

Erzeugung und Charakterisierung eines *Hepatoma-derived Growth Factor* (HDGF)- defizienten Mausmodells

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

vorgelegt von

Rainer Gallitzendörfer

aus

Vohenstrauß

Bonn, März 2011

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

1.Gutachter: Prof. Dr. Volkmar Gieselmann
2.Gutachter: Prof. Dr. Klaus Mohr

Tag der Promotion: 11. Juli 2011
Erscheinungsjahr 2011

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

*I don't believe there is a single mouse that doesn't have a phenotype...
We just aren't asking the right questions.*

Mario Capecchi

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1. Einleitung	1
1.1. Wachstumsfaktoren	1
1.2. Der Hepatoma-derived Growth Factor	4
1.2.1. Die HDGF-Proteinfamilie	4
1.2.2. Struktur und Eigenschaften von HDGF	5
1.2.3. Einfluss von HDGF während der Organogenese	8
1.2.4. Die Rolle von HDGF während der Apoptose	8
1.2.5. HDGF – ein putatives Alarmin	10
1.2.6. HDGF und Krebs	10
1.3. Transgene Mausmodelle und Reportergene	11
1.3.1. Arten transgener Mausmodelle	11
1.3.2. Reportergene	15
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit	17
2. Material	19
2.1. Chemikalien	19
2.2. Medien und Lösungen	19
2.3. Materialien	26
3. Methoden	33
3.1. Nukleinsäure-Präparationen	33
3.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA	33
3.1.2. Präparation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen	35
3.1.3. Präparation genomischer DNA aus Schwanzspitzen von Mäusen	36
3.1.4. Präparation genomischer DNA aus Gewebe	36
3.1.5. Präparation von RNA aus Gewebe mit TRIzol-Reagenz	37
3.1.6. Präparation von RNA aus Zellen	37
3.1.7. Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	38
3.2. Methoden zur Herstellung rekombinanter Plasmide	39
3.2.1. Schneiden von Plasmid-DNA	39

3.2.2.	Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	39
3.2.3.	Aufreinigung von DNA-Reaktionsansätzen	40
3.2.4.	Auffüllen kohäsiver DNA-Enden	40
3.2.5.	Dephosphorylierung von Vektorenden	40
3.2.6.	Ligation von DNA-Fragmenten	41
3.2.7.	Transformation in Bakterien	41
3.2.8.	PCR-Kolonie-Screening	42
3.2.9.	Blau-Weiß-Screening von Bakterienklonen	42
3.2.10.	Sequenzierung von DNA-Abschnitten	43
3.3.	Transfer und Hybridisierung von Nukleinsäuren	44
3.3.1.	Southern-Blot	44
3.3.2.	Northern-Blot	44
3.3.3.	Herstellung von radioaktiv markierten Sonden	45
3.3.4.	Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren	45
3.4.	Zellkultur	46
3.4.1.	Zellkultur embryonaler Stammzellen	46
3.4.2.	Zellkultur primärer, dermaler Fibroblasten	51
3.4.3.	Zellkultur von HeLa-Zellen	52
3.4.4.	Transfektion mit ExGen 500	52
3.4.5.	Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau	53
3.5.	Polymerasekettenreaktion	53
3.5.1.	Expressionsuntersuchungen von mRNA-Transkripten	53
3.5.2.	PCR-Untersuchungen von ES-Zellen	55
3.5.3.	Agarosegelelektrophorese	56
3.6.	Nachweise von Proteinen	57
3.6.1.	Proteinextraktion	57
3.6.2.	Proteinbestimmung	57
3.6.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
3.6.4.	Western-Blot-Analyse nach dem Semi-Dry-Verfahren	58
3.6.5.	Immunfluoreszenznachweise von Proteinen	59
3.6.6.	Immunhistochemie	60
3.7.	Histologische Untersuchungen	61
3.7.1.	Alizarinrot-Alcianblau-Färbung	61
3.8.	Sonstige Nachweise	62
3.8.1.	Zellzyklus-Analyse	62
3.8.2.	FACS-Analyse von Vollblut	62
3.8.3.	Untersuchung der Proliferation mit ³ H-Thymidin	63
3.8.4.	Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität	64
3.8.5.	Untersuchung der Zellvitalität nach Apoptoseinduktion	64

3.8.6. EGFP-Analysen an Mausorganen	64
3.9. Tierexperimentelles Arbeiten	65
3.9.1. Verhaltenstests an Mäusen	65
3.9.2. Oraler Glukosetoleranz-Test	66
4. Ergebnisse	67
4.1. Herstellung von Targeting-Vektoren für die gezielte Inaktivierung des HDGF-Gens	67
4.1.1. Klonierung von pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in	68
4.1.2. Klonierung von pRG2-floxHDGF:mRFP-Knock-in	73
4.2. Erzeugung und Analyse homolog rekombinierter, muriner ES-Zellen	79
4.3. Erzeugung und Zucht von HDGF-defizienten Mäusen	82
4.4. Expressionsanalysen an Mäusen mit mutiertem HDGF-Allel	84
4.4.1. Nachweis der fehlenden Expression der HDGF-mRNA	84
4.4.2. EGFP-Reporteranalysen in HDGF-EGFP-Knock-in Tieren	86
4.5. Charakterisierung HDGF-defizienter Mäuse	92
4.5.1. Der Verlust von HDGF ist nicht embryonal-letal	92
4.5.2. HDGF-defiziente Tiere zeigen eine normale Entwicklung	92
4.5.3. Die HDGF-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Organogenese	93
4.5.4. Der Verlust von HDGF wird nicht durch ein Paralog kompensiert	96
4.5.5. Verhaltenstests mit adulten Mäusen	97
4.5.6. Oraler Glukosetoleranztest	98
4.6. Untersuchungen an HDGF-defizienten Fibroblasten	99
4.6.1. Charakterisierung primärer, dermaler Fibroblasten	99
4.6.2. Der Einfluss von endogenem HDGF auf die Proliferation von Fibroblasten	100
4.6.3. Apoptose in HDGF-defizienten Fibroblasten	102
5. Diskussion	105
5.1. Gezielte Deletion des murinen HDGF-Gens	105
5.2. Targeting-Vektoren für die Inaktivierung von HDGF	105
5.2.1. Herstellung von 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in'	105
5.2.2. Klonierung von 'pRG2-floxHDGF:mRFP-Knock-in'	106
5.3. Generierung eines HDGF-defizienten Mausmodells	106
5.4. Expressionsanalyse des HATH ₁₋₃₁ -EGFP-Reporterproteins	107
5.5. Auswirkungen der HDGF-Defizienz auf Organentwicklung und Wachstum	110
5.6. Untersuchungen an HDGF-defizienten Fibroblasten	114
5.6.1. Charakterisierung primärer, dermaler Fibroblasten	114
5.6.2. Endogenes HDGF ist für die Proliferation entbehrlich	115

5.6.3. Fehlendes HDGF hat keine Auswirkung auf die Apoptose	116
5.7. HDGF – ein redundantes oder überflüssiges Protein?	117
5.7.1. Mechanismen biologischer Robustheit	117
5.7.2. Paraloge Redundanz von Genen	119
5.7.3. Genetische Redundanz durch biologische Netzwerke	120
5.8. Ausblick	123
6. Zusammenfassung	125
Literaturverzeichnis	127
A. Anhang	147

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	<i>base pair</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CHX	Cycloheximid
CIP	<i>calv instesinal alkaline phosphatase</i>
CP	<i>crossing point</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
Cy	Cyanin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dpc	dies post coitum
E	Embyonaltag
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FCS	<i>fetal calw serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FL	<i>relative fluoescence</i>
FP	Fluoreszierendes Protein
Gy	Gray
HAT	Hypoxanthin Aminopterin Thymidin
HATH	<i>homologous to the amino terminus of HDGF</i>
HDGF	<i>Hepatoma-derived growth factor</i>
HMG	<i>high-mobility group</i>

HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HRP-2	<i>Hepatoma-derived growth factor related protein 2</i>
HRP-3	<i>Hepatoma-derived growth factor related protein 3</i>
HRP-4	<i>Hepatoma-derived growth factor related protein 4</i>
HT	Hypoxanthin Thymidin
hu	human
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
LEDGF	<i>Lens epithelial-derived growth factor</i>
m	murin
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein</i>
MW	<i>molecular weight</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
orf	<i>open reading frame</i>
P	postnatal
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDF	Primäre dermale Fibroblasten
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PWWP	Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin
RLU	<i>relative luminescence</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
TBS	Tris-buffered saline

TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

1. Einleitung

1.1. Wachstumsfaktoren

Im Laufe der Evolution mehrzelliger Organismen bedurfte es der Entwicklung und Optimierung eines interzellulären Kommunikationssystems, das für die Steuerung komplexer Prozesse, zum Beispiel der Embryogenese oder der Gewebedifferenzierung, verantwortlich ist.¹ Als Mediatoren dienen und dienen mehrzelligen Organismen dafür Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine, die durch Bindung an spezifische Rezeptoren, teilweise unter Vermittlung von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Eine sekundäre Aktivierung von weiteren Transkriptionsfaktoren kann dann zur Aktivierung oder Repression von Genen und damit zu einer veränderten Genexpression führen.²⁻⁴

Wachstumsfaktoren bilden eine heterogene Gruppe von Polypeptiden, die in Hinblick auf ihre spezifischen Funktionen in vier Klassen eingeteilt werden können: (i) organspezifische Wachstumsfaktoren (z.B. *Epidermal growth factor*), (ii) hämatopoietische Wachstumsfaktoren (z.B. *Erythropoietin*), (iii) neurotrophe Wachstumsfaktoren (z.B. *Nerve growth factor*) und (iv) Zytokine (z.B. Interleukin 1).⁵

Sowohl normale Zellen als auch transformierte Zellen bilden und sekretieren Wachstumsfaktoren. Im Verlauf pathologischer Prozesse, die gesteigerte Proliferationsraten von Zellen bewirken, beispielsweise im Rahmen der Wundheilung, reagieren normale Zellen mit einer ungewöhnlich hohen Sekretion von Wachstumsfaktoren. Die durch diese Wachstumsfaktoren stimulierten Zielzellen entsprechen in ihrem Erscheinungsbild und den aktivierten metabolischen Signalwegen Retrovirus-transformierten Zellen.⁶ Die Expression von Wachstumsfaktoren trägt ebenfalls entscheidend zur Pathogenese unterschiedlicher Krankheiten bei. Der Expressionsgrad verschiedener Wachstumsfaktoren korreliert zum Beispiel mit der Entwicklung und Aufrechterhaltung eines malignen Prozesses.⁷

Die proteinergeren Wachstumsfaktoren können die Proliferation von Zellen positiv oder negativ beeinflussen, wobei die Wirkung dieser Faktoren neben dem Vorhandensein weiterer Wachstumsfaktoren auch vom jeweiligen Zelltyp abhängig ist.⁴ Während viele Wachstumsfaktoren in der Lage sind verschiedene Zelltypen zu stimulieren, gibt es auch

Faktoren, die ihre Wirkungen spezifisch an distinkten Zelltypen ausüben.⁸ Wachstumsfaktoren werden als Mitogene bezeichnet, wenn sie den Eintritt von Zellen in die Mitose bewirken. Entsprechend ihrer Struktur und der Art ihrer Wirkung lassen sich proteinerge Wachstumsfaktoren in verschiedene Familien einteilen (Tab. 1.1).⁹

Tab. 1.1.: Einteilung proteinerger Wachstumsfaktoren

Superfamilie	Beispiele
1 Große Peptid-Wachstumsfaktoren	Transforming growth factor beta Platelet-derived growth factor Epidermal growth factor Fibroblast growth factor Insulin-like growth factor Tumor necrosis factor alpha Interleukin 6 Nerve growth factor
2 Große individuelle Peptid-Wachstumsfaktoren	Glial growth factor Hepatocyte growth factor Interferon alpha Macrophage colony stimulating factor Interleukin 2
3 Kleine Peptid-Wachstumsfaktoren	Bombesin Ranatensin Neuromedin B Gastrin related peptide Adrenocorticotrophic hormone Alpha-melanocyte stimulating hormone
4 Kleine individuelle Peptid-Wachstumsfaktoren	Angiotensin II Bradykinin Vasopressin Oxytocin Thrombin Gastrin

Die Möglichkeit einer Zelle angemessen auf Veränderungen der Umgebung oder interne Veränderungen zu reagieren ist die wesentliche Funktion von Wachstumsfaktoren. Je nach Produktionsort und der anschließenden Auslösung eines Effektes an einer Zielzelle können für Wachstumsfaktoren 5 Wirkungsweisen unterschieden werden (siehe Abbildung 1.1).

