maroulakou and Bowe, 2000).

Ets-Faktoren lösen die Transkription von Genen aus, indem sie an eine purinreiche DNA-Sequenz binden. Diese sogenannte *Core*-Matrix ist umgeben von einer Erkennungs-Matrix, die bis zu 15 bp lang sein kann. Interessanterweise hat man feststellen können, dass sich sowohl die Sequenz der *Core*-Matrix als auch der

Erkennungs-Matrix sehr stark von Gen zu Gen unterscheiden können (Ghysdael and Boreux, 1997; Graves and Peterson, 1998). In der Maus konnten tatsächlich zwei cEts1-Bindungsdomänen identifiziert werden, wobei sich im ersten Fall die Erkennungs-Matrix, im zweiten Fall sowohl Core-Matrix als auch Erkennungs-Matrix in den jeweiligen essentiellen Promotorbereichen befinden. Da zwischen der *Arfrp1*-Promotorsequenz der Maus und des Menschen in diesen Bereichen hohe Homologien bestehen, ist es wahrscheinlich, dass cEts1 die Transkription von *Arfrp1* reguliert. Während der embryonalen Entwicklung ist die Ets1-Expression hochreguliert, und es konnte gezeigt werden, dass cEts1 in Zellen des Mesoderms bei morphogenetischen Prozessen, z. B. der Organbildung, eine Rolle spielt (Kola *et al.*, 1993).

Über einen sogenannten *Supershift* sollte bestätigt werden, dass cRel und cEts1 die Expression von *Arfrp1* regulieren (siehe Abb. 16). Die eingesetzten Antikörper haben jedoch wider Erwarten nicht an den DNA-Kernprotein-Komplex gebunden. Dadurch ist diese These in Frage gestellt.

Beide potentiellen Transkriptionsfaktoren stammen aus großen Familien mit vielen homologen Proteinen, die z. T. auch ähnliche Bindungsdomänen besitzen. Es ist möglich, dass nicht die über die Datenbanken ermittelten Transkriptionsfaktoren an den Promotor von *Arfrp1* binden, sondern ihre homologen Proteine. Da für den *Supershift* spezifische Antikörper eingesetzt wurden, ist es denkbar, dass diese nicht in der Lage waren, an den DNA-Kernprotein-Komplex zu binden. Damit stellt sich die Frage, ob cRel und cEts1 tatsächlich für die Transkription von *Arfrp1* zuständig sind, oder eventuell Proteine, die ihnen homolog sind.

Zur genauen Identifizierung regulatorischer für die Transkription von *Arfrp1* notwendiger Elemente sind noch weitere Versuche nötig. Die Beteiligung von cRel und cEts1 könnte z. B. durch Co-Expression von cRel oder cEts1 mit Promotorkonstrukten und anschließender *Reporterassays* geprüft werden. Zudem könnten die beiden Transkriptionsfaktoren als rekombinante Proteine oder Kernextrakte von Zellen, die cRel und cEts1 überexprimieren, in *Electro-Mobility-Shift-Assays* eingesetzt werden. Natürlich

kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass ein völlig anderer, noch unbekannter Faktor den identifizierten DNA-Bereich bindet und die Expression von *Arfrp1* reguliert.

4.4 Die *Arfrp1*-Knockout-Maus

Um die physiologische Funktion von ARFRP1 zu untersuchen, wurde das *Arfrp1*-Gen in der Maus ausgeschaltet. Dabei wurde ersichtlich, dass Mäuse, denen *Arfrp1* auf einem Allel fehlt, keinen Phänotyp zeigen. Hingegen sind Mäuse, bei denen das *Arfrp1*-Gen auf beiden Allelen ausgeschaltet wurde, nicht lebensfähig.

Aus einer Zucht von *Arfrp1*^{+/-}-Tieren, aus der 94 Nachkommen hervorgingen, wurde eine Verteilung von *Arfrp1*^{+/+}-, *Arfrp1*^{+/-}- und *Arfrp1*^{-/-}-Tieren im Verhältnis von 1:2:0 beobachtet. Im Gegensatz zu *Arfrp1*^{+/-}-Mäusen sind *Arfrp1*^{-/-}-Mäuse nicht lebensfähig.

Die Beobachtung des Gewichtsverlaufs von *Arfrp1*^{+/-}-Mäusen über 6 Monate zeigte, dass diese sich in Bezug auf diesen Faktor nicht von ihren Wildtyp-Geschwistern unterscheiden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die RNA und Protein-Level von ARFRP1 in Wildtyp- und *Arfrp1*^{+/-}-Mäusen keine Unterschiede aufwiesen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine genügend hohe ARFRP1-Expression für das Überleben der Mäuse essentiell ist. Dies ist ein Hinweis auf regulatorische Mechanismen, die im Gegensatz zu anderen gendefizienten Mäusen (Makris *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Selley *et al.*, 2001), bei denen reduzierte Expressionslevel beobachtet wurden, für eine ausreichende ARFRP1-Expression sorgen. Das Vorhandensein derartiger Mechanismen kann als Hinweis auf eine essentielle Funktion des Proteins gedeutet werden.

Arfrp1^{-/-}-Mäuse zeigen einen letalen Phänotyp. *In-vitro*-Untersuchungen an Blastozysten haben jedoch gezeigt, dass *Arfrp1*^{-/-}-Blastozysten entstehen, und dass trophoblastische Zellen und Zellen der inneren Zellmasse in gleichem Maße proliferieren wie bei *Arfrp1*^{+/+}- und *Arfrp1*^{+/-}-Blastozysten. Es wurde weiter gezeigt, dass *Arfrp1*^{-/-}-

Embryos implantieren und sich bis zum Eizylinderstadium entwickeln. Zum Tag 7,5 *post conceptionem* (p.c.) waren *Arfrp1*^{-/-}-Embryos deutlich kleiner als ihre Geschwister (siehe Abb. 31).

Die Kombination aus histologischen Untersuchungen und der TUNEL-Reaktion, einem Nachweis apoptotischer Zellen, hat gezeigt, dass zwischen den Entwicklungstagen 6 und 7 *post conceptionem* die Entwicklung des embryonalen Ektoderms gestört ist, während die Entwicklung extraembryonaler Bereiche unbeeinflusst bleibt. ARFRP1 scheint also für die frühe Embryonalentwicklung, genauer während der Gastrulation, eine wichtige Rolle zu spielen.

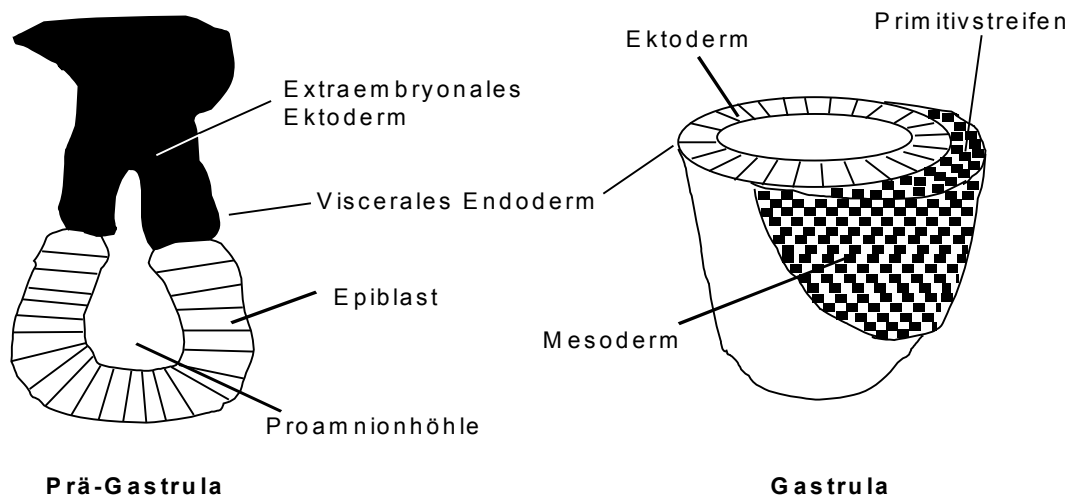


Abb. 33: Aufbau und Zellschichten in Prä-Gastrula-Embryo und Gastrula-Embryo.
(Nach Tam und Behringer, 1997)

Die Gastrulation ist ein äußerst komplexer Vorgang, in dem die Anlagen für die weiterfolgende Morphogenese des Embryos geschaffen werden. Diese Phase beginnt ab ca. dem 6. Tag p. c. in der Maus und ist etwa ab dem 7. Tag mit der Entwicklung der Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm abgeschlossen. Ein interessantes Merkmal der Gastrulation der Maus besteht darin, dass sich der Embryo zunächst „verkehrt herum“ entwickelt, das heißt mit nach außen gerichtetem Endoderm und nach innen gerichtetem Ektoderm. Nach Abschluss der Gastrulation findet eine Inversion der Keimblätter statt. Zum Tag 6,5, man spricht vom Eizylinder, wird der Embryo in zwei

Bereiche eingeteilt, den embryonalen und den extraembryonalen. Die embryonale Region besteht aus zwei Zellschichten, den Epiblasten (oder auch frühes embryonales Ektoderm) und dem äußerem visceralem Endoderm. Während der Gastrulation bildet sich ein transientes Gewebe, der Primitivstreifen. In diesem Gewebe findet eine Differenzierung von Epiblasten zu mesenchymalen Zellen statt. Die Epiblasten sind frühe epitheliale ektodermale Zellen, mesenchymale Zellen sind Zellen des Mesoderms und des Ektoderms. Es findet eine Migration der neu gebildeten Zellen innerhalb des Embryos statt. In späteren Phasen bilden sich dann spezifische Organe aus einzelnen Zellpopulationen (Tam and Behringer, 1997).

Unsere *in-vivo* und *in-vitro* Daten der *Arfrp1*^{-/-}-Mäuse zeigen, dass der Embryo sich bis zum Stadium des Eizylinders entwickelt, d. h. embryonales und extraembryonales Ektoderm sowie parietales und viscerales Endoderm vorhanden sind. Die Tatsache, dass in den *Arfrp1*^{-/-}-Embryos während der Gastrulationsphase scheinbar spontan ektodermale Zellen absterben, deutet auf einen primären Defekt in der Aufrechterhaltung und weiteren Differenzierung des embryonalen Ektoderms hin. Extraembryonische Strukturen entwickeln sich normal und sind zu einer späteren Phase als Konsequenz des primären Defekts beschädigt. Auf zellulärer Ebene ist diese Aufrechterhaltung der Struktur des Ektoderms eine kritische Phase, bei der eine konstante Integration von polarisierten, proliferierenden Zellen zwischen nicht-polarisierte, epitheliale Zellen stattfinden muss. Der Vorgang kann nur ohne Störung ablaufen, wenn eine präzise Kontrolle über Zell-Adhäsion, Zytoskelett-Organisation und Zell-Polarisation gewährleistet ist (Haegel *et al.*, 1995).

Viele *Knockout*-Mäuse wurden in den letzten Jahren hergestellt und phänotypisch untersucht. Darunter findet man auch viele Beispiele mit einem Defekt während der Gastrulation, bei vielen kommt es außerdem nicht zu einer Bildung des Mesoderms. *Arfrp1*^{-/-}-Mäuse unterscheiden sich von fast allen anderen *Knockouts* dadurch, dass die Zellen des Ektoderms spontan apoptotisch werden, die Zellen sich lösen und in die Proamniotische Höhle absondern. Zwei Gen-defiziente Mäuse zeigen einen sehr

ähnlichen Phänotyp zu den *Arfrp1*^{-/-}-Mäusen: β -Catenin defiziente Mäuse und Rac1-defiziente Mäuse.

Haegel *et al.* (1995) haben gezeigt, dass Embryos, bei denen β -Catenin ausgeschaltet wurde, die Entwicklung der Blastozysten, die Implantation und die Entwicklung des Embryos bis zum Stadium des Eizylinders normal verläuft. Erst während der Gastrulation findet eine Störung innerhalb des ektodermalen Epithels statt, die mit Apoptose und dem Lösen der Zellen in die Proamnionhöhle verbunden ist. β -Catenin und seine homologen Proteine α -Catenin und γ -Catenin spielen eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Adhäsion, in dem sie Komplexe mit dem zytoplasmatischen Ende von E-Cadherin und den Aktin-Filamenten des Zytoskeletts bilden (Wijnhoven *et al.*, 2000). β -Catenin spielt auch bei apoptotischen Prozessen eine Rolle. Allerdings gibt es bislang in diesem Zusammenhang noch keine übereinstimmende Meinung über die Rolle von β -Catenin, da Überexpression oder Stabilisierung von β -Catenin manche Zellen vor Apoptose schützt und in anderen Apoptose induziert (van Gijn *et al.*, 2001).

Auch das Ausschalten der kleinen GTPase Rac1 (siehe Kap. 1.2) resultiert in einem *Arfrp1*^{-/-}-ähnlichen Phänotyp (Sugihara *et al.*, 1998). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass konstitutiv aktives Rac1 die Ausbreitung von Zellen begünstigt und die Zell-Zell-Adhäsion vermindert. Man vermutet, dass Rac1 diese Vorgänge über Endozytose von E-Cadherin reguliert (Akhtar und Hotchin, 2001).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch die GTPase ARFRP1 in den Vorgängen Zell-Proliferation, Zell-Zell-Adhäsion und/oder Apoptose eine Rolle spielt. Sowohl die Lokalisation von ARFRP1 in der Plasmamembran, als auch der ähnliche Phänotyp zu anderen Gen-defizienten Mäusen unterstützen diese Theorie. Zu klären bleibt, ob ARFRP1 tatsächlich diese Funktion zusammen mit der kleinen GTPase Rac1 und E-Cadherin bzw. den Cateninen erfüllt.