Während Hormone von den bildenden Zellen in Gefäße des Blut- und Lymphsystems sezerniert werden und an weiter entfernt liegenden Zielzellen ihre spezifischen Wirkungen hervorrufen, nutzen Polypeptid-Wachstumsfaktoren gewöhnlich den parakrinen und autokrinen Wirkmechanismus zur Entfaltung ihrer Funktion.^{6,10} Jedoch wurden auch proteinerge Wachstumsfaktoren, beispielsweise *Insulin-like growth factor*, im Plasma identifiziert, die als endokrine Wachstumsfaktoren analog zu Hormonen agieren können.^{1,6}

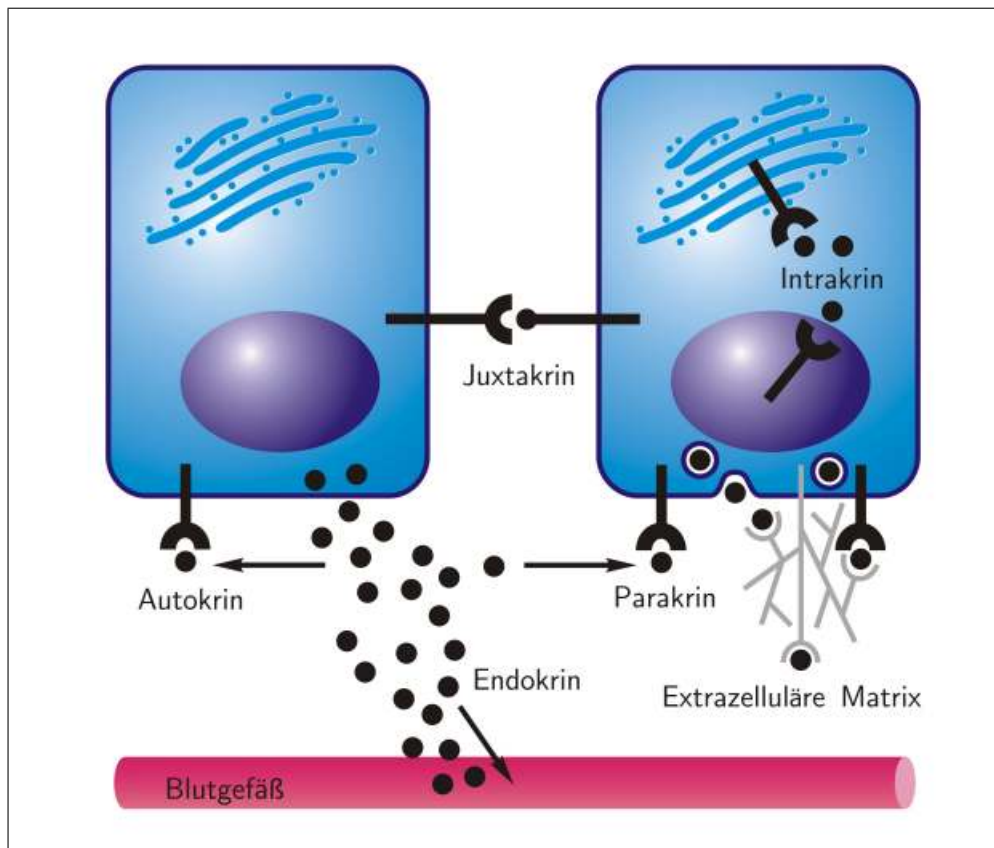


Abb. 1.1.: Wirkmechanismen von Wachstumsfaktoren. Wachstumsfaktoren können über autokrine oder intrakrine Mechanismen die sie exprimierende Zelle beeinflussen oder aber mit benachbarten Zellen durch parakrine oder juxtakrine Mechanismen kommunizieren. Endokrine Wachstumsfaktoren werden in Gefäße des Blut- oder Lymphsystems sezerniert und über diese zu weiter entfernt liegenden Zellen transportiert. All diese Möglichkeiten erfordern die Bindung von Wachstumsfaktoren an spezifische Rezeptoren. (Darstellung modifiziert nach Sporn and Todaro, 1980)¹⁰

Parakrine Wachstumsfaktoren üben ihre Wirkung auf Zellen in direkter Nachbarschaft zu der sezernierenden Zelle aus.¹⁰ Einige Wachstumsfaktoren, darunter *Fibroblast growth factor*,^{11,12} werden vor der Interaktion mit Rezeptoren auf der Oberfläche benachbarter Zellen erst in der ECM verankert. Dieser Wirkungsmechanismus über die ECM ist als Variante des parakrinen Mechanismus zu betrachten, da in Analogie ausschließlich anliegende Zellen im Wirkungsbereich der Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Juxtakrine

Wachstumsfaktoren, zum Beispiel *Transforming growth factor α* ¹³ und *Heparin-binding EGF-like growth factor*,¹⁴ werden als membranständige Proteine gebildet, die durch Bindung an Rezeptoren der Zielzelle eine Wirkung hervorrufen.¹⁵ Reagieren Zellen auf Faktoren, die von ihnen selbst gebildet und sezerniert werden, spricht man von einem autokrinen Wirkmechanismus, bei dem die Interaktion des Wachstumsfaktors mit einem Rezeptor eine Signalkaskade auslöst.¹⁰ Als eine Variante des autokrinen wird der intrakrine Mechanismus angesehen, bei dem gebildete Wachstumsfaktoren nicht sezerniert, sondern durch Bindung an nukleäre oder zytoplasmatisch lokalisierte Rezeptoren wirken.¹⁶

1.2. Der Hepatoma-derived Growth Factor

1.2.1. Die HDGF-Proteinfamilie

Der *Hepatoma-derived growth factor* (HDGF) wurde als erstes Mitglied einer neuen Familie von Proteinen aus dem Kulturmedium der humanen Hepatom-Zelllinie HuH-7¹⁷ und dem Überstand metanephrotischer Mesenchymalzellen der Ratte¹⁸ isoliert. Bis dato wurden neben HDGF fünf weitere homologe Proteine, sogenannte HDGF-related proteins 1-4 (HRP-1-4)¹⁹⁻²² und LEDGF (Lens epithelium-derived growth factor, *PsipI* oder *p52/75*)²³⁻²⁵ identifiziert, die sich durch eine ausgeprägte Konserviertheit der 91 N-terminalen Aminosäuren auszeichnen. Dieser Bereich wird als „*homologous to the amino terminus of HDGF*“ (HATH)-Region bezeichnet. Innerhalb der HDGF-Proteinfamilie weist der N-Terminus eine Sequenzübereinstimmung von 54–78% auf. Der C-Terminus der einzelnen Proteine unterscheidet sich sowohl in der Länge als auch im isoelektrischen Punkt (Abb. 1.2).

Für HRP-1 ist bislang noch keine spezifische Funktion beschrieben worden. Aufgrund seiner ausschließlichen Expression in den Testes wird jedoch eine mögliche Rolle von HRP-1 in der Spermatogenese diskutiert.²² Obwohl neben LEDGF auch HRP-2 mit der HIV Integrase interagiert,^{26,27} scheint nur LEDGF ein essentieller Kofaktor für die HIV Integration zu sein.²⁸ Weiterhin wirkt LEDGF als Koaktivator regulierend auf die Transkription.^{23,24} HRP-3, ein Wachstumsfaktor mit neurotrophen Eigenschaften, wird strikt neuronal exprimiert und wirkt fördernd auf das Neuritenwachstum.²⁹⁻³¹ Die Interaktion von HRP-3 mit Mikrotubuli ist für diese Wirkung funktionell von Bedeutung.³² Die Expression von HRP-4 ist analog zu HRP-1 auf die Testes beschränkt.¹⁹ Im Gegensatz dazu wird HRP-2 in vielen Geweben der Maus exprimiert, zum Beispiel in Leber, Gehirn, Herz, Skelettmuskel und Auge.²¹

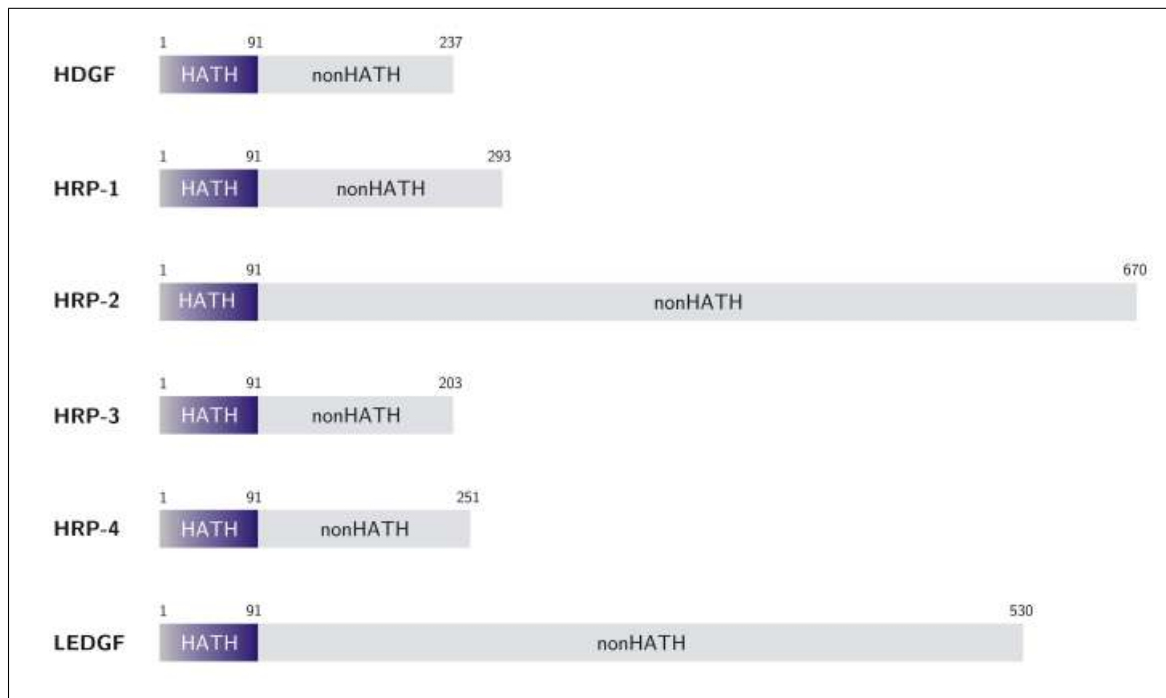


Abb. 1.2.: Schematischer Aufbau der Mitglieder der HDGF-Proteinfamilie. Alle Mitglieder zeigen einen modularen Aufbau mit einer hochkonservierten 91 Aminosäuren umfassenden N-terminalen HATH-Domäne (*homologous to the amino terminus of HDGF*) und einem spezifischen C-terminalen Bereich (nonHATH).

1.2.2. Struktur und Eigenschaften von HDGF

Während die humane HDGF cDNA für ein 240 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 26,8 kDa kodiert,¹⁷ bildet die murine HDGF-kodierende Sequenz ein 237 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 26,3 kDa.²⁹ HDGF zeigt jedoch in SDS-Gelen eine Laufanomalie und migriert bei einem scheinbaren Molekulargewicht von 38 kDa. Dieses veränderte Laufverhalten ist keine Folge posttranslationaler Modifikationen, sondern möglicherweise durch azide Bereiche des C-terminalen Bereichs bedingt.²⁹ Die kodierende Sequenz von HDGF ist im Vergleich verschiedener Spezies hochkonserviert. Zwischen der humanen, murinen und bovinen Gensequenz besteht für HDGF eine Sequenzübereinstimmung von 95%. Die Unterschiede beschränken sich hierbei auf die non-HATH Region.¹⁹

Die Primärsequenz von HDGF zeigt eine Homologie von 24% zu dem *High mobility group* (HMG)-1 Protein. Mitglieder der HMG-Proteinfamilie sind in der Zelle nukleär lokalisiert und spielen eine Rolle während der Chromosomenreplikation und der Tran-

skription. HMG-1 wird ebenfalls stark in transformierten Zellen exprimiert. Im Gegensatz zu Mitgliedern dieser Proteinfamilie besitzt HDGF jedoch nicht die charakteristische HMG-Box, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist.¹⁷

Analog zu HMG-1 Protein bindet HDGF stark an Heparin-ähnliche Glykosaminoglykane (HLGAGs).^{19,33} Maßgeblich ist daran die HATH-Region (siehe Abb. 1.3 A+B) von HDGF beteiligt³³. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Bindung an Heparansulfat die Internalisierung von HDGF durch Makropinozytose und Caveolin-vermittelte Mechanismen hervorruft.³⁴

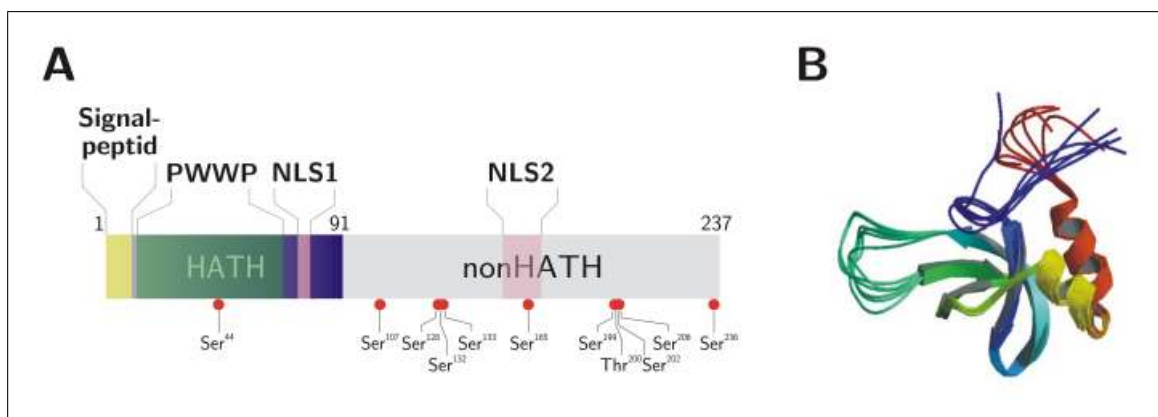


Abb. 1.3.: *Struktureller Aufbau von HDGF.* (A) Dargestellt sind die charakteristischen Domänen des murinen HDGF-Proteins. In der HATH-Region befinden sich neben der Signalsequenz (Aminosäuren 1-10) die PWWP-Domäne (Aminosäuren 12-69) und die NLS1 (Aminosäuren 75-80). Die non-HATH Region enthält die NLS2 (Aminosäuren 155-170). Darüber hinaus sind die bisher bekannten Phosphorylierungsstellen eingezeichnet. (B) NMR-Struktur der HATH-Region von humanen HDGF³³.