Schürmann *et al.* (1999) hatten gezeigt, dass ARFRP1 die ARF-regulierte Phospholipase-D-(PLD) Aktivierung inhibiert. Diese Inhibition wird dadurch verursacht,

dass ARFRP1 an dem ARF-spezifischen *Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor* (GEF) bindet. Nach Stimulation durch verschiedenartige Signale (Hormone, Neurotransmitter oder Wachstumsfaktoren) hydrolysiert PLD Phosphatidylcholin zu Phosphatidylsäure (PA) und Cholin (Exton, 1997a; Exton 1997b). PA wirkt als *Second Messenger* in verschiedenen Vorgängen, unter anderem auch in der Reorganisation des Zytoskeletts. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Stimulierung von PLD durch die Reorganisation des Zytoskeletts Veränderungen der Zellmorphologie hervorrufen kann (Ha *et al.*, 1994; Cross *et al.*, 1996; Kam and Exton, 2001; Lee *et al.*, 2001). Dies läßt die Vermutung zu, dass *Arfrp*^{-/-}-Embryos der negative Regulator der PLD fehlt, wodurch mehr PA gebildet würde und damit Veränderungen des Zytoskeletts hervorriefe.

Eine genaue Charakterisierung der Funktion eines Proteins anhand von *Knockout*-Mäusen ist sehr erschwert, wenn eine frühe embryonale Letalität der *Knockout*-Mäuse auftritt (Fässler *et al.*, 1996) oder völlig unvorhersehbare Phänotypen erzeugt werden (Zhang *et al.*, 1996). Um dieses Problem zu umgehen, ist es möglich, eine kontrollierte, konditionelle, gesteuerte Inaktivierung eines Gens in einem bestimmten Entwicklungsstadium oder in bestimmten Geweben oder Zelltypen hervorzurufen. Die Bearbeitung dieser Fragestellung ist durch die Entwicklung des *Cre/loxP*-Systems ermöglicht (Kilby *et al.* 1993, Forlino *et al.*, 1999). Dabei wird das auszuschaltende Gen von zwei *loxP* Sequenzen flankiert. Diese dienen als Erkennungssequenzen für die bakteriophage Rekombinase Cre. Das Zielgen wird trotz der flankierenden Sequenzen exprimiert. Zu jedem erwünschtem Zeitpunkt oder organspezifisch ist man in der Lage Cre einzubringen. Die Rekombinase deletiert den zwischen den *loxP*-Erkennungssequenzen liegenden Genbereich und kann damit die Funktionstüchtigkeit eines Proteins verhindern (Porter, 1998).

Diese leistungsfähige Methode der konditionellen Inaktivierung eines Gens wäre eine sinnvolle Maßnahme für eine weitere Untersuchung von ARFRP1. Durch die frühe embryonale Letalität der *Arfrp1*^{-/-}-Mäuse können keine Erkenntnisse zu einem Phänotyp am lebenden oder erwachsenen Tier gewonnen werden. Die gewonnene Information beschränkt sich auf die Rolle von ARFRP1 in der Erschaffung eines Plans zur

Entwicklung der Organanlagen und der Gewebsdifferenzierung im Embryo eines Säugers. Damit fehlt eine wichtige Möglichkeit, neues Wissen zur Funktion von ARFRP1 zu erlangen. Dieses Wissen könnte man mit Hilfe des Cre//oxP-Systems erhalten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die physiologische Funktion von ARFRP1 mit Hilfe einer *Arfrp1-Knockout*-Maus zu untersuchen. Mäuse, bei denen das *Arfrp1*-Gen nur auf einem Allel zerstört war, zeigten in ihrer Entwicklung und dem Expressionslevel von ARFRP1 keinen Unterschied zu Wildtyp-Tieren. Im Gegensatz dazu waren *Arfrp1*-defiziente Mäuse embryonal letal. *In-vivo* und *in-vitro* Daten der *Arfrp1*^{-/-}-Mäuse zeigten, dass Blastozysten gebildet und in den Uterus implantiert werden und sich bis zum Stadium des Eizylinders (embryonaler Entwicklungstag E6,5) entwickeln. Mit Hilfe histologischer Untersuchungen in Kombination mit einem immunchemischen Nachweis apoptotischer Zellen (TUNEL-Reaktion) wurde eine Störung in der Gastrulation (Keimblattentwicklung) beobachtet. Zellen des embryonalen Ektoderms (Epiblasten), die im Primitivstreifen normalerweise zu Mesoderm differenzieren, waren im *Arfrp1*^{-/-}-Embryo apoptotisch und wurden in die Amnionhöhle abgestoßen. An der Umwandlung der Epiblasten zu Mesenchymzellen, die schließlich das Mesoderm bilden, sind verschiedene Prozesse wie Zell-Adhäsion, Reorganisation des Zytoskeletts und die Polarisation von Zellen beteiligt. Die Letalität der *Arfrp1*^{-/-}-Embryos könnte in dem Defekt eines dieser Prozesse begründet sein. Extraembryonale Strukturen der Deletionsmutante entwickeln sich normal und sind zu einer späteren Phase wahrscheinlich als Konsequenz des primären Defekts beschädigt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der genomischen Organisation von *Arfrp1* und die Untersuchung seines Promotors. Das *Arfrp1*-Gen besitzt eine Größe von ca. 6 kb und ist aus acht Exons (mit sieben Introns) aufgebaut. Der Transkriptionsstart wurde mit Hilfe von Datenbankvergleichen und der Identifizierung eines EST's ermittelt. Die Sequenz des aus einer λ -Phagenbank isolierten genomischen Klons von *Arfrp1* endet im Exon 8. Das putative Ende des Gens wurde ebenfalls durch Datenbankrecherchen und die Identifizierung von EST's, die das Polyadenylierungssignal enthalten, bestimmt.

Die genomische Organisation von *Arfrp1* unterscheidet sich von der anderer Mitglieder der ARF-Familie, so dass vermutet wurde, dass sich die Entwicklung des *Arfrp1*-Gens während der Evolution früh von der anderer *Arf*- und *Arf-like*-Gene getrennt hat.