Wie in Abb. 1.3 A dargestellt verfügt HDGF innerhalb der hochkonservierten HATH-Region über eine schwach konservierte *Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin* (PWWP)-Domäne.^{35,36} Diese ca. 70 Aminosäuren umfassende Domäne wurde erstmals für das Gen *Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1* (WHSC1) beschrieben³⁷ und bisher in ca. 60 eukaryotischen Proteinen gefunden. Dazu zählen unter anderem die Methyltransferasen *Dnmt 3a* und *3b*.^{38,39} Es wird angenommen, dass die PWWP-Domäne eine Rolle bei Protein/Protein- sowie bei Protein/DNA-Interaktionen spielt. Neuere Untersuchungen der PWWP-Domäne von HDGF konnten belegen, dass die PWWP-Domäne von HDGF spezifisch ein 37 bp langes DNA-Motiv binden kann. Diese spezifische DNA-Sequenz konnte mit Hilfe vergleichender DNA-Analysen in der Promotorregion mehrerer Gene, darunter *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *SET and MYND domain containing 1* (SMYD-1), nachgewiesen werden.⁴⁰ Die Interaktion deutet auf regulatorische Eigenschaften und damit auf eine Funktion von HDGF als Transkriptionsfaktor hin.^{40,41}

Endogenes HDGF ist in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert. Während das Protein in Mesenchymal- und Hepatomzellen zytoplasmatisch nachzuweisen ist,^{17,18} zeigt sich in glatten Muskelzellen eine nukleäre Expression.⁴² Die nukleäre Lokalisation wird durch zwei nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) hervorgerufen, wovon sich eine in der konservierten HATH-Region (NLS1) und die andere im C-terminalen Bereich (NLS2) befindet.^{17,43} Eine derartige bipartite NLS-Struktur kommt häufig in nukleären Proteinen vor, zu denen auch Wachstumsfaktoren wie *Fibroblast growth factor* (FGF)-1⁴⁴ und FGF-2⁴⁵ zählen. Im Gegensatz zu FGF, das nach Bindung an einen FGF-Rezeptor und anschließende rezeptorvermittelte Internalisierung in den Nukleus transloziert wird,⁴⁶ konnte für HDGF bisher kein Rezeptor identifiziert werden. Allerdings ist die nukleäre Lokalisation von endogenem HDGF Voraussetzung für die Entfaltung seiner mitogenen Aktivität.^{47,48} Wenngleich HDGF ähnlich wie beispielsweise FGF-2⁴⁹ keine klassische Signalsequenz besitzt, konnte unlängst der Sekretionsmechanismus von HDGF aufgeklärt werden. Ein Signalpeptid bestehend aus den 10 N-terminalen Aminosäuren der HATH-Region ist dabei entscheidend an der Sekretion von HDGF beteiligt. Die Sekretion weiterer Proteine, beispielsweise EGFP, wird durch Verknüpfung des Signalpeptids mit dem N-Terminus des untersuchten Proteins vermittelt.⁵⁰

HDGF wurde initial aus dem Zellkulturmedium von HuH-7 Zellen isoliert, die sich ohne Zusatz von Serum vermehren können.¹⁷ Diese Zellen scheinen Faktoren zu exprimieren, die über autokrine, intrakrine oder parakrine Mechanismen mitogene Aktivität ausüben. Von diesen Erkenntnissen ausgehend wurde vielfach gezeigt, dass exogenes HDGF das Wachstum von verschiedenen Zelltypen, darunter Fibroblasten,¹⁷ Leberzellen,⁵¹ Lungenepithelzellen,⁵² sowie Endothelzellen,¹⁸ stimuliert. Einerseits lässt sich die proliferative Wirkung von extrazellulär appliziertem HDGF durch eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges in den stimulierten Zellen erklären^{53,54} und andererseits scheint HDGF eine Regulation der Zellzyklusphasen zu bewirken.⁵⁵

Während exogenes HDGF stimulierend auf die Proliferation wirkt, zeigen Versuche zur gezielten Verminderung von endogenem HDGF mittels Antisense-Oligonukleotiden^{48,56,57} und RNA-Interferenz^{51,58,59} ein vermindertes Wachstum und geringere Vitalität der untersuchten Zellen. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass der mitogene Effekt von exogen appliziertem HDGF nach Herabregulation von endogenem HDGF verstärkt wurde.^{51,52} Neben seiner proliferativen Funktion führt HDGF zu einer verstärkten Angiogenese.⁶⁰ Der angiogenetische Effekt kann sowohl über VEGF-abhängige als auch VEGF-unabhängige Mechanismen erfolgen.^{53,60}

1.2.3. Einfluss von HDGF während der Organogenese

HDGF wird in einer Vielzahl von Organen, darunter Herz, Niere, Leber, Pankreas, Skelettmuskel, Lunge und Plazenta, exprimiert.^{17,29} Daneben wird HDGF aufgrund seiner differentiellen Expression während der embryonalen und fetalen Entwicklung verschiedener Organe eine potentielle Rolle während der Organogenese zugesprochen. Während der embryonalen Entwicklung wird HDGF stark im Herzen exprimiert.⁶¹ Weiterhin wurde HDGF in hohem Maße in glatten Muskelzellen der fetalen Aorta der Ratte nachgewiesen und daraus eine mögliche Rolle während der Bildung des kardiovaskulären Systems abgeleitet.⁴² Mehrere Arbeiten beschreiben eine Expression von HDGF während der fetalen Entwicklung der Lunge.^{52,62} Studien zur Organogenese des Darmes der Maus zeigen die Abnahme der HDGF-Expression ab dem Embryonaltag E12.5⁶³ und vermuten regulative Funktionen von HDGF während der Entwicklung der Mukosa des Ileums.⁶⁴ Eine verstärkte Expression von HDGF wirkte sich in diesem Zusammenhang auf die Zelldifferenzierung des Darmepithels aus.⁶³ Neben einer Beteiligung von HDGF an der Entwicklung von Leber^{51,65} und Niere¹⁸ wurde eine deutliche Expression von HDGF während der embryonalen und neonatalen Entwicklung des Gehirns nachgewiesen.²⁹

1.2.4. Die Rolle von HDGF während der Apoptose

Der Prozess des programmierten Zelltodes, der Apoptose, zeichnet sich durch distinkte morphologische Charakteristika und energieabhängige biochemische Mechanismen aus. Für die Regulation dieser Mechanismen stehen einer Zelle unterschiedliche Signalwege zur Verfügung.⁶⁶ Die während apoptotischer Prozesse ablaufenden Signalkaskaden basieren dabei auf der Bildung zytosolischer, zelltodinduzierender „*death-inducing signaling*“-Komplexe (DISC)⁶⁷ beziehungsweise des Apoptosoms.⁶⁸ Daran schließt sich kaskadenartig die verstärkende Aktivierung nachgeschalteter, proapoptotischer Faktoren an, die eine Stimulation von Caspasen bewirken.⁶⁹

Der Zelle stehen zwei wesentliche Signalwege für den programmierten Zelltod zur Verfügung (siehe Abb. 1.4). Der extrinsische, durch Todesrezeptoren aktivierte, Apoptoseweg dient der Erkennung von Apoptose auslösenden Stimuli aus der Zellumgebung. Dieser Mechanismus beinhaltet die Interaktion eines Todesrezeptors, beispielsweise des Fas-Rezeptors, mit seinem Liganden, der sowohl parakrin, als auch autokrin aktivierend wirken kann. Der durch Bindung des Todesliganden stabilisierte Rezeptor-Ligand-Komplex bindet daraufhin Adaptermoleküle. Die daraus resultierende Aktivierung von Caspasen, den Effektormolekülen der Apoptose, leitet über Signalkaskaden die Endphase

des Zelltodes ein.⁶⁹ Der intrinsische, mitochondriale Zelltodsignalweg wird durch intrazellulär erzeugte Signale, beispielsweise infolge von zellulärem Stress nach einer DNA-Schädigung, stimuliert. Ebenso wirkt der Entzug von Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Zytokinen aktivierend auf die intrinsisch gesteuerte Apoptose.⁶⁶ Die Kontrolle dieses Signalweges wird durch pro- und antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie vermittelt.⁷⁰ Charakteristisch für den intrinsischen Weg sind spezifische, organellenvermittelte Signalwege, welche eine subzellulär fokussierte Aktivierung und Regulation der Signalmoleküle erlauben. Hauptsächlich sind hierfür die Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum, die Lysosomen und der Zellkern verantwortlich.⁶⁹ Die Bildung eines quaternären Protein-Signalkomplexes, des sogenannten Apoptosoms, wird durch die Freisetzung proapoptotischer Faktoren, zum Beispiel Cytochrom c, in das Zytosol stimuliert.⁶⁸

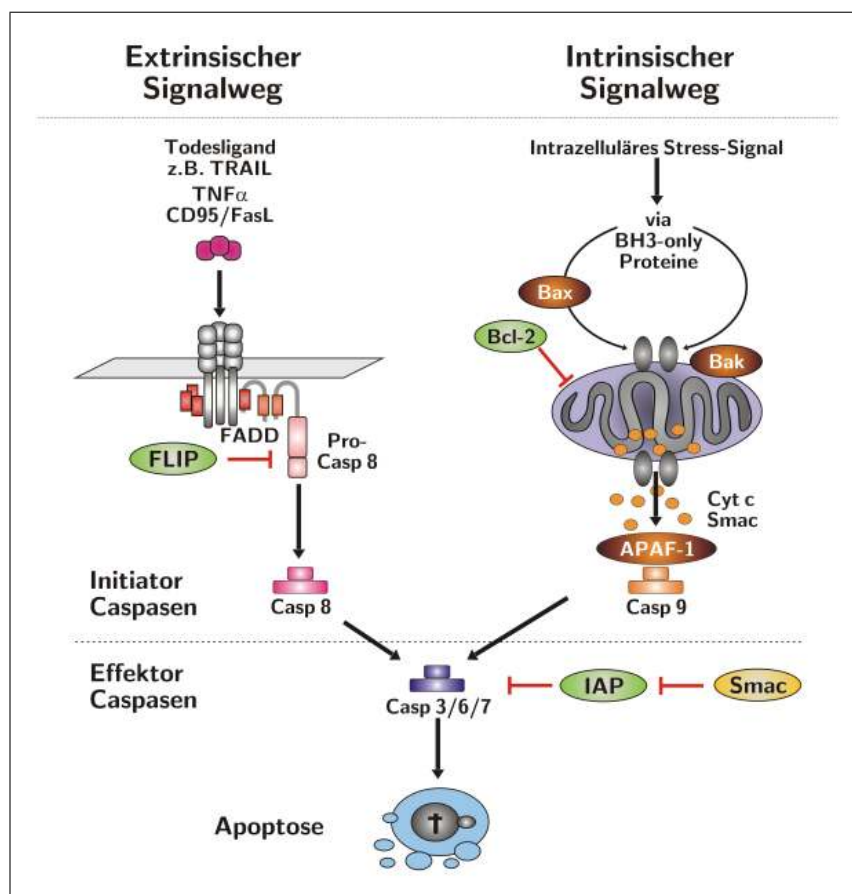


Abb. 1.4.: Apoptose-Signalwege. Dem Organismus stehen zwei Apoptose-Signalwege zur Verfügung: der extrinsische, durch Zelltodliganden und Todesrezeptoren aktivierte und der intrinsische Signalweg, der durch Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum (ER) reguliert und durch intrazelluläre Stresssignale, zum Beispiel nach DNA-Schädigung im Zellkern aktiviert wird. Gemeinsam ist beiden Apoptosewegen die Aktivierung von Effektorcaspasen über signalwegspezifische Initiatorcaspasen. (Darstellung modifiziert nach Daniel, 2008)⁶⁹

In einer vergleichenden Proteomanalyse wurde HDGF erstmals als putativer Modulator der Apoptoseregulation identifiziert. In diesem Versuchsansatz führte die Verringerung der HDGF-Expression durch RNA-Interferenz zu einer Retinierung von Cytochrom c in den Mitochondrien nach TNF α -Stimulation.⁷¹ Im Gegensatz dazu löst die alleinige Abschwächung von endogenem HDGF nach siRNA-Transfektion den programmierten Zelltod aus. Gleichzeitig erhöht sich die Expression von TRAIL, einem Todesliganden.⁵⁸ Weitere Studien belegen eine antiapoptotische Funktion von HDGF sowohl im extrinsischen, als auch im intrinsischen Signalweg der Apoptose nach Suppression von endogenem HDGF durch Antisense-Oligonukleotide.^{56,57} Die Blockade von HDGF mit spezifischen Antikörpern führte ebenfalls zu einer proapoptotischen Wirkung auf die in dem Fall untersuchten Colon-Karzinomzellen.⁵⁹ Jedoch konnte trotz der vielseitigen Befunde der genaue molekulare Mechanismus der regulativen Funktion von HDGF bislang nicht aufgeklärt werden. Die Studien lassen HDGF allerdings als mögliches Ziel für die Antitumorthherapie erscheinen, da eine Herabregulation des Proteins in unterschiedlichen Tumorzelltypen neben der Apoptoseaktivierung zu einer Wachstumsverminderung führt.

1.2.5. HDGF – ein putatives Alarmin

Unter dem Begriff „Alarmin“ werden endogene Moleküle verstanden, welche dem Organismus als Warnsignale bei Organ- oder Zellschäden dienen.⁷² Sie werden rasch nach dem nekrotischen Zelltod freigesetzt und sind an der Wiederherstellung der Homöostase durch Regulation regenerativer Prozesse beteiligt. Die Klassifizierung von HDGF als vermeintliches Alarmin basierte auf seiner Freisetzung aus nekrotischen Zellen, während das Protein in apoptotischen Zellen zurückgehalten wurde.^{63,73} Eine Beteiligung von HDGF an regenerativen Prozessen wurde in zahlreichen Arbeiten beschrieben. Ein transgenes Mausmodell zur Untersuchung der Degeneration von Motoneuronen zeigte eine erhöhte Expression von HDGF vor degenerativen Veränderungen.⁷⁴ Nach partieller Hepatektomie oder Tetrachlormethan-Behandlung wurde HDGF in verstärktem Maße in parenchymatischen Hepatozyten exprimiert.⁷⁵ Des Weiteren wird auch eine Rolle von HDGF bei pathologischen Vorgängen wie ulzerativer Colitis,^{76,77} Leberfibrosen⁷⁸ und Keloidbildung⁵⁴ diskutiert.

1.2.6. HDGF und Krebs

Als Krebs wird eine Gruppe von malignen Erkrankungen bezeichnet, die durch eine unkontrollierte Vermehrung von veränderten Zellen gekennzeichnet sind. Im Fokus der aktuellen Forschungsarbeiten zu HDGF steht die Aufklärung der Funktion dieses Wachstumsfaktors

während der Tumorentwicklung und -progression. Zahlreiche Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen HDGF und der Entstehung und Progression von Tumoren hin. Eine Überexpression von HDGF wurde bisher in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen,⁷⁹ Leberkarzinomen,^{80,81} malignen Melanomen,⁸² Tumoren von Ösophagus⁸³ und Pankreas,⁸⁴ sowie in bestimmten Tumoren des Magen-Darm-Traktes^{63,85,86} beschrieben. Mit der verstärkten HDGF-Expression in Tumoren einhergehend korreliert der Grad der Überexpression mit einer negativen Patientenprognose.^{79,80,83} Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Studien wird eine Anwendbarkeit von HDGF als prognostischer Marker in der Tumordiagnostik diskutiert.^{84,86–88} Obwohl HDGF lange als putatives Onkogen betrachtet wurde,⁸⁹ deuten neuere Erkenntnisse aus einem transgenen Mausmodell, in dem HDGF unter Kontrolle des Albumin-Promotors in Hepatozyten exprimiert wird, auf kein onkogenes Potential von HDGF hin.⁹⁰ HDGF scheint auch eine Rolle in der Angiogenese von Tumoren zu spielen. Während die Injektion HDGF überexprimierender Zellen zur Bildung von Tumoren und verstärkter Angiogenese in einem Nacktmaus-Modell führte,⁶⁰ resultierte die Verringerung von HDGF nach Transfektion spezifischer siRNA gegen HDGF zu Tumoren mit einer reduzierten Gefäßbildung.⁵⁸ Weitere Untersuchungen an einem Xenograft-Mausmodell führten nach Injektion von monoklonalen HDGF-Antikörpern zu einem verlangsamten Tumorwachstum und zu einer reduzierten Neovaskularisierung.⁹¹

1.3. Transgene Mausmodelle und Reportergene

1.3.1. Arten transgener Mausmodelle

Für die Untersuchung der physiologischen Funktion von Genen während der Embryogenese und postnatalen Entwicklung, die Analyse von Signalwegen, als auch die Erforschung von Krankheiten auf molekularer Ebene stellen transgene Mäuse ein wichtiges Werkzeug dar.^{92,93} Als molekulargenetische Strategien zum Studium von Genfunktionen in Mäusen und zur Erzeugung von Mausmodellen mit Bezug zu humanen Erkrankungen dienen heute weitestgehend die Pronukleusinjektion in befruchtete Oozyten sowie die gezielte Deletion von Gensequenzen in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen).⁹⁴

Transgene Mäuse. Transgene Mäuse können durch Mikroinjektion von DNA in den männlichen Pronukleus von Zygoten hergestellt werden.⁹⁵ Die Vorkerninjektion von linearen DNA-Fragmenten, welche aus dem jeweils zu exprimierenden Gen und einem geeigneten kurzen Promotorfragment bestehen, resultiert in einer zufälligen Integration der injizierten DNA in das Mausgenom. Die Expression des Transgens kann in Abhängigkeit vom Integrationsort durch benachbarte Enhancer- oder Repressorelemente und schließlich

durch die Anzahl der inserierten DNA-Kopien beeinflusst werden.⁹⁶ Praktisch bedeutet dies, dass immer mehrere Mauslinien mit unterschiedlichem Integrationslokus hergestellt werden müssen, um eindeutige Aussagen über Funktion und Expression des Transgens zu erhalten.^{97,98} Durch transgene Mäuse können definierte, mutierte oder artfremde Gene exprimiert oder überexprimiert werden. Darüberhinaus erlauben transgene Mäuse die zeitlich und örtlich gesteuerte Expression in Abhängigkeit von dem gewählten Promotor.

Gene-Targeting. Die gezielte Veränderung von Genen durch homologe Rekombination in ES-Zellen und die anschließende Generierung transgener Mäuse durch Blastozysteninjektion wird als Gene-Targeting bezeichnet.⁹⁹ Embryonale Stammzellkulturen werden gewöhnlich auf primären embryonalen Fibroblasten, sogenannten Feederzellen, kultiviert.¹⁰⁰ Die Fibroblasten produzieren verschiedene Faktoren, welche das Wachstum der ES-Zellen fördern und ihre Differenzierung hemmen.⁹⁸ Die Ausdifferenzierung wird weiterhin durch die Zugabe von *Leukemia inhibiting factor* (LIF) zum Kulturmedium verringert.¹⁰¹ Mit Hilfe der Elektroporation wird rekombinante DNA üblicherweise in die ES-Zellen eingebracht. Durch einen kurzen Stromimpuls wird dabei vorübergehend die Zellmembranpermeabilität soweit erhöht, dass die ES-Zellen DNA aufnehmen können und mit einer geringen Frequenz in ihr Genom integrieren.⁹⁸ Dieses Ereignis ist jedoch mit einer Frequenz von 10^{-3} sehr selten: von 1000 Zellen, die fremde DNA aufnehmen, baut eine Zelle die DNA stabil in ihr Genom ein¹⁰².

Gene-Targeting ermöglicht somit die gezielte Deletion („Knock-out“, siehe Abb. 1.5 A) oder Insertion von ganzen Genen oder Genbereichen an spezifischen Orten des Genoms, sowie gezielte Punktmutationen in Genen („Knock-in“, siehe Abb. 1.5 B). Die klassische Technik zur Generierung einer Knock-out-Mauslinie basiert auf der homologen Rekombination und stabilen Integration von DNA, die über große Bereiche zu entsprechenden Abschnitten des Empfänger-genoms homolog ist.¹⁰³ Dazu wird zur Einführung rekombinanter DNA in das Wirtsgenom ein sogenannter Targeting-Vektor verwendet. Dieser Vektor beinhaltet den modifizierten Genloкус samt eines Resistenzgens zur Selektion der rekombinierten ES-Zellen, sowie zwei, den mutierten Genbereich flankierende, endogene Homologiebereiche. Diese Homologiebereiche vermitteln nach Transfektion des Vektors durch Elektroporation in den ES-Zellen ein doppeltes Überkreuzen („*crossing over*“).¹⁰⁴ Die Frequenz des homologen Rekombinationsereignisses nach Transfektion des Targeting-Vektors in ES-Zellen ist mit 10^{-7} bis 10^{-3} sehr niedrig und insbesondere abhängig von der Beschaffenheit der Zielregion sowie der Länge der Homologiebereiche des Targeting-Vektors.^{105–107}

Die Knock-in Strategie verbindet Charakteristika der Techniken zur Herstellung transgener Mäuse sowie von Knock-out Mäusen. Die kodierenden Regionen eines Gens können dabei durch ein Reportergen ersetzt werden („*Reporter Knock-in*“). Ebenso erlaubt diese

Technik die Insertion von modifizierten endogenen Genabschnitten, zum Beispiel Punktmutationen, oder von exogenen Genen, wie beispielsweise Orthologen, an einem spezifischen Genlocus („*Functional Knock-in*“).⁹⁴

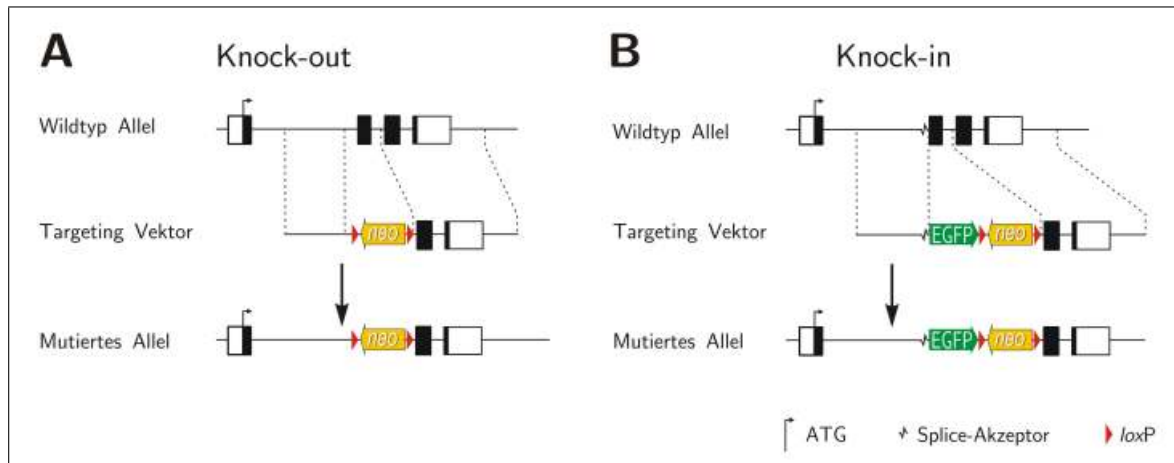


Abb. 1.5.: Konventionelle Gene Targeting Strategien. (A) Stark vereinfacht wird zur Generierung eines konventionellen Null-Allels ein Austauschvektor verwendet, in dem eine *neo*-Selektionskassette von homologen Bereichen flankiert ist. Nach erfolgreicher homologer Rekombination ersetzt die Selektionskassette ein Exon des Zielgens im mutierten Allel, was zu einer Inaktivierung des Gens führt. (B) Zur Herstellung eines Knock-in-Allels wird eine Splice-Akzeptor-EGFP-Reportergen-Kassette vor die Selektionskassette kloniert. Nach homologer Rekombination ersetzt das EGFP-Reportergen ein Exon des Zielgens im mutierten Allel. Wird die kodierende Sequenz des EGFP-Reporterverproteins in das Leseraster des Zielgens insertiert, kommt es anstelle des Zielgens zur Expression eines Fusionsproteins aus dem N-Terminus des Zielgens und des EGFP-Reporterverproteins. (Schwarze Boxen stellen kodierende Sequenzen und weiße Boxen nicht kodierende Bereiche eines Gens dar.)

Zur Selektion homolog rekombinierter ES-Zellklone werden positive Selektionsmarker wie beispielsweise die Neomycin-Phosphotransferase (*neo*) verwendet. Die Anwesenheit eines negativen Selektionsmarkers hingegen, zum Beispiel Thymidinkinase (*Tk*) oder Diphtherietoxin A (*DTA*), ist direkt oder über Stoffwechselprodukte toxisch für Zellen, in denen der Austauschvektor zufällig in das Genom integriert wurde. Der Targeting-Vektor wird daher so konstruiert, dass der negative Selektionsmarker nur bei homologer Rekombination des Vektors in das Genom verloren geht. Das heißt Zellen, die den Vektor nicht homolog in das Genom integriert haben, sterben.⁹⁸ Daneben stellt die Verwendung Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-defizienter HM-1-ES-Zellen¹⁰⁸ durch Selektion auf An- beziehungsweise Abwesenheit eines HPRT-Minigens¹⁰⁹ ein effizientes Selektionsverfahren dar. Grundlage dieses Systems bildet die zusätzliche Insertion eines HPRT-Minigens zusammen mit der gewünschten Mutation am Ziellokus. Durch Zugabe von Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) in das ES-Zell-Kulturmedium wird auf die Anwesenheit des HPRT-Gens selektiert.

Der Nachweis einer homologen Rekombination erfolgt schließlich über PCR- und Southern-Blot Analysen. Positiv identifizierte ES-Zellklone werden in Blastozysten injiziert und anschließend in den Uterus scheinchwangerer Ammenmütter implantiert. Es entwickeln sich chimäre Mäuse, die aus den Nachkommen der Blastozysten und den Nachkommen der veränderten ES-Zellen bestehen. Die Chimären mit transgenem Allel können an ihrer gefleckten Fellfarbe erkannt werden.¹¹⁰ Entwickeln sich aus den mutierten ES-Zellen auch Keimzellen, so kann das veränderte Gen an die Nachkommen weitergegeben werden.¹¹⁰ Durch Verpaarung von Chimären können heterozygote Stämme etabliert werden, die eine Kopie des modifizierten Genlokus in allen Zellen des Körpers tragen. Schließlich können aus Verpaarungen heterozygoter Tiere homozygote Mutanten erhalten werden.⁹⁸

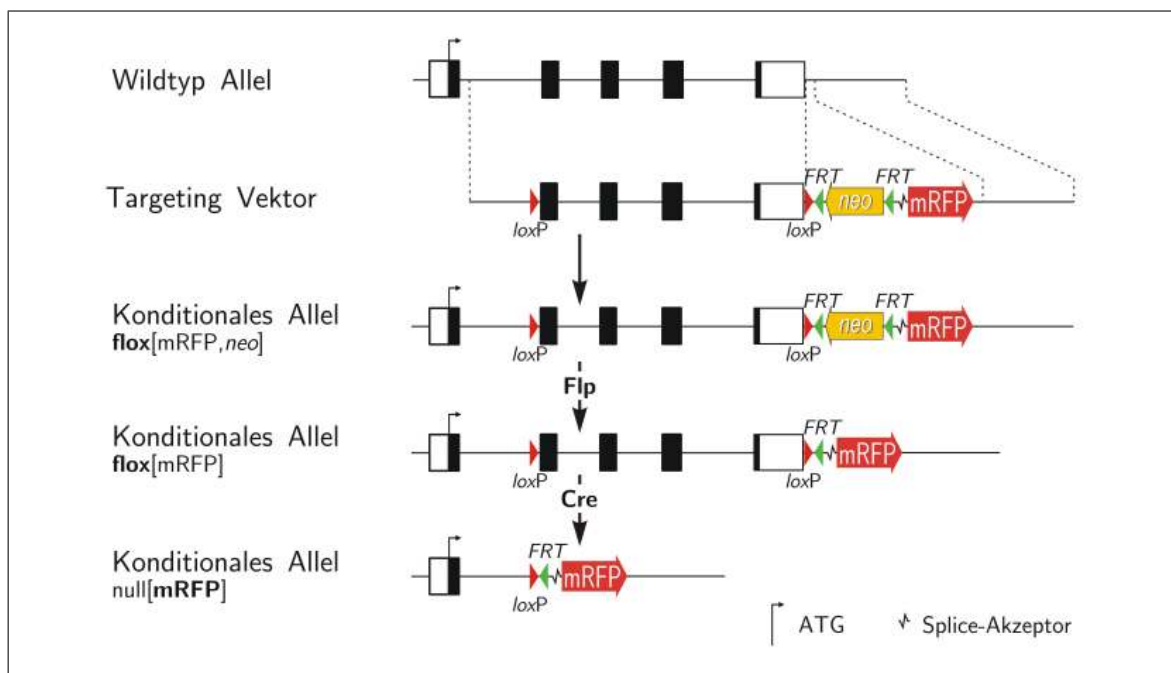


Abb. 1.6.: Herstellung eines konditionalen Knock-in Allels. Ein Austauschvektor zur Generierung eines konditionalen Knock-in-Allels enthält eine 5'-homologe Region gefolgt von einem mit *loxP*-Sequenzen flankierten Bereich, der sog. *geflochten* Region. Dahinter folgt eine von *FRT*-Motiven flankierte *neo*-Selektionskassette sowie eine Splice-Akzeptor-Sequenz mit dem *mRFP*-Reporter gen und dem 3'-homologen Bereich. Nach homologer Rekombination entsteht ein konditionales Allel, in dem Teile des Zielgens durch *loxP*-Sequenzen *geflocht* vorliegen und in dem 3' des Genlokus eine *neo*-Selektionskassette und ein *mRFP*-Reporter gen insertiert wurde. Durch Expression von Flp-Rekombinase *in vitro* oder *in vivo* kann die *neo*-Kassette entfernt werden. Die Expression von Cre führt zur Deletion des *geflochten* Bereichs und damit zur Inaktivierung des Zielgens. Gleichzeitig bildet sich ein chimäres Transkript aus Exon 1 und *mRFP*, das in der Expression eines Fusionsproteins aus dem N-Terminus des Zielgens und des *mRFP*-Reporterproteins resultiert. (Schwarze Boxen stellen kodierende Sequenzen und weiße Boxen nicht kodierende Bereiche eines Gens dar.)