Im 5'-flankierenden Bereich des *Arfrp1*-Gens wurden mit Hilfe von *Reportergen-Assays* und EMSA (*Electro-Mobility-Shift-Assay*) zwei Bereiche identifiziert (–58 bis –54 und –35 bis –31), die essentiell für die Promotoraktivität sind. Da diese Regionen exakt den Bindungssequenzen der Transkriptionsfaktoren cRel und cEts1 entsprechen, wurde angenommen, dass diese die Expression von ARFRP1 regulieren. Weitere EMSA zeigten außerdem, dass beide ermittelten DNA-Bereiche an dieselben Kernproteine binden. Daher wird vermutet, dass die Transkription von *Arfrp1* entweder von cRel, cEts1, einem Heterodimer, oder einem bislang unbekanntem Faktor reguliert wird.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Ahn, N.G., Robbins, D.J., Haycock, J.W., Seger, R., Cobb, M.H., Krebs, E.G., (1992): Identification of an activator of the microtubule-associated protein 2 kinases ERK1 and ERK2 in PC12 cells stimulated with nerve growth factor or bradykinin. *J. Neurochem.* 59: 147-156

Akhtar, N. and Hotchin, N.A. (2001): RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin. *Mol. Biol. Cell* 12: 847-862

Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. and Chabre, M. (1997): N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J. Biol. Chem.* 272: 30848-30851

Aoe, T., Lee, A.J., van Donselaar, E., Peters, P.J. and Hsu, V.W. (1998): Modulation of intracellular transport by transported proteins: insight from regulation of COPI-mediated transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1624-1629

Apolloni, A., Prior, I.A., Lindsay, M., Parton, R.G. and Hancock, J.F. (2000): H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytotic pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20: 2475-2487

Bai, C., Connolly, B., Metzker, M.L., Hilliard, C.A., Liu, X., Sandig, V., Sodermann, A., Galloway, S.M., Liu, Q., Austin, C.P. and Caskey, C.T. (2000): Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(3): 1230-1235

Barbazid, M.A. (1987): Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 779-827

Bar-Sagi, D. and Feramisco, J.R. (1985a): Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell* 42: 841-848

Bar-Sagi, D. and Feramisco, J.R. (1985b): Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science* 233: 1061-1068

- Bernard, D., Quatannens, B., Begue, A., Vandebunder, B., Abbadie, C. (2001): Antiproliferative and antiapoptotic effects of cRel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 61 (6): 2656-2664
- Bernard, D., Quatannens, B., Vandebunder, B., Abbadie, C. (2001): Rel/NF-kappaB transcription factors protect against tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-induced ligand (TRAIL)-induced apoptosis by up-regulating the TRAIL decoy receptor DcR1. *J. Biol. Chem.* 276 (29): 27322-27328
- Boguski, M.S. and McCormick, F. (1993): Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643-654
- Bollag, G. and McCormick, F. (1993): Regulators and effectors of *ras* proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:601-632
- Boman, A., Zhang, C.-J., Zhu, X. and Kahn R.A. (2000): A family of ADP-ribosylation effectors that can alter membrane transport through the *trans*-golgi. *Mol. Biol. Cell* 11: 1241-1255
- Bonass, W.A., Marsch, P.D., Percival, R.S., Aduse-Opoku, J., Hanley, S.A., Devine, D.A., Curtis, M.A. (2000): Identification of ragAB as a temperature-regulated operon of *Porphyromonas gingivalis* W50 using differential display of randomly primed RNA. *Infect. Immun.* 68(7): 4012-4017
- Brennwald, P. and Novick, P. (1993): Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 and Sec4. *Nature* 362: 560-565
- Breathnach, R., Chambon, P.A. (1981): Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 349-383
- Brown, H.A., Gutowski, S., Moomaw, C.R., Slaughter, C. and Sternweiss, P.C. (1993): ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase-D activity. *Cell* 75: 1137-1144.

- Burbello, P.D., Snow, D.M., Bahou, W. and Spiegel, S. (1999): MSE55 a Cdc42 effector protein induces long cellular extensions in fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9083-9088
- Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clarck, G.J. and Der, C.J. (1998): Increasing complexity of Ras signaling. Oncogene 17: 1395-1413
- Capecchi, M.R. (1989a): Altering the genome by homologous recombination. Science 244: 1288-1292
- Capecchi, M.R. (1989b): The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. Trends Genet. 5: 70-76
- Capecchi, M.R. (1994): Gezielter Austausch von Genen. Spektrum der Wissenschaft Mai: 44-53
- Capon, D.J., Seeburg, P.H., McGrath, J.P., Hayflick, J.S., Edman, U., Levinson, A.D. and Goeddel, D.V. (1983): Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. Nature 304: 507-513
- Carazo-Salas, R.E., Guarguaglini, G., Gruss, O.J., Segreff, A., Karsenti, E. and Mattaj I.W. (1999): Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. Nature 400: 178-181
- Chardin, P., Boquet, P., Madaule, P., Popoff, M.R., Rubin, E.J. and Gill (1989): The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by *clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in vero cells. EMBO 8: 1087-1092
- Chardin, P., Camonis, J.H., Gale, N.W., Van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M.H. and Bar-Sagi D. (1993): Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. Science 260: 1338-1343
- Cherfils, J. and Chardin, P. (1999): GEF's structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. Trends Biochem. Sci. 24: 306-311
- Chien, U.H., Lai, M., Shih, T.Y., Verma, I.M., Scolnick, E.M., Roy-Burman, P. and Davidson, N. (1979): Heteroduplex analysis of the sequence relationships between the

genomes of Kirsten and Harvey sarcoma viruses, their respective parental murine leukemia viruses, and the rat endogenous 30S RNA. *J. Virol.* 31: 752-760

Cho, G. and Doolittle, R.F. (1997): Intron distribution in ancient paralogs supports random insertion and not random loss. *J. Mol. Evol.* 44 (6): 573-584

Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, R.G., Bokock G.M. and Greenberg, S. (1997): Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J. Exp. Med.* 186: 1487-1494

Cross, M.J., Roberts, S., Ridley, A.J.H., Hodgkin, M.N., Stewart, A., Claesson-Welsh, L. and Wakelam, M.J. (1996): Stimulation of actin stress fiber formation mediated by activation of phospholipase D. *Curr. Biol.* 6: 588-597

Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M. and Cassel, D. (1995): The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and golgi complex localization. *Science* 270: 1999-2002

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

Dent, P., Haser, W., Haystead, T.A., Vincent, L.A., Roberts, T.M. and Sturgill, T.W. (1992): Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH-3T3 cells and in vitro. *Science* 257:1404-1407

Dever, T.F., Glynias, M.J. and Merrick, W.C. (1987): The GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 1814-1818

D' Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M.I. and Stahl, P.D. (1995): A regulatory role for ARF6 in receptor mediated endocytosis. *Science* 267: 1175-1178

Egan, S.E., Giddings, B.W., Brooks, M.W., Buday, L., Sizeland, A.M. and Weinberg, R.A. (1993): Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363: 45-51

- Esteban, L.M., Vicario-Abejon, C., Fernandez-Salguero, P., Fernandez-Medarde, A., Swaminathan, N., Yienger, K., Lopez, E., Malumbres, M., McKay, R., Ward, J.M., Pellecier, A. and Santos, E. (2001): Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol. Cell. Biol.* 21: 1444-1452
- Exton, J.H. (1997a): Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation and function. *Physiol. Rev.* 77: 303-320
- Exton, J.H. (1997b): New developments in phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 272: 15579-15582
- Exton, J.H., (1998): Small GTPase minireview series. *J. Biol. Chem.* 273: 19923
- Fässler, R., Georges-Labouesse, E., Hirsch, E. (1996): Genetic analysis of integrin function in mice. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 641-646
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13
- Forlino, A., Porter, F.D., Lee, E.J., Westphal, H., Marini, J.C. (1999): Use of the Cre/loxP recombination system to develop a non-lethal knock-in murine model for osteogenesis imperfecta with an $\alpha 1(I)$ G349C substitution. Variability in phenotype in BrtlIV mice. *J. Biol. Chem.* 274: 37923-37931
- Fritz, G. and Kania, B. (1997): RhoB encoding a UV-inducible Ras-related small GTP-binding protein is regulated by GTPases of the Rho family and independent of JNK, ERK, and p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 30637-30644
- Galli-Taliadoros, L.A., Sedwick, J.D., Wood, S.A., Körner, H. (1995): Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *J. Immunol. Methods* 181: 1-15
- Gegonne, A., Punyammalee, B., Rabault, B., Bosselut, R., Seneca, S., Crabeel, M., Ghysdael, J. (1992): Analysis of the DNA binding and transcriptional activation properties of the Ets1 oncoprotein. *New Biologist* 4: 512-519

- Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C.F. and Sudhof, T.C. (1997): The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature* 387 (6635): 810-814
- Ghysdeal, J. and Boureux, A. (1997): *Oncogenes as transcriptional regulators, Vol. I: Progress in gene expression.* Yaniv, M. and Ghysdeal, J. (eds). Birkhauser Verlag, Basel: 29-88
- Gilbert, W., de Souza, S.J. and Long, M. (1997): Origin of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7698-7703
- Goldberg, J. (1998): Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* 95: 237-248
- Gosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998): NF- κ B and Rel proteins: Evolutionary conserved mediators of immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-260
- Graves, B.J. and Peterson, J.M. (1998): Specificity within the Ets family of transcription factors. *Adv. Cancer Res.* 75: 1-55
- Gutkind, J.S. (1998): The pathways connecting G Protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 273: 1839-1842
- Ha, K.S., Yeo, E.J. and Exton, J.H. (1994): Lysophosphatidic acid activation of phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase D and actin polymerization by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Biochem. J.* 303: 55-59
- Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., Kemler, R. (1995): Lack of β -catenin affects mouse development at gastrulation. *Development.* 121: 3529-3537
- Hahm, K., Ernst, P., Lo, K., Kim, G.S., Turck, C., Smale, S.T. (1994): The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7111-7123

- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580
- Hannink, M., Temin, H.M. (1990): Structure and auto regulation of the c-rel promotor. Oncogene 5: 1843-1850
- Hasty, P., Rivera-Perez, J., Bradley, A. (1991): The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. Mol. Cell. Biol. 11: 5586-5591
- Hawes, B.E., van Biessen, T., Koch, W.J., Lutrell, L.M. and Lefkowitz, R.J. (1995): Distinct pathways of G_i- and G_q-mediated mitogen-activated protein kinase activation. J. Biol. Chem. 270: 17148-17153
- Hillig, R.C., Hanzal-Bayer, M., Linari, M., Becker, J., Wittinghofer, A., Renault, L. (2000): Structural and biochemical properties show ARL3-GDP as a distinct GTP-binding protein. Structure Fold Des. 8 (12): 1239-1245
- Hirose, E., Nakashima, N., Sekiguchi, T. and Nishimoto, T. (1998): RagA is a functional homologue of the *S. cerevisiae* Gtr1p involved in the Ran/Gsp1-GTPase pathway. J. Cell Sci. 111 (Pt1): 11-21
- Hirst, J. and Robinson, M.S. (1998): Clathrin and adaptors. Biochem. Biophys. Acta. 1404: 173-193
- Hogen B., Constantini, F., and Lacy, E. (1986): Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- Holmes, D.S., Quigley, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114: 193-197
- Hong, J.-X., Lee, F.-J.S., Patton, W.A., Lin, C.-Y., Moss, J. and Vaughan, M. (1998): Phospholipid- and GTP-dependent activation of cholera toxin and phospholipase D by human ADP-ribosylation factor-like protein 1 (HARL1). J. Biol. Chem. 273: 15872-15876
- Huang, C.-F., Buu, L.-M., Yu, W.-L., Lee, F.-J.S. (1998): Characterization of a novel ADP-ribosylation factor-like protein (γ ARL3) in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 274: 3819-3827

- Jackson, C.L. and Casanova, J.E. (2000): Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide exchange factors. *Trends Cell. Biol.* 10: 60-67
- Jacobs, S. (1999): Molekulare Charakterisierung des Gens, das für die Ras-homologe GTPase *Arl4* kodiert, und Herstellung einer *Arl4*-defizienten-Maus. Promotionsschrift, RWTH-Aachen
- Jacobs, S., Schürmann, A., Becker, W., Böckerns, T.M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Joost, H.G. (1998): The mouse ADP-ribosylation factor-like 4 gene: two separate promoters direct specific transcription in tissues and testicular germ cells. *Biochem. J.* 335: 259-265
- Jacobs, S., Schilf, C., Fliegert, F., Koling, S., Weber, Y., Schürmann, A. and Joost, H.G. (1999): ADP-ribosylation Factor (ARF)-like 4,6 and 7 represent a subgroup of the ARF-family characterized by rapid nucleotide exchange and a nuclear localization signal. *FEBS-Letters* 456: 384-388
- Janknecht, R., Nordheim, A. (1992): Elk-1 protein domains required for direct and SRF-assisted DNA-binding. *Nucleic Acids Res.* 20: 3317-3324
- Kahn, R.A. and Gilman, A.G. (1984): Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. *J. Biol. Chem.* 259: 6222-6228
- Kahn, R.A., Goddard, C., Newkirk, M. (1988): Chemical and immunological characterization of the 21 kDa ADP-ribosylation factor of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 263: 8282-8287
- Kahn, R.A., Kern, F.G., Clarck, J., Gelmann, F.P. and Rulka, C. (1991): Human ADP-ribosylation factors: A functionally conserved family of GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 2606-2614
- Kam, Y. and Exton, J.H. (2001): Phospholipase D activity is required for actin stress fiber formation in fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 21: 4055-4066

- Karnoub, A.E., Der, C.J., Campbell, S.L. (2001): The insert region of Rac1 is essential for membrane ruffling but not for cellular transformation. *Mol. Cell. Biol.* 21 (8): 2847-2857
- Kaufmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J. and Evan, G. (1997): Suppression of c-Myc induced apoptosis by Ras signaling through PI(3)K and PBK. *Nature* 385: 544-548
- Kilby, N.J., Snaith, M.R. and Murray J.A.H. (1993): Site-specific recombinases. Tools for genome engineering. *Trends Genet.* 9: 413-421
- Kim, C. and Dinauer M.C. (2001): Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamid adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J. Immunol.* 166 (2): 1223-1232
- Kim, C.G., Swendeman, S.L., Barnhart, K.M., Sheffery M. (1990): Promotor elements and erythroid cell nuclear factors that regulate alpha-globin gene transcription in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5958-5966
- Klarlund, J.K., Guilherme, A., Holik, J.J., Virbasius, J.V., Chawla, A. and Czech, M.P. (1997): Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstring and Sec7 homology domains. *Science* 275: 1927-1930
- Kodama, A., Takaishi, K., Nakano, K., Nishioka, H. and Takai, Y. (1999): Involvement of Cdc42 small G protein in cell-cell adhesion, migration and morphology of MDCK cells. *Oncogene* 18: 3996-4006
- Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., Otani, H., Aiba, A. and Katsuki, M. (1997): K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 15 (10): 1151-1159
- Kola, I., Brooks, S., Green, A.R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T.S. and Seth, A. (1993): The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7588-7592

- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Leblond, C.P., Clermont, Y. (1952): Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55: 548-573
- Lee, C.M., Haun, R.S., Tsai, S.C., Moss, J. and Vaughan, M. (1992): Characterization of the human gene encoding ADP-ribosylation factor 1, a guanine nucleotide-binding activator of cholera toxin. *J. Biol. Chem.* 267: 9028-9034
- Lee, S., Park, J.B., Kim, J.H., Kim, Y., Kim, J.H., Shin, K.-J., Lee, J.S., Ha, S.H., Lsuh, P.-G. and Ryu, S.H. (2001): Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity. *J. Biol. Chem.* 276: 28252-28260
- Lin, C.-Y., Huang, P.-H., Liao, W.-L., Cheng, H.-J., Huang, C.-F., Kuo, J.-C., Patton, W.A., Massenburg, D., Moss, J., Lee, F.-J. (2000): ARL4, an ARF-like protein that is developmentally regulated and localized to nuclei and nucleoli. *J. Biol. Chem.* 275: 37815-37823
- Liu, M.L., Shibata, M.A., Von Lintig, F.D., Wang, W., Cassanar, S., Boss, G.R. and Green, J.E. (2001): Haploid loss of Ki-Ras delays mammary tumor progression in C3 (1)/VS40 Tag transgenic mice. *Oncogene* 20 (16): 2044-2049
- Logson, J.M. (1998): The recent origin of spliceosomal introns revisited. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8 (6): 637-648
- MacDonald, S.G., Crews, C.M., Wu, L., Driller, J., Clarck, R., Erikson, R.L. and McCormick, F. (1999): Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6615-6620
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. and Narumiya, S. (1999): Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285: 895-898
- Magee, T. and Marshall, C. (1999): New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell* 98: 9-12

- Makler, V., Cukierman, E., Rotman, M., Admon, A. and Cassel, D. (1995): ADP-ribosylation factor-directed GTPase-activating protein. Purification and partial characterization. *J. Biol. Chem.* 270: 5232-5237
- Makris, C., Godfrey, V.L., Krahn-Senftleben, G., Takahashi, T., Roberts, J.L., Schwarz, T., Feng, L., Johnson, R.S., Karin, M. (2000): Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti. *Mol. Cell* 6: 969-979
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J.(1982): *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- Maroulakou, I.G., and Bowe, D.B. (2000): Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: A regulatory network. *Oncogene* 19: 6432-6442
- Martinez, O. and Goud, B. (1998): Rab proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1404: 101-112
- Maßmann, S. (1997): Identifizierung und Charakterisierung neuer, gewebsspezifisch exprimierter Ras-ähnlicher GTPasen. Promotionsschrift, RWTH-Aachen
- Maudale, P., Axel, R. (1985): A novel ras-related gene family. *Cell* 41 (1): 31-40
- McCormick, F. (1989): Ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell* 56: 5-8
- McGrath, J.P., Capon, D.J., Smith, D.H., Chen, E.Y., Seeburg, P.H., Goeddel, D.V. and Levinson, A.D. (1983): Structure and organization of the human Ki-Ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 304: 501-506
- Mellman, I. and Warren, G. (2000): The road taken: Past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100: 99-112
- Milburn, M.V., Tong, L., DeVos, A.M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. and Kim, S.-H. (1990): Molecular switch for signal transduction: Structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 247: 939-945

- Mitin, N., Kudla, A.J., Konieczny, S.F. and Taparowsky, E.J. (2001): Differential effects of Ras signaling through NfkappaB on skeletal myogenesis. *Oncogene* 20 (11): 1276-1286
- Miura, Y., Kikuchi, A., Musha, T., Kuroda, S., Yaku, H., Sasaki, T. and Takai, Y. (1993): Regulation of morphology by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 510-515
- Moore, M.S. and Blobel, G. (1993): The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 365: 661-663
- Moss, J., Vaughan, M. (1998): Molecules in the ARF orbit. *J. Biol. Chem.* 273: 21431-21434
- Nakano, K., Takaishi, K., Kodama, A., Mammoto, A., Shiozaki, H., Monden, M. and Takai, Y. (1999): Distinct actions and cooperative roles of ROCK and mDia in Rho small G protein-induced reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Cell. Biol.* 10: 2481-2491
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995): Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. *Cell* 81: 53-62
- Novick, P. and Zerial, M. (1997): The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 946-504
- Pacheco-Rodriguez, G., Meacci, E., Vitale, N., Moss, J. and Vaughan, M. (1998): Guanine nucleotide exchange on ADP-ribosylation factors catalyzed by cytohesin-1 and its Sec7 domain. *J. Biol. Chem.* 273: 26543-26548
- Perey, P., Clermont, Y., Leblond, C.P. (1961): The wave of seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.* 108: 44-77
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R., Lacal, J.C. (1997): Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac1 proteins. *Genes Dev.* 11 (4): 463-475

- Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J. and Jackson, C.L. (1999): Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: Involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol. Cell. Biol.* 3: 275-285
- Plutner, H., Cox, A.D., Pind, S., Khosravi-Far, R., Bourne, J.R., Schwaninger, R., Der, C.J. and Balch, W.E. (1991): Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmatic reticulum and succesive golgi compartments. *J. Cell. Biol.* 115: 31-43
- Porter, A. (1998): Controlling your losses: Conditional gene silencing in mammals. *TIG.* 14 (2): 73-79
- Pryer, N.K., Wuestehube, L.J. and Schekman, R. (1992): Vesicle-mediated protein sorting. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 471-516
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekman, D. and Hall, A. (1992): The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70: 401-410
- Riele, H., Mandag, E.R. and Berns, A. (1992): Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 51: 5128-5132
- Roth, M.G. (1999a): Lipid regulators of membrane traffic through the golgi complex. *Trends Cell. Biol.* 9: 174-179
- Roth, M.G. (1999b): Snapshots of ARF1: Implications for mechanisms of activation and inactivation. *Cell* 97: 149-152.
- Roth, M.G. (2000): Arf In GTPases, edited by Hall, A. Oxford UK: Oxford Univ. Press, 175-197.
- Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T. and Bowtell, D. (1993): The SH2 and SH3 domains of mammalian Gbr2 couple the EF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363: 83-85

Ruben, S., Poteat, H., Tan, T.-H., Kawakami, K., Roeder, R., Haseltine, W., Rosen C.A. (1988): Cellular transcription factors and regulation of IL-2 receptor gene expression by HTLV-I tax gene product. *Science* 241: 89-92

Sadowski, H. B., Gilman, M. Z. (1993): Cell-free activation of a DNA-binding protein by epidermal growth factor. *Nature* 362 (6415), 79-83