Konditionales Gene-Targeting. Wie bereits dargestellt, können mit Hilfe homologer Rekombination Genabschnitte deletiert („Knock-out“) oder neue Genabschnitte in das Genom eingebracht werden („Knock-in“). Embryonal letale Phänotypen oder schwere multiple Entwicklungsdefekte führen dazu, dass adulte oder möglicherweise überlagerte subtile Entwicklungsstörungen nicht analysiert werden können.⁹⁸ Die Entwicklung der Rekombinase-vermittelten Mutagenese ermöglichte hier eine zeit- und ortsspezifische Mutation.^{111,112} Der Ansatz basiert auf der Verwendung von Cre-Rekombinase und Flippase-Rekombinase (Flp-Rekombinase). Während die Cre-Rekombinase ein Enzym aus dem Bakteriophagen P1 ist, stammt die Flp-Rekombinase ursprünglich aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Beide Enzyme erkennen spezifisch 34 bp lange DNA-Motive und sind in der Lage den DNA-Bereich zwischen zwei gleichorientierten Signalsequenzen zu deletieren.¹¹² Diese Sequenzen werden für Cre als *loxP*-Sequenzen bezeichnet, die für Flp als *FRT*-Sequenzen. Werden durch homologe Rekombination *loxP*- oder *FRT*-Sequenzen in ein Gen eingebaut, so kann später durch Gewebe- oder zelltypspezifische Expression der jeweiligen Rekombinase die DNA zwischen den Erkennungssequenzen aus dem Genom deletiert werden (siehe Abb. 1.6). Durch die gezielte Kombination gewebe- oder zelltypspezifischer Promotoren mit induzierbaren Varianten von Cre oder Flp kann eine exakte zeitliche und örtliche Kontrolle der Rekombination erreicht werden.^{98,113}

1.3.2. Reportergene

Reportergene erlauben die kombinierte Funktions- und Expressionsanalyse eines Gens.¹¹⁴ Dazu wird die kodierende Region des zu untersuchenden Gens durch die kodierende Sequenz eines artfremden Reportergens ersetzt. Die Expression des Reportergens ist damit von der jeweiligen Promotoraktivität des genuinen Zielgens abhängig. In „Knock-in“-Mäusen können mit dieser Technik neben Erkenntnissen über funktionelle Auswirkungen der Inaktivierung des zu untersuchenden Gens auch Erkenntnisse über dessen Expressionseigenschaften durch Analyse der Reporterexpression gewonnen werden.⁹⁴

Lange Zeit war *lacZ*, das bakterielle Enzym β -Galaktosidase, aufgrund seiner einfachen Detektion und hohen zellulären Auflösung das Reportergen der Wahl.¹¹⁵ Nachteil war und ist, dass keine Nachweise an lebenden Gewebe durchgeführt werden können, da eine Fixierung des Gewebes notwendig ist.

Im Gegensatz dazu kodiert die komplementäre DNA-Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* für ein fluoreszierendes Protein,¹¹⁶ dessen Fluoreszenz unabhängig von exogenen Substraten oder Kofaktoren ist. Die Expression von GFP kann als stabil fluoreszierender Marker für Studien zur Genexpression oder zur subzellulären Lokalisation von Proteinen genutzt werden.¹¹⁷ Die Verwendung von GFP

als Fusionsprotein ermöglicht neben der Untersuchung von Protein–Protein-Interaktionen auch die Durchführung von „*lineage tracing*“-Experimenten sowie die Messung der Zellmigration („*cell tracking*“). Diese Analysen werden durch gerichtete Lokalisation des fluoreszierenden Fusionsproteins mit Hilfe geeigneter Lokalisationsmotive in distinkte Zellkompartimente erleichtert: (i) nukleär mittels nukleärer Lokalisationssequenzen (*NLS*) sowie durch Bindung an Chromatin mit Sequenzen des humanen Histonproteins (*H2B*), (ii) membranständig durch eine Myristoylierungssequenz (*myr*) oder Glykosylphosphatidylinositol (*GPI*)-Anker sowie (iii) durch Bindung an Strukturen des Zytoskeletts, zum Beispiel mit dem Mikrotubuli-bindenden Protein *Tau*.^{118,119} Gezielte Veränderungen der kodierenden Sequenz des Wildtyp-GFP-Proteins führten zu Varianten fluoreszierender Proteine (FP), darunter das verstärkt grün fluoreszierende Protein (EGFP), das sich durch verbesserte Leuchtkraft und Photostabilität auszeichnet.¹²⁰ Aus Mutationsexperimenten resultierten neue fluoreszierende Reporterproteine mit veränderten spektralen Eigenschaften, beispielsweise das verstärkt cyan fluoreszierende Protein (ECFP) und das verstärkt gelb fluoreszierende Protein (EYFP).^{121–123} Einige der modifizierten GFP-Varianten finden erfolgreich als genetisch kodierte fluoreszierende Reporter in transgenen Mäusen Anwendung.^{124–126} Obwohl GFP und dessen Varianten in einer Vielzahl transgener Mausmodelle erfolgreich als Reporterprotein *in vivo* eingesetzt wurden, und GFP allgemein als untoxisch für den Organismus beschrieben wird,¹¹⁹ sollten inhibitorische Effekte auf die Poly-Ubiquitinierung durch EGFP und dessen Fusionsproteine bedacht werden.¹²⁷

Neben GFP und seinen Varianten stellen die rot fluoreszierenden Proteine (RFP) einen weiteren Typus fluoreszierender Proteine dar. Der erste Vertreter dieser Klasse von Proteinen, *dsRed*, wurde erstmals aus der Seeanemone *Discosoma striata* isoliert.¹²⁸ Im Gegensatz zu GFP konnte das tetramere DsRed aufgrund seiner vermeintlichen Toxizität nicht als fluoreszierender Reporter in transgenen Mäusen eingesetzt werden.¹²⁶ Durch Modifikation der Gensequenz von *dsRed* gelang die Herstellung von mRFP-1, einer monomeren RFP-Variante.¹²⁹ Obwohl monomeres RFP erfolgreich als genetisch kodierte FP in transgene Mausmodelle eingebracht werden konnte,¹³⁰ deuten aktuelle Studien ebenfalls auf ein toxisches und teratogenes Potential dieses fluoreszierenden Markerproteins hin.^{119,131}

Die herausragende Eigenschaft fluoreszierender Markerproteine, die direkte Visualisierung (*live imaging*) zellulärer und subzellulärer Prozesse *in vivo*, wurde sowohl durch die Entwicklung photomodulierbarer FP als auch durch die Generierung fluoreszierender Varianten mit spektralen Eigenschaften im Nahinfrarot-Bereich stark erweitert.¹¹⁹ Moderne, leistungsstarke Detektionssysteme und neu entwickelte Methoden erlauben die hochauflösende Detektion fluoreszierender Marker in lebenden Zellen und isolierten Organen^{132–134} sowie direkt in Organismen, zum Beispiel in Xenograft-Mausmodellen.¹³⁵

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Der *Hepatoma-derived Growth Factor* (HDGF) stellt ein Protein dar, dem viele unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden. Aufgrund seiner ausgeprägten Expression in verschiedenen Organen während der Embryonalentwicklung wird eine Beteiligung an der Organogenese vermutet. Daneben besitzt es proliferative Eigenschaften und scheint regulative Funktionen während der Apoptose auszuüben. Die Expressionshöhe von HDGF in verschiedenen Tumorarten korreliert mit der Aggressivität und der Überlebenschance. Der genaue Mechanismus mit dem HDGF seine vielfältigen Funktionen steuert, ist jedoch auf molekularer Ebene noch nicht geklärt.

Für die weitergehende Charakterisierung der Expression und Funktion von HDGF soll in dieser Arbeit durch homologe Rekombination eine transgene Mauslinie hergestellt werden, in der Teile des HDGF-Gens durch die kodierende Sequenz eines fluoreszierenden Reportergens ersetzt sind, so dass die Expression eines Fusionsproteins aus dem N-Terminus von HDGF und dem Reporterprotein unter der Kontrolle des endogenen HDGF-Promotors erfolgt.

Initial sollten dazu Targeting-Vektoren kloniert werden, die einen konstitutiven Knock-in mit verstärkt grün fluoreszierendem Protein (EGFP), sowie einen konditionalen Knock-in mit monomerem rot fluoreszierendem Protein (mRFP) erlauben.

Für den konstitutiven Knock-in sollen Teile der genomischen Sequenz des HDGF Gens durch den kodierenden Bereich des EGFP-Gens ersetzt werden. Dazu soll der 5'-Homologebereich aus dem Intron I mit der Splice-Akzeptor-Sequenz von Exon 2 in das Leseraster des EGFP-Gens kloniert werden.

Ein entsprechender Targeting-Vektor zur Generierung einer konditionalen Knock-in-Maus soll unter Verwendung genomischer Sequenzabschnitte des HDGF-Gens und eine durch zwei *FRT*-Sequenzen-flankierte neo-Selektionskassette hergestellt werden, wobei ein Großteil der kodierenden Region des HDGF-Gens von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert ist. Zusätzlich soll ein Reporter gen in den Vektor integriert werden, so dass nach Cre-Rekombinase vermittelter Deletion des *loxP*-umspannten genomischen Bereichs ein Fusionsprotein aus dem N-Terminus von HDGF und mRFP unter Kontrolle des endogenen HDGF-Promotors exprimiert wird.

Die Funktionalität der einzelnen Genabschnitte der fertigen Targeting-Vektoren soll untersucht und belegt werden. Nach erfolgreicher Elektroporation und anschließender Selektion sollen positiv identifizierte embryonale Stammzellklone nach eingehender Über-

prüfung schließlich durch Blastozysten-Injektion zur Etablierung einer HDGF-defizienten Mauslinie führen. Diese erzeugten Mäuse sollen auf mögliche Defekte während der Organentwicklung und die Expression des HDGF-Reporterproteins analysiert werden.

Um mögliche Effekte der HDGF-Defizienz *in vitro* zu analysieren, soll ein leicht zugängliches primäres Zellkulturmodell generiert und charakterisiert werden. Mit Hilfe dieses Testsystems sollen dann abschließend die Auswirkungen des Verlustes an endogenem HDGF auf Proliferation, Zellzyklus und Apoptose untersucht werden.

2. Material

2.1. Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien wurden, sofern nichts anderes vermerkt, in Analyse-Qualität (*pro Analyti, p.A.*) von den Firmen Fluka (Taufkirchen), Gibco BRL (Neu-Isenburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Radioaktiv markierte Chemikalien stammten von den Firmen Hartmann (Braunschweig) und Amersham Biosciences (Freiburg). Enzyme und Reagenziensätze der Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Finnzymes (über Fisher Scientific, Schwerte), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Heidelberg), Roche (Basel) und Serotec (Düsseldorf) wurden nach den Angaben der Hersteller eingesetzt.

2.2. Medien und Lösungen

Für die Herstellung von Lösungen und Puffern wurden, soweit nicht anders angegeben, ausschließlich deionisiertes Wasser einer Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q plus (Millipore, Billerica, MA, USA), beziehungsweise HPLC-Grade Wasser der Firma Merck eingesetzt. Die pH-Werte wurden mit 10 N NaOH oder 36% HCl eingestellt.

Lösungen und Puffer für die Nukleinsäureanalytik

DEPC-H ₂ O	5% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) mit ddH ₂ O (1 h autoklaviert bei 120 °C) versetzen, über Nacht unter Rühren lösen und anschließend 1 h autoklavieren.
ES-Lysis-Puffer	50 mM NaCl 20 mM Tris 100 mM EDTA pH 8,0 5% SDS 2 mM CaCl ₂
RNAase-Lösung (10 mg/mL)	200 mg RNAse (Sigma) ad 20 mL ddH ₂ O 15 min kochen, langsam abkühlen lassen. Aliquots á 1 mL bei -20 °C lagern.