Saftig, P. (1997): Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus und Herstellung von *Knockout*-Mäusen. Skript zum IBA-Kurs *Genetargeting*, Universität Göttingen

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A laboratory manual (2. Auflage). Cold Spring Harbour Laboratory, New York

Schürmann, A. (1997): Klonierung und Charakterisierung neuer GTPasen der Ras-Familie (ARL1, ARL4, ARP, Rag und Rab28). Habilitationsschrift, RWTH-Aachen

Schürmann, A., Brauers, A., Massmann, S., Becker, W. and Joost, H.-G. (1995a): Cloning of a novel family of mammalian GTP-binding proteins (RagA, RagBs, RagB1) with remote similarity to the Ras related GTPases. *J. Biol. Chem.* 270 (48): 28982-28988

Schürmann, A., Maßmann, S. and Joost H.G. (1995b): ARP is a plasma membrane-associated Ras-related GTPase with remote similarity to the family of ADP-ribosylation factors. *J. Biol. Chem.* 270: 30657-30663

Schürmann, A., Schmidt, M., Asmus, M., Bayer, S., Fliegert, F., Kolling, S., Maßmann, S., Schilf, C., Subauste, M.C., Voß, M., Jakobs, K.H. und Joost, H.G. (1999): The ADP-ribosylation factor (ARF)-related GTPase protein binds to the ARF-specific guanine nucleotide exchange factor cytohesin and inhibits the ARF-dependent activation of phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 274: 9744-9751

Seeburg, P.H., Colby, W.W., Capon, D.J., Goeddel, D.V. and Levinson, A.D. (1984): Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature* 312: 71-75

- Selley, D.E., Rorrer, W.K., Breivogel, C.S., Zimmer, A.M., Zimmer, A., Martin, B.R. and Sim-Selley, L.J. (2001): Agonist efficacy and receptor efficiency in heterozygous CB1 knockout mice: Relationship of reduced CB1 Receptor density to G-Protein activation. *J. Neurochem.* 77 (4): 1048-1057
- Sementchenko, V.I., and Watson, D.K. (2000): Ets target genes: Present past and future. *Oncogene* 19: 6533-6548
- Senapathy, P., Shapiro, M.B., Harris, N.L. (1990): Splice junctions branch point sites, and exons: Sequence statistics, identification and applications to genome project. *Methods Enzymol.* 183: 252-278
- Sewell, J.L., and Kahn, R.A. (1988): Sequences of the bovine and yeast ADP-ribosylation factor and comparison to other GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 4620-4624
- Sha, W.C. (1998): Regulation of immune response by NF- κ B/Rel transcription factors. *J. Exp. Med.* 187 (2): 143-146
- Shastry, B.S. (1994): More to learn from gene knockouts. *Mol. Cell. Biochem.* 136: 171-182
- Shih, T.Y., Williams, D.R., Weeks, M.O., Maryak, J.M., Vass, W.C. and Scolnock, E.M. (1978): Comparison of the genomic organization of the Kirsten and Harvey sarcoma viruses. *J. Virol.* 27: 45-55
- Snape, A.M., Winning, R.S., Sargent, T.D. (1991): Transcription factor AP-2 is tissue-specific in *Xenopus* and is closely related or identical to keratin transcription factor 1 (KTF-1). *Development* 113: 283-293
- Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 (3), 503-17
- Stacey, D.W. and Kung H.F. (1984): Transformation of NIH 3T3-cells by microinjection of Ha-ras p21-protein. *Nature* 310: 508-511

Stearns, T., Willingham, M.C., Botstein, D., and Kahn, R.A. (1990): ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the golgi complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 1238-1242

Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A. and Katsuki, M. (1998): Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17: 3427-3433

Symons, M. (1995): The Rac and Rho pathways as a source of drug targets for Ras-mediated malignancies. *Curr. Opin. Biotech.* 6: 668-674

Symons, M. (1996): Rho family GTPases: The cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 21: 178-181

Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A. and Kawata, M. (1992): Small GTP-binding proteins. *Int. Rev. Cytol.* 133: 187-230

Takai, Y., Takuya, S. and Matozaki, T. (2001): Small GTP-binding proteins. *Phys. Rev.* 81: 153-179

Tam, P.P.L. and Behringer, R.R. (1997): Mouse gastrulation: The formation of a mammalian body plan. *Mech. Dev.* 68: 3-25

Thomas, K.R. and Carpecchi, M.R. (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem-cells. *Cell* 51: 503-512

Thomas, K.R., Deng, C. and Capecchi, M.R. (1992): High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2919-2923

Tsai S.C., Haun, R.S., Tsuchiya, M., Moss, J. and Vaughan, M. (1991): Isolation and characterization of the human gene for ADP-ribosylation factor 3, a 20 kDa guanine and nucleotide binding protein activator of cholera toxin. *J. Biol. Chem.* 266: 23053-23059

Umanoff, H., Edelman, W., Pellecier, A. and Kucherlapati, R. (1995): The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 1709-1713

- Van Gijn, M.E., Snel, F., Cleutjens, J.P.M., Smits, J.F.M. and Blankesteyn, W.M. (2001): Overexpression of components of the frizzled-dishevelled cascade results in apoptotic cell death, mediated by β -catenin. *Exp. Cell Res.* 265: 46-53
- Vogel, U.S., Dixon, R.A., Schaber, M.D., Diehl, R.E., Marshall, M.S., Scolnick, E.M., Sigal, I.S. and Gibbs, J.B. (1988): Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic *ras* p21. *Nature* 335: 90-93
- Watt, F., Molloy, P.L. (1988): High mobility group proteins 1 and 2 stimulate binding of a specific transcription factor to the adenovirus major late promoter. *Nucleic Acids Res.* 16: 1471-1486
- Weigert, R., Silett, M.G., Spano, S., Turacchio, G., Cericola, C., Colanzi, A., Senatore, S., Mancini, R., Polishchuk, E.V., Salmona, M., Facciano, F., Burger, K.N., Mirnov, A., Luini, A. and Cora, D. (1999): CtBP/BARS induces fission of golgi membranes by acetylating lysophosphatidic acid. *Nature* 402: 429-433
- Wichmann, H., Disela, C., Haubruck, H. and Gallwitz, D. (1989): Nucleotide sequence of the mouse *ypt1* gene encoding a ras related GTP-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 17: 6737-6738
- Wijnhoven, B.P.L., Dinjens, W.N.M. and Pignatelli, M. (2000): E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Brit. J. Sur.* 87: 992-1005
- Wolfman, A. and Macara, I.G. (1990): A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras. *Science* 248: 67-69
- Wood, S.A., Allen, N.D., Rossant, J., Auerbach, A. and Nagy, A. (1993): Noninjection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimeras. *Nature* 365: 87-89
- Yang, S., Lockwood, A., Hollett, P., Ford, R. and Kao, K. (1998): Overexpression of a novel *Xenopus Rel* mRNA induces tumors in early embryos. *J. Biol. Chem.* 273 (22): 13746-13752