Ethidiumbromid	10 mg/mL Stammlösung in ddH ₂ O
MOPS (10 ×)	200 mM MOPS pH 7,0 50 mM Natriumacetat pH 4,8 10 mM EDTA pH 8,0 pH 6,7 mit 5 N NaOH 1 h bei 120 °C autoklavieren und lichtgeschützt bei 4 °C lagern.
Proteinase K-Lösung (20 mg/mL)	1 g Proteinase K (Roche) ad 50 mL ddH ₂ O Aliquots á 1 mL bei -20 °C lagern.
Laird-Puffer	100 mM Tris 5 mM EDTA pH 8,0 200 mM NaCl 0,2% SDS
SSC (20 ×)	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat pH 7,5
SSPE (20 ×)	3 M NaCl 0,2 M NaH ₂ PO ₄ 20 mM EDTA pH 7,4
Depurinierungslösung	0,2 N HCl
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	1 M Tris-HCl pH 7,4 1,5 M NaCl
FBI-Hybridisierungspuffer	1,5 × SSPE 10% PEG8000 7% SDS
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0
3 M Natriumacetat	408,1 g Natriumacetat × 3 H ₂ O in 800 mL ddH ₂ O lösen mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen

TAE (50 ×)	2,5 mM Tris 100 mM EDTA 1 M Natriumacetat mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt
DNA-Ladepuffer (6 ×)	10 mM Tris-HCl pH 7,4 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glycerin
RNA-Probenpuffer	2 Teile Formamid 1 Teil 37% Formaldehyd 1 Teil MOPS (10 ×)
6 M NaCl-Lösung	35 g NaCl ad 100 mL ddH ₂ O

Lösungen für die Bakterienkultur

LB-Medium	1% NaCl 1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Hefe-Extrakt ad 1 L ddH ₂ O, mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt, autoklaviert.
LB-Agar	1,5% Agar ad 1 L LB-Medium, autoklavieren, gegebenenfalls Zugabe von Antibiotika bei 55 °C zur Bakterienselektion: Ampicillin 100 µg/mL, beziehungsweise Kanamycin 50 µg/mL
Ampicillin-Stammlösung	5% Ampicillin in ddH ₂ O; sterilfiltrierte Aliquots á 1 mL bei -20 °C lagern. Anwendung: 1 µL Stammlösung/mL Medium
Kanamycin-Stammlösung	2,5% Kanamycin in Ethanol 96%; sterilfiltrierte Aliquots á 1 mL bei -20 °C lagern. Anwendung: 5 µL Stammlösung/mL Medium
IPTG (10 mg/mL)	500 mg IPTG in 50 mL ddH ₂ O Aliquots á 1 mL bei -20 °C lagern.
X-Gal (40 mg/mL)	1 g X-Gal in 25 mL Dimethylformamid lösen; Aliquots á 1 mL bei -20 °C lagern.
Blau/Weiss-Screening-Lösung	4 µL IPTG (10 mg/mL) 16 µL X-Gal (40 mg/mL) 180 µL PBS

Medien und Lösungen für die Zellkultur

1%ige Gelatine-Lösung	5 g Gelatine ad 500 mL Zellkulturwasser; 1 h autoklavieren, die Lösung mischen und nochmals für 1 h autoklavieren; bei 4 °C lagern.
ES-EDTA-Lösung	5 mM EDTA in ES-PBS pH 7-8; 1 h autoklavieren; bei 4 °C lagern.
ES-Einfriermedium	30 mL ES-WT-Medium 6 mL FBS 4 mL DMSO
ES-Trypsin	400 mL ES-PBS 100 mL 5 mM ES-EDTA 5 mL Trypsin Aliquots á 50 mL bei -20 °C lagern.
ES-WT-Medium	500 mL Glasgow Modified Eagle Medium 28 mL FBS 28 mL NCS 5,6 mL Natriumpyruvat 5,6 mL ES-L-Glutamat 5,6 mL Non-Essential Aminoacids 900 µL Monothioglycerol 550 µL LIF (Arbeitsgruppe Prof. Magin) bei 4 °C circa 2 Wochen lagerbar.
HAT/HT-ES-Medium	550 mL ES-WT-Medium 5,5 mL HAT- beziehungsweise HT-Lösung bei 4 °C circa 2 Wochen lagerbar.
HBS-Puffer (10 ×)	16 g NaCl 0,74 g KCl 0,252 g Na ₂ HPO ₄ 2 g Dextrose 10 g HEPES ad 200 mL ddH ₂ O pH 7,2 sterilfiltrieren und Aliquots á 10 mL bei -20 °C lagern.
Pen/Strep-Lösung (100 ×)	10000 IU/mL Penicillin (Gibco BRL) 10 mg/mL Streptomycin in PBS sterilfiltrieren und Aliquots á 5,6 mL bei -20 °C lagern.
1% Ascorbinsäure-Lösung	1 g Ascorbinsäure ad 100 mL PBS sterilfiltrieren und Aliquots á 5,6 mL bei -20 °C lagern.
Dispase II-Lösung	0,8 U/mL Dispase II in PBS sterilfiltrieren und Aliquots á 5,6 mL bei -20 °C lagern.

Trypsin-Lösung	0,25% (v/v) Trypsin 1 mM EDTA in DMEM-Medium sterilfiltrieren und Aliquots á 5,6 mL bei -20 °C lagern.
Collagenase I-Lösung	130 mM NaCl 10 mM Calciumacetat 20 mM HEPES pH 7,2 0,5% BSA 400 U/mL Collagenase I sterilfiltrieren und Aliquots á 10 mL bei -20 °C lagern.
DMEM-Kulturmedium	10% FCS (hitzeinaktiviert) 0,1% Ascorbinsäure 2 mM L-Glutamat 1 × Pen/Strep in DMEM mit 4500 mg/L Glucose (Gibco BRL) bei 4 °C circa 2 Wochen lagerbar
Einfriermedium	10% DMSO 40% FCS (hitzeinaktiviert) 50% DMEM

Lösungen für proteinbiochemische Untersuchungen

TBS (10 ×)	100 mM Tris-HCl 1,5 M NaCl pH 8,0
TBST	1 × TBS 0,1% Tween-20
Ammoniumpersulfat (APS)	10% APS in ddH ₂ O Aliquots á 1 mL bei -20 °C lagern.
Ponceau-Gebrauchslösung	0,2% Ponceau S 3% Trichloressigsäure
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 bei 4 °C lagern.
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 bei 4 °C lagern.
Blotpuffer	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 0,037% SDS 20% Methanol

SDS-Laufpuffer (10 ×)	30,3 g Tris-Base 144 g Glycin 10 g SDS ad 1 L mit ddH ₂ O
Laemmli-Puffer (4 ×)	8% SDS 40% Glycerol 240 mM Tris-HCl pH 6,8 0,04% Bromphenolblau 4% β-Mercaptoethanol in Aliquots bei -20 °C lagern.
Western-Blockpuffer	3% Magermilchpulver 2% BSA in TBST lösen und durch Faltenfilter filtrieren.
RIPA-Lysispuffer	10 mM Phosphatpuffer pH 7,2 0,1% SDS 0,1% Triton X-100 0,1% Natriumdesoxycholat 2 mM EDTA 2 mM Pefablock 1 µg/mL Leupeptin 1 µg/mL Pepstatin

Medien und Lösungen für die Histologie

PBS ⁺ (10 ×)	10% BSA in PBS ⁻ (10 ×)
8% Paraformaldehyd	32 g Paraformaldehyd (PFA) in 350 mL ddH ₂ O unter Zusatz von 500 µL NaOH und Erhitzen auf maximal 70 °C unter Rühren lösen; nach Abkühlung auf RT mit 40 mL 10 × PBS versetzen und mit ddH ₂ O auf 400 mL auffüllen; Aliquots á 50 mL bei -20 °C lagern.
Mounting-Medium (Lösung 1)	20 g Mowiol 4-88 in 80 mL PBS bei RT über Nacht rühren; 40 mL Glycerin zugeben und erneut über Nacht rühren; Lösung 1 h bei 15000 rpm zentrifugieren und Überstand mit 2 mM NaN ₃ versetzen; Lagerung bei 4 °C
Mounting-Medium (Lösung 2)	2,5 g Propylgallat in 50 mL PBS bei RT über Nacht rühren (Gefäße in Alufolie einwickeln; wird milchig-trüb); mit 1 M NaOH auf pH 7,3 einstellen und nochmals 1-2 h rühren; 50 mL Glycerin zugeben und weiter rühren bis die Lösung klar (leicht gelblich) ist; Lösung in Braunglasflasche bei 4 °C lagern.

Mounting-Medium	7,5 mL Mounting-Medium (Lösung 1) mit 2,5 mL Mounting-Medium (Lösung 2) mischen; im Dunklen bei 4 °C bis zu 6 Monate haltbar.
Alcianblau-Färbelösung	15 mg Alcianblau 80 mL 95% Ethanol 20 mL Eisessig
Alizarinrot-Färbelösung	50 mg Alizarinrot in 1 L 2% KOH

Sonstige Lösungen

Ammoniumchlorid-Lysepuffer	10 mM KHCO ₃ 150 mM NH ₄ Cl 0,1 mM EDTA pH 8,0
----------------------------	--

Kommerzielle Lösungen

Name	Hersteller
Rotiphorerse Acrylamid-Lösung	Roth
Polyvinylalkohol mit Dako Mounting Medium	Fluka
DPX Mounting Medium	Fluka
Demecolcine Lösung	Sigma
ES-PBS	Gibco BRL
Glasgow Modified Eagle Medium	Gibco BRL
HiDi Formamid	Applied Biosystems
Histoprime [®] HistoGreen Substratkit	Linaris
Natriumpyruvat 100x	Gibco BRL
Non-Essential Amino Acids 100x	Gibco BRL
RapidHyb-Buffer	Amersham
RedTaq-Ready Mix	Sigma
Roti-Phenol/Chloroform	Roth
TEMED	BioRad
Tissue-Tec	Sakura
TRIzol-Reagenz	Invitrogen
Trypsin 2,5%	Gibco BRL
Zellkulturwasser	Gibco BRL

2.3. Materialien

Allgemeine Labormaterialien

Name	Hersteller
Plastikröhrchen 15 mL	Sarstedt
Plastikröhrchen 50 mL	Sarstedt
Reagiergefäße 0,2-2 mL	Sarstedt
Einmalspritzen 5-50 mL	Braun
Sterican Injektionskanülen 23 G	Braun
Pasteurpipetten	Assistent
Pipettenspitzen 10-1000µL	Greiner
Petrischalen 6 cm, 10 cm	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Röntgenfilm Super RX	Fuji Medical X-Ray Film
Whatman Papier	Schleicher & Schüll
Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schüll
Hybond N ⁺ Nylonmembran	Amersham
Superfrost [®] Plus Objektträger	Merck

Kommerzielle Reagenzien-Kits

Name	Hersteller
BigDye v 1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiagen PCR Purification Kit	Qiagen
Megaprime-DNA labelling system	Amersham
SuperSignal West Pico ECL Kit	Pierce
Alarmablu [®]	Serotec
Caspase-Glo [®] 3/7 Assay	Promega
Qiagen RNAeasy Extraction Kit	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
Phusion [®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
Taq DNA Polymerase (recombinant) Kit	Fermentas
Pfu DNA Polymerase Kit	Fermentas
Vectastain ABC-Kit	Vector

Geräte

Name	Hersteller
ABIPrism 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer
Ascensia Elite Blutzuckermessgerät	Bayer Health Care
BioRad GenePulser® II	BioRad
BioRad Mini Protean 3 Gelkammer (klein)	BioRad
BioRad Proteax Xi Gelkammer (groß)	BioRad
BioRad Semidry Westernblot Transblot SD Cell	BioRad
Brutschrank Forma Scientific	ThermoElectron
Dampfsterilisator Varioklav EC	H+P Labortechnik
Digital-pH-Meter 646	Knick
Eismaschine	Ziegra
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Eigenbau
Filmentwickler-Automat Curix 60	AGFA
GENios Microplaterereader	Tecan
Handmonitor LB 122	Berthold
Heizblock	Stuart Scientific
Kryostat Leica CM 1510S	Leica
Magnetrührer Ikamag RET	Ika-Werke
Mikroskop Zeiss Telaval 31	Carl Zeiss AG
Mikroskop Zeiss Axiovert 100M mit Axiocam HRm	Carl Zeiss AG
Odyssey Fluoreszenzscanner	Leicor
PCR-Gerät T3 Thermocycler	Biometra
Phosphoimager BAS-1800II	Fujifilm
Thermoschüttler	New Brunswick Scientific
Spektralphotometer DU 640	Beckmann
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik
Sterilbank Clean Air Technik	JAWoerden
Sterilbank Labgard class II, Typ A/B3	Nuaire
Ultraturrax T25	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik
UV-Handlampe	Konrad Benda Laborgeräte
UV-Crosslinker UVC 500	Amersham Biosciences
Vortexer Unimag Zx3 Classic	UniEquip
Analysenwaage CP 124S-OCE	Sartorius
Waage PC 4400	Mettler
Wasserbad 1083	GFL
Zentrifuge Eppendorf 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Eppendorf 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge Beckmann Ultrazentrifuge Optima	Fullerton

Größenstandards für DNA- und Protein-Analysen

Bezeichnung	Fragmentgrößen
Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder	250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp
Lambda DNA/HindIII Marker	125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130 bp
Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker	125, 564, 831, 947, 1375, 1840, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5158, 21226 bp
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 170 kDa

Klonierungsvektoren und rekombinante Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Quelle/Referenz
pBluescript SK(-)	Klonierungsvektor; Blau-Weiss-Selektion; T7/T3 Promotoren; Ampicillin-Resistenz	Stratagene
pEGFP-N1	Eukaryotischer Expressionsvektor zur Fusionsproteinherstellung von cDNA und EGFP, Kanamycin-Resistenz	Clontech
pDsRed-monomer-N1	Eukaryotischer Expressionsvektor zur Fusionsproteinherstellung von cDNA und monomeren dsRed, Kanamycin-Resistenz	Clontech
pcDNA3.1	Eukaryotischer Expressionsvektor; Ampicillin-Resistenz; MCS; G418 Resistenz	Clontech
pHWlox1	HPRT-Minigen unter der Kontrolle des PGK-Promotors, flankiert von loxP-Sites, Ampicillin-Resistenz	Magin <i>et al.</i> ¹⁰⁸
pCre-Pac	Eukaryotischer Expressionsvektor, welcher für Cre-Rekombinase und Puromycin-N-Acetyltransferase codiert	Taniguchi <i>et al.</i> ¹³⁶
Genomischer BAC-Klon RP23-377C20	beinhaltet das murine HDGF-Gen, Exon I in sense, Exon II–VI in antisense, NCBI-ID: AC079639	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD)

Primer

Nr.	Name	Sequenz 5' → 3'	
829	mHDGF left	GACCTGGTGTGGCGAAGAT	
830	mHDGF right	GCTTGCCAAACTTCTCCTTG	
831	mHRP-2 left	AGGATGGAGAGCGATTCTGA	
832	mHRP-2 right	TCCTCTTCTGATGGGGACAC	
833	mHRP-3 left	ACGACTGCAGACTTGCAGAA	
834	mHRP-3 right	CAACAAAGACCGTTGGTTCA	
853	nonHATHSense	CTCGAGCTCGAATTCCAGTCCCTCCCAGAAAAAG	<i>EcoRI</i>
1071	HDGF4sense	GCTTGAGGCCAGCCTGTAGTCAG	
1181	BNP500	AGCCTACCCTCTGGTAGATTG	
1272	T3-Primer	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	
1273	T7-Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	
1290	GFP-SalI-AS	CCGTCGACTTACTTGTACAGCTCGTC	<i>SalI</i>
1334	HDGF5sense	CATTATGAGTGTCTAGGAGAGATG	
1335	HDGF5AS	CCACCTATACATTTGTATAGAGCC	
1349	HDGF1.5sense	TACTGCAGAATTCCTCCTGG	<i>EcoRI</i>
1350	HDGF1.5as	AGCGCTGGATCCATCAATCTGGGACAAGAAAGG	<i>BamHI</i>
1353	HDGF5internS	GTCGATATCGATTCCAGGACTTTTGAGCTG	<i>Clal</i>
1354	HDGF5internAS	TCAGCTACTCGAGCCTGACAGCAGGGCT	<i>XhoI</i>
1389	HDGF5asD	CAGGCCCCCACTCCATCTTT	
1393	HDGFScreening	GAGTACTGGCTGGTCTTGC	
1470	eGFP-Nas	GCTTGCCGTAGGTGGCATCGC	
1547	HDGF KI Intron1 Sense	GCTCCGCTCGAGAATTCAAATGTATAGGTGGTGGCCC	<i>XhoI</i>
1548	HDGK KI UTR AS	TTGCAGCTGTGACTGGATGATGTGGGCTTTG	<i>PvuII</i>
1559	HDGF SpliceSense	GCGGCGGTACCATGTGCGGATCCAACCGG	<i>KpnI</i>
1669	RPL19Forward	ATGTATCACAGCCTGTACCTG	
1670	RPL19Reverse	TTCTTGGTCTCTTCCTCCTTG	
1674	HDGF IntronI AS2	CATCTTAAGTCTGAGCTGGAGGC	<i>AflIII</i>
1814	HDGF wt sense	GGTTGACAGGTCAGAAATGGTT	
1815	HDGF wt AS	CTTGGTATTTGTTGGCTGTTGA	
1816	HDGF tg AS	GTCGTCCTTGAAGAAGATGGTG	
1817	HDGF dsRed Screen1	ATCACCAACCACAACGAGGAC	
1818	HDGF dsRed Screen2	AGACCGTGTACAAGGCCAAGA	
1859	HDGF-RT AS	CCAGTAGCACCCAGACAGC	
2476	Eef2Sense	ATCCTCACCGACATCACCAAG	
2477	Eef2AS	CTGCTCTGGACACTGGATCTC	
2534	LEDGFqPCRSense	AGCCAGAAGTTAAGAAAGTGGAGAAG	
2535	LEDGFqPCRAS	CCAGGGCCTCTATGCATCTG	

Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Referenz
Kanninchen-anti-Maus HDGF nonHATH Region, polyklonal	1:150 ICC 1:1000 WB	Abouzied <i>et al.</i> ²⁹
Maus-anti-GFP, monoklonal	1:1000 WB	Roche
Maus-anti-GAPDH	1:1000 WB	Stressgen
Maus-anti-β-Aktin	1:1000 WB	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG HRP-konjugiert	1:10000 WB	Dianova
Ziege-anti-Kanninchen-IgG HRP-konjugiert	1:10000 WB	Dianova
Ziege-anti-Kanninchen-IgG Cy3-konjugiert	1:400 ICC	Dianova
Ziege-anti-Kanninchen-IgG Alexa488-konjugiert	1:400 ICC	Molecular Probes
Ziege-anti-Maus-IgG Alexa680-konjugiert	1:10000 LiCor	Molecular Probes
Ratte-anti-Maus-CD3 PerCP-konjugiert	1:1000 FACS	BD Pharmingen
Ratte-anti-Maus-CD4 PE-konjugiert	1:1000 FACS	BD Pharmingen
Ratte-anti-Maus-CD8 Cy5-konjugiert	1:1000 FACS	BD Pharmingen

Bakterien

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>E.coli</i> XL1-blue MRF	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, Δ(mcr)A183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, supE44, relA1, lac[F'proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Bullock <i>et al.</i> ¹³⁷

Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
HeLa	Humane aneuploide, epitheloide Cervixkarzinomlinie	Gey <i>et al.</i> ¹³⁸
HM1	Embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv129P2/OlaHsd	Magin <i>et al.</i> ¹⁰⁸

Versuchstiere

Bezeichnung	Eigenschaften	Quelle
C57BL/6	Wildtyp-Mausstamm mit schwarzer Fellfarbe für Rückkreuzungen	Charles River

Software

Die Analyse von Nukleinsäuresäuresequenzen wurde mit den Programmen BioEdit,¹³⁹ pDRAW32,¹⁴⁰ clustalw¹⁴¹ und CloneManager 5¹⁴² durchgeführt. Für die Untersuchung der genomischen Sequenzen der Maus wurden die Datenbanken EntrezGene¹⁴³ und Ensembl Genome Browser¹⁴⁴ verwendet. Primer wurden mit Primer3¹⁴⁵ entworfen. Die Nachbearbeitung von Bildern erfolgte mit Axiovision LE 4.6 (Zeiss), Corel Draw 12 (Corel) und ImageJ (NIH). Alle Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) beziehungsweise Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten Student t-Tests durchgeführt. Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3. Methoden

Die in dieser Arbeit angewandten grundlegenden molekularbiologischen Standardmethoden wie Nukleinsäurefällungen, Agarosegelelektrophorese, Restriktionsspaltungen oder Konzentrationsbestimmungen von DNA wurden, sofern nicht anders angegeben, entsprechend den gängigen Protokollen durchgeführt.¹⁴⁶

3.1. Nukleinsäure-Präparationen

3.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Die im Folgenden beschriebenen Präparationen von Plasmid-DNA basieren auf einer modifizierten alkalischen Zellyse.¹⁴⁷ Dabei wird das unterschiedliche Denaturierungsverhalten von Nukleinsäuren genutzt um Plasmid-DNA von chromosomaler DNA zu trennen.

3.1.1.1. Analytische Plasmid Mini-Isolierung

Für die Isolierung geringer Mengen an Plasmid-DNA (2-5 µg) aus Bakterien mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit wurden 5 mL LB-Medium mit einem gegebenenfalls zugegebenen Antibiotikum mit einer einzelnen Bakterienkolonie inokuliert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 225 rpm in einem Thermoschüttler. Ca. 1 mL der über Nacht-Kultur wurden in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß sedimentiert (5 min, 5000 rpm, 20 °C). Nach Entfernung des Überstandes wurde das Bakterien-Pellet in 250 µL Puffer P1 resuspendiert. Für die Bakterienlyse wurde die Suspension mit 250 µL Puffer P2 versetzt und leicht gemischt. Nach maximal 5 min wurde die Lyse durch Zugabe von 350 µL Puffer N3 und leichtem Schwenken gestoppt. Da die chromosomale DNA an der Zellmembran haften bleibt, konnte sie mit dieser und den denaturierten Proteinen abzentrifugiert werden (10 min, 15000 rpm, 20 °C). Die Plasmid-DNA verbleibt im Überstand, der auf eine QIA-Spin-Säule transferiert und für 1 min bei 15000 rpm zentrifugiert wurde. Nach einem Waschschrift mit 750 µL Puffer PE und zweimaliger Zentrifugation (1 min, 15000 rpm, 20 °C) konnte die Plasmid-DNA mit 50 µL EB-Puffer oder TE-Puffer nach

kurzer Inkubation und anschließender Zentrifugation (1 min, 15000 rpm, 20 °C) eluiert werden. Im Anschluss an die Bestimmung der DNA-Konzentration und DNA-Reinheit wurde die Plasmid-DNA bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.1.1.2. Präparative Plasmid Midi-Isolierung

Größere Mengen an Plasmid-DNA (100-200 µg) von hohem Reinheitsgrad, die für Transfektionen geeignet ist, wurden mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit isoliert. Hierfür wurden für die Vorkultur 5 mL LB-Medium unter Zusatz eines geeigneten Antibiotikums mit einer einzelnen Bakterienkolonie inokuliert und circa 8 h in einem Thermoschüttler inkubiert (37 °C, 225 rpm). 50 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden dann mit 500-1000 µL der Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (15 min, 2000 rpm, 20 °C) und das Bakterienpellet in 4 mL Puffer P1 resuspendiert. Für die Bakterienlyse wurde die Suspension mit 4 mL Puffer P2 versetzt, leicht geschwenkt und für 5 min bei 20 °C inkubiert. Durch Zugabe von 4 mL eiskaltem Puffer P3 wurden die Ansätze neutralisiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Membranfragmente und denaturierte Proteine wurden durch Zentrifugation sedimentiert (30 min, 15000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde anschließend auf eine mit Puffer QBT äquilibrierte Qiagen Tip 100 Säule gegeben und danach mit 2 × 10 mL Puffer QC gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 5 mL Puffer QF. Durch Zugabe von 3,5 mL Isopropanol wurde die Plasmid-DNA gefällt und pelletiert (30 min, 15000 rpm, 4 °C). Das Plasmid-DNA-Pellet wurde mit 2 mL Ethanol 70% gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 15000 rpm, 4 °C). Das Plasmid-DNA-Pellet wurde für circa 5 min an der Luft getrocknet und in 100 µL EB- oder TE-Puffer gelöst. Im Anschluss an die Bestimmung der DNA-Konzentration und DNA-Reinheit wurde die Plasmid-DNA bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.1.1.3. Präparative Endotoxin-freie Plasmid Maxi-Isolierung

Die Isolierung der zur Elektroporation embryonaler Stammzellen benötigten Plasmid-DNA erfolgte mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen, mit dem bis zu 500 µg DNA mit höchstem Reinheitsgrad ohne Verunreinigungen durch bakterielle Toxine gewonnen werden können. Die Präparation erfolgte unter Verwendung von Einmal-Plastikpipetten. Für die Vorkultur wurden 5 mL LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums mit einer einzelnen Bakterienkolonie inokuliert und circa 8 h in einem Thermoschüttler inkubiert (37 °C, 225 rpm). 100 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden dann mit 500-1000 µL der Vorkultur angeimpft und über

Nacht bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert (37 °C, 225 rpm). Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (15 min, 2000 rpm, 20 °C) und das Bakterienpellet in 10 mL Puffer P1 resuspendiert. Für die Bakterienlyse wurde die Suspension mit 10 mL Puffer P2 versetzt, leicht geschwenkt und für 5 min bei 20 °C inkubiert. Durch Zugabe von 10 mL eiskaltem Puffer P3 wurden die Ansätze neutralisiert. Das gesamte Lysat wurde direkt in den Spritzenkörper der QIAfilter Filtrationseinheit überführt und für 10 min bei 20 °C inkubiert. Nach Entfernen der Verschlusskappe vom Auslass-Stutzen des QIAfilters wurde der Spritzenkolben vorsichtig in die QIAfilter Maxi-Filtrationseinheit eingesetzt und das Zell-Lysat in ein 50 mL Plastikröhrchen filtriert. 2,5 mL Puffer ER wurden zum filtrierten Lysat pipettiert, durch circa zehnmaliges Umschwenken gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Äquilibration einer QIAGEN-tip 500 Säule mit 10 mL Puffer QBT. Nachdem das filtrierte Lysat vollständig über die QIAGEN-tip Säule gelaufen war wurde zweimal mit 30 mL Puffer QC gewaschen bevor die DNA mit 15 mL Puffer QN eluiert werden konnte. Durch Zugabe von 10,5 mL Isopropanol zum Eluat wurde die DNA präzipitiert und sofort zentrifugiert (30 min, 15000 rpm, 4 °C). Das Plasmid-DNA-Pellet wurde mit 5 mL endotoxinfreiem Ethanol 70% gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 15000 rpm, 4 °C). Das Plasmid-DNA-Pellet wurde für circa 5 min an der Luft getrocknet und in 100 µL EB-Puffer oder TE-Puffer gelöst. Im Anschluss an die Bestimmung der DNA-Konzentration und DNA-Reinheit wurde die Plasmid-DNA bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.1.2. Präparation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen

Für die initiale PCR-Analyse auf homologe Rekombination des Targeting-Vektors in embryonalen Stammzellen wurden die Zellsuspensionen der Kavitäten einer mit HM1-Zell-Klonen konfluent bewachsenen 48-Well-Kulturschale nach dem Trypsinieren in 200 µL PCR-Reaktionsgefäße überführt und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 10000 rpm, 20 °C). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit 50 µL ES-PCR-Lyse-Puffer durch vortexen resuspendiert und für 60 min bei 65 °C in einem Schüttelwasserbad lysiert. Das Lysat wurde anschließend nach kurzem Mischen für die Hot-Start-PCR eingesetzt. Für eine Southern-Blot Analyse wurde eine konfluent bewachsene T25-Zellkulturflasche eingesetzt. Nach einem Waschschrift mit ES-Trypsin wurden die ES-Zellen mit 1 mL ES-Trypsin abgelöst und in ein 15 mL Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (5 min, 5000 rpm, 20 °C) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 5 mL PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 500 µL PBS resuspendiert und 5 mL ES-Lysis-Puffer zugegeben. Die nachfolgende Lyse erfolgte über Nacht bei 55 °C im Wasserbad. Die Abtrennung der DNA-haltigen Lösung erfolgte durch Zugabe des gleichen Volumenteils an Roti-Phenol/Chloroform und

Überführen der oberen Phase in ein neues 15 mL Zentrifugationsröhrchen. Zur weiteren Reinigung wurde der gleiche Volumenanteil an Chloroform zugegeben und geschüttelt. Nach der Zentrifugation (1 min, 14000 rpm, 20 °C) wurde die obere Phase in ein weiteres 15 mL Zentrifugationsröhrchen überführt und die genomische DNA mit 1/10 Volumenteil an 3 M Natriumacetat und dem 2,5 fachen Volumen an absolutem Ethanol ausgefällt. Die DNA-Flocke wurde mit einer Kanüle aufgenommen, kurz in Ethanol 70% gewaschen und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß für circa 15 min bei 20 °C getrocknet bevor sie in 100 bis 400 µL TE-Puffer aufgenommen wurde. Zum vollständigen Lösen wurde der Ansatz 1 h bei 55 °C im Heizblock inkubiert. Da bei der DNA-Präparation aus embryonalen Stammzellen auch größere Anteile an RNA präzipitiert werden, folgte ein weiterer Inkubationsschritt nach Zugabe von 100 µg/mL RNase für 1 h bei 37 °C. Im Anschluss an die Bestimmung der DNA-Konzentration und DNA-Reinheit wurde die genomische DNA bis zum weiteren Gebrauch bei 4 °C gelagert.