Zeuzem, S., Feick, P., Zimmermann, P., Haase, W., Kahn, R.A. and Schulz, I. (1992): Intravesicular acidification correlates with binding of ADP-ribosylation factor to microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 6619-6623

Zhang, J., Hagopian-Donaldson, S., Serbedzija, G., Elsemore, J., Plehn-Dujowich, D., McMahon, A.P., Flavell, R.A. and Williams, T. (1996): Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381: 238-241

Zhu, Y., Drake, M.T. and Kornfeld, S. (1999): ADP-ribosylation factor 1 dependent clathrin-coat assembly on synthetic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5013-5018

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
<i>Acc. No.</i>	<i>Accession Number</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor Protein
ARL	ADP-Ribosylierungsfaktor <i>like</i> Protein
ARP	(= Synonym zu ARFRP1) <i>ARF-Related Protein</i>
ARFRP1	<i>ARF-Related Protein</i>
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
cpm	<i>Counts Per Minute</i>
d	Tage
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
Fwd	<i>Forward</i>
FCS	Foetales Kälberserum
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GEF	<i>Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor</i>
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	human
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HS	<i>Horse Serum</i>

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LSB	<i>Laemmli</i> -Probenpuffer
M	Molarität (mol/l)
m	murin
m	Meter
μ	Mikro
min	Minute(n)
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
N	Nano
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PA	Phosphatidylsäure
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
pfu	<i>Plaque Forming Units</i>
PLD	Phospholipase-D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rag	<i>Ras-Related In Adrenal Gland</i>
Rev	<i>Reverse</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rotations Per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S.E.M.	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus Aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3propandiol
u	<i>Units</i>
U	Uracil
UTR	Untranslatierte Region
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp

7.2 „Ein-Buchstaben“-Aminosäurencode

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

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. H.-G. Joost danke ich für die Überlassung eines sehr interessanten Themas und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Labor, für die interessanten Anregungen und die Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Mohr danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit und für interessante und hilfreiche Diskussionen des Themas.

Besonderer Dank gilt PD Dr. Annette Schürmann für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit, für viele wertvollen Diskussionen und Anregungen zur Durchführung und Darstellung der Arbeit.

Dr. Markus Moser, Sandra und Judith Dahmen danke ich für eine hervorragende Kooperation bei der Herstellung der *Knockout*-Maus und für viele anregende fachliche Diskussionen.

Dr. Reinhard Kluge danke ich für die viele Arbeit und Unterstützung mit den Mäusen und für hilfreiche Diskussionen. Auch bei den anderen Mitarbeitern des Instituts für Versuchstierkunde möchte ich mich bedanken.

Vielen herzlichen Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Anatomie, insbesondere Uta Zahn, Dr. Mamed Kadyrow, Dr. H.-G. Frank und Anne Versmold für die Unterstützung beim Erlernen verschiedener Verfahren.

Besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der RWTH-Aachen für viele anregende Diskussionen und eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt dabei: Dr. Susanne Koling, Andrea Scheepers, Silvia Detro-Dassen, Christiane Schilf, Dr. Gregor Bahrenberg und Dr. Stephan Jacobs.

Nicht zuletzt möchte ich mich bedanken bei meiner Familie. Meinen Eltern besonderen Dank, die mir durch ihre Unterstützung diesen Weg ermöglicht haben. Meiner Schwägerin Martina danke ich für ihre motivierende Unterstützung. Ganz besonderen Dank meinem Mann Markus für dessen liebevolle Geduld, Hilfsbereitschaft und Unterstützung

PUBLIKATIONEN

Als Abstract publizierter Kongressvortrag

Müller, A., Moser, M., Leder, S., Kluge, R., Joost, H.-G. and Schürmann, A. (2001): ARP (ADP-ribosylation factor-related protein) is essential for the embryonic development of mice. Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol. 363 (Suppl.) R59

Als Abstract publizierte PosterPräsentationen

Müller, A., Moser, M., Leder, S., Joost, H.-G. and Schürmann, A. (2000): Analysis of the ADP-ribosylation factor-related protein (ARP) Promotor and generation of *Arp*-deficient mice. Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol. 362 (Suppl.) R27

Müller, A., Joost, H.-G. and Schürmann, A. (2000): The genomic organization of the ADP-ribosylation factor-related protein (ARP). Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol. 361 (Suppl.) R62

In Veröffentlichung

Müller, A.G., Moser, M., Kluge, R., Leder, S., Blum, M., Büttner, R., Joost, H.-G. and Schürmann, A. (2002): Embryonic lethality caused by apoptosis during gastrulation in mice lacking the gene of the ADP-ribosylation factor-related protein 1. Mol. Cell. Biol. 22 (5), Accepted 6 December 2001

Andere Publikationen

Müller, A. (1999): Adenosinrezeptor-Antagonisten: Neuer Therapieansatz zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen? DAZ. 4: 32-33

Müller, A. (1999): Harninkontinenz: Welche Therapie für welche Form? DAZ. 40: 3772

Joost, H.-G. und Müller, A. (2000): Negativ inotrope Wirkung und Obstipation durch Verapamil? DMW, Beilage Fragen aus der Praxis. 16: Suppl. Nr. 1: 5

LEBENS LAUF

Name: Andrea Gotelind Müller, geb. Meszaros

Geboren: 30.05.1972 in Silver Spring, MD, USA

Nationalität: Deutsch und Amerikanisch

Familienstand: verheiratet; ein Kind

Anschrift: Brüsseler Ring 73A
52074 Aachen

Schulbildung:

09.77-02.79 Cashell Elementary School, Rockville, MD, USA

02.79-05.83 Grundschule der Deutschen Schule Washington, D.C. in Potomac, MD, USA

09.83-06.91 Gymnasium der Deutschen Schule Washington, D.C. in Potomac, MD, USA

02.88-08.88 Schüleraustausch nach Kiel, Deutschland, Besuch der Gelehrtenschule, Kiel

06.90 High School Graduation

06.91 Abitur an der Deutschen Schule Washington mit der Gesamtnote:
gut

Hochschulausbildung:

- 10.91 Immatrikulation an der Rheinisch Westphälischen Technischen Hochschule Aachen, Fachbereich: Chemie
- 04.94 Vordiplom in Chemie an der RWTH-Aachen mit der Gesamtnote: gut
- 04.94 Immatrikulation an der Friedrich Wilhelms Universität Bonn, Fachbereich: Pharmazie
- 05.97 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung nach der Approbationsordnung für Apotheker, Gesamtnote: gut
- 06.97-11.97 Erste Hälfte des Praktischen Jahres, in der Adalbert Apotheke, Aachen
- 12.97-05.98 Zweite Hälfte des Praktischen Jahres am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der medizinischen Fakultät der RWTH Aachen
- 06.98 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung nach der Approbationsordnung für Apotheker, Gesamtnote: gut
- 08.98 Approbation als Apothekerin
- 1998-2001 Dissertation an dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der medizinischen Fakultät der RWTH Aachen unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. H.-G. Joost und unter Betreuung von Prof. Dr. K. Mohr, Leiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der pharmazeutischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