3.1.3. Präparation genomischer DNA aus Schwanzspitzen von Mäusen

Zur Bestimmung des Genotyps von Mäusen mit Hilfe der PCR wurde eine 0,5 cm lange Schwanzbiopsie von 3-4 Wochen alten Mäusen entnommen und in 750 µL Laird-Puffer¹⁴⁸ mit 300 µg/mL Proteinase K bei 56 °C im Wasserbad über Nacht lysiert. Anschließend wurden 250 µL 6 M NaCl-Lösung zugegeben, der Ansatz kurz durch Umschwenken des Reaktionsgefäßes gemischt und 5 min bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Das Proteinpräzipitat und nicht lysierte Bestandteile konnten durch Zentrifugation (10 min, 15000 rpm, 20 °C) pelletiert werden. Zur Fällung der genomischen DNA wurden 700 µL des Überstandes mit 600 µL Isopropanol versetzt und der Ansatz durch Drehen durchgemischt. Die DNA-Flocke wurde anschließend mit einer Kanüle aufgenommen, kurz in Ethanol 70% gewaschen und in 200 µL ddH₂O oder TE-Puffer überführt. Zum vollständigen Lösen der DNA wurde der Ansatz 1 h bei 55 °C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss an die Bestimmung der DNA-Konzentration und DNA-Reinheit wurde die genomische DNA bis zum weiteren Gebrauch bei 4 °C gelagert.

3.1.4. Präparation genomischer DNA aus Gewebe

Eine Gewebebiopsie, vornehmlich von Niere oder Lunge, wurde in 1 mL Laird-Puffer¹⁴⁸ mit 300 µg/mL Proteinase K bei 56 °C über Nacht im Wasserbad lysiert. Die Abtrennung der DNA-haltigen Lösung erfolgte durch Zugabe des gleichen Volumenteils an Roti-Phenol/Chloroform und Überführen der oberen Phase in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß. Zur weiteren Reinigung wurde der gleiche Volumenanteil an Chloroform zugegeben

und geschüttelt. Nach der Zentrifugation (1 min, 14000 rpm, 20 °C) wurde die obere Phase erneut in ein neues 15 mL Zentrifugationsröhrchen überführt und die genomische DNA mit 1/10 Volumenteil an 3 M Natriumacetat und dem 2,5 fachen Volumen an absolutem Ethanol ausgefällt. Die DNA-Flocke wurde mit einer Kanüle aufgenommen, kurz in Ethanol 70% gewaschen und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß für circa 15 min bei 20 °C getrocknet, bevor sie in 100 bis 400 µL TE-Puffer aufgenommen wurde. Zum vollständigen Lösen wurde der Ansatz 1 h bei 55 °C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss an die Bestimmung der DNA-Konzentration und DNA-Reinheit wurde die genomische DNA bis zum weiteren Gebrauch bei 4 °C gelagert.

3.1.5. Präparation von RNA aus Gewebe mit TRIzol-Reagenz

Die Verwendung von TRIzol-Reagenz erlaubt eine schnelle Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen. TRIzol ist eine homogene Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, die die RNA während der Homogenisierung und Zelllyse schützt.¹⁴⁹ Nach zervikaler Dislokation wurden die Organgewebe der Maus präpariert und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Zu dem gefrorenen Gewebe wurden 2,5 mL TRIzol-Reagenz gegeben und mit einem *Duall*-Homogenisator zerkleinert. Anschließend wurde das Homogenat zur vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe für 5 min bei 20 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 mL Chloroform/mL TRIzol-Reagenz wurde kurz intensiv geschüttelt und anschließend zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, 4 °C). Die farblose, obere Phase wurde in ein neues 15 mL Zentrifugationsröhrchen überführt und 0,5 mL Isopropanol/mL TRIzol-Reagenz zugegeben. Durch Vermischen des Ansatzes, Inkubation für 10 min bei 20 °C und nachfolgender Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 20 °C) wurde die RNA sedimentiert. Das RNA-Sediment wurde durch Zugabe von 5 mL Ethanol 70% (4 °C) und kurzer Zentrifugation (2 min, 14000 rpm, 4 °C) gewaschen und konnte dann, nach kurzer Trocknung an der Luft, in 200-500 µL DEPC-H₂O aufgenommen werden. Die RNA-Lösung wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und zur vollständigen Lösung der RNA für 10 min bei 65 °C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss an die Bestimmung der RNA-Konzentration und RNA-Reinheit wurde die RNA bis zum weiteren Gebrauch bei -70 °C gelagert.

3.1.6. Präparation von RNA aus Zellen

Für die schnelle und effiziente Präparation von RNA aus Zellen wurde das Qiagen RNeasy Kit verwendet. Nach dem Ablösen der Zellen einer konfluent bewachsenen 10 cm-Zellkulturschale oder T25-Zellkulturflasche mit Trypsin wurden die Zellen zentrifugiert

(5 min, 2000 rpm, 20 °C) und das Pellet mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden im Anschluß an einen weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 2000 rpm, 20 °C) mit 600 µL Puffer BLT versetzt und durch Auf- und Abpipettieren homogen suspendiert. Das Lysat wurde anschließend durch eine 20G-Kanüle homogenisiert und 600 µL Ethanol 70% zugefügt. Der Ansatz wurde dann auf eine RNeasy-Säule pipettiert und zentrifugiert (15 sec, 10000 rpm, 20 °C). Es folgten nacheinander Waschschriffe mit 700 µL Puffer RW1 und zweimal 500 µL Puffer RPE bevor die RNA mit 50 µL DEPC-H₂O in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß zentrifugiert (1 min, 10000 rpm, 20 °C) wurde. Im Anschluss an die Bestimmung der RNA-Konzentration und RNA-Reinheit wurde die RNA bis zum weiteren Gebrauch bei -70 °C gelagert.

3.1.7. Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

3.1.7.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren beruht auf dem UV-Absorptionsvermögen von Nukleinsäuren. Das Absorptionsmaximum der heterozyklischen Nukleotidbasen liegt zwischen 258 und 269 nm (gemessen A_{260}) und das der aromatischen Aminosäurereste bei 258-280 nm (gemessen A_{280}). Die Extinktion bei 260 nm ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz der Konzentration an DNA oder RNA direkt proportional, wohingegen der Quotient A_{260}/A_{280} die Reinheit der DNA-Lösung charakterisiert. Bei sauberer DNA liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0 beziehungsweise bei RNA zwischen 1,9 und 2,2. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen durch Proteine oder Phenole hin. Die Absorptionen der Nukleinsäurelösungen wurden nach 1:60 oder 1:100 Verdünnung mit ddH₂O bei 260 nm und 280 nm gegen ddH₂O in einer Quarzküvette gemessen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz $A = \epsilon \times c \times l$, mit $A \hat{=}$ Absorption, $\epsilon \hat{=}$ molarer Absorptionskoeffizient, $c \hat{=}$ molare Konzentration der Probe und $l \hat{=}$ Schichtdicke der Küvette in cm, gilt bei $A_{260} = 1$: dsDNA $\hat{=}$ 50 µg/mL, ssDNA $\hat{=}$ 40 µg/mL, Oligonukleotide $\hat{=}$ 31 µg/mL und RNA $\hat{=}$ 40 µg/mL.

3.1.7.2. Konzentrationsabschätzung im Agarosegel

Die Abschätzung von geringen DNA-Konzentrationen, sowie die Überprüfung der Qualität von Nukleinsäuren für Klonierungsexperimente, der Elektroporation in embryonale Stammzellen und der Herstellung von Sonden für Northern- und Southern-Blot-Analysen erfolgte über einen Bandenintensitätsvergleich mit den bekannten Konzentrationen des Lambda-DNA *Hind*III/*Eco*RI-Standards (Fermentas) oder für DNA-Fragmente < 1000 bp mit Hilfe der 50 bp- beziehungsweise 100 bp-Standards (Fermentas). Dazu wurde die

Intensität der Probe mit derjenigen einer Bande des Referenzstandards auf entsprechender Laufhöhe in einem Ethidiumbromid-Agarosegel visuell verglichen. Für eine genauere Abschätzung wurden verschiedene Konzentrationen sowohl von Proben, als auch vom Referenzstandard aufgetragen.

3.2. Methoden zur Herstellung rekombinanter Plasmide

3.2.1. Schneiden von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA kann mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Die hergestellten DNA-Fragmente wurden für Klonierungen und als Sonden für Northern- oder Southern-Blot-Analysen benutzt. Sie dienen zusätzlich der Identifizierung gesuchter DNA-Abschnitte. Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen, meist Palindrome aus 4 bis 8 Basenpaaren, und spalten in dieser Region die Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge. Abhängig von der jeweiligen Restriktionsnuklease entstehen dabei überhängende, kohäsive DNA-Enden („sticky ends“) oder glatte Enden („blunt ends“). Für die Restriktionsspaltung wurden für einen 20 μL - Ansatz 1 μg Plasmid-DNA mit 0,5 U Restriktionsenzym versetzt und im entsprechenden Puffer für 1 h bei der für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen Temperatur inkubiert. Zur Überprüfung der Restriktionsspaltung wurden 5 μL des Restriktionsansatzes mit 10 μL ddH₂O und 3 μL DNA-Ladepuffer (6 \times) versetzt und über eine Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.2.2. Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

DNA-Fragmente verschiedener Größe können nach einer Agarosegelelektrophorese aus dem Agarosegel isoliert werden. Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell unter Verwendung einer Handlampe mit langwelligem (!) UV-Licht (365 nm) aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Aufarbeitung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend den Herstellerangaben. Dabei wird die hohe Affinität von DNA zur Silikatrix der Zentrifugationssäulen unter hoher chaotroper Salzkonzentration ausgenutzt um die gewünschte DNA von Gelbestandteilen und Verunreinigungen zu trennen. Die DNA wurde mit 30-50 μL EB- oder TE-Puffer eluiert und wie in Unterabschnitt 3.1.7 beschrieben quantifiziert.

3.2.3. Aufreinigung von DNA-Reaktionsansätzen

Zur Beseitigung störender Salze, Detergenzien oder Enzyme aus DNA-Reaktionsansätzen wie Doppel-Restriktionsspaltungen, Phosphorylierungen von DNA-Fragmenten oder PCR-Ansätzen wurde das PCR-Purification Kit von Qiagen eingesetzt. Dazu wurde die zu reinigende DNA-Lösung mit 1/3 Volumen Puffer PB versetzt und auf eine Zentrifugations-säule gegeben. Nach Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, 20 °C) folgte ein Waschschrift mit 750 µL Puffer PE und eine erneute Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, 20 °C). Die DNA konnte danach durch Zugabe von 30-50 µL EB- oder TE-Puffer eluiert werden.

3.2.4. Auffüllen kohäsiver DNA-Enden

Für die Ligation über glatte Enden ist es mitunter nötig, durch Restriktionsendonukleasen erzeugte kohäsive DNA-Enden zu glätten („blunten“). Mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I aus *E. coli* erfolgt die komplementäre Auffüllung mit dNTP-Molekülen in 5'→3'-Richtung. Dazu wurde der Reaktionsansatz (20 µL) mit 0,5 µL Klenow-Fragment (10 U/µL) sowie 1 µL dNTP-Mix (2 mM) versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde im Anschluß durch Inkubation bei 70 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Sind im Reaktionsansatz keine dNTP-Moleküle vorhanden, tritt die 3'→5'-Exonukleaseaktivität des Klenow-Fragments in den Vordergrund. Alternativ kann so ein 3'-Überhang durch initiale Inkubation für 5 min ohne dNTP-Moleküle und anschließende Zugabe des dNTP-Mix und Inkubation wie oben angegeben das 3'-DNA-Ende ebenfalls geglättet werden.

3.2.5. Dephosphorylierung von Vektorenden

Die aus einer Restriktionsspaltung oder einer Auffüllreaktion erhaltenen DNA-Moleküle tragen an ihren 5'-Enden Phosphatreste, die es dem Vektor ermöglichen auch ohne Integration eines DNA-Fragments (Insert) nach der Ligation vermehrungsfähige Plasmide zu erzeugen. Um eine Religation des Vektors zu verhindern wurden die freien 5'-Phosphatgruppen durch Inkubation mit einer alkalischen Phosphatase aus dem Kälbermagen (CIP) entfernt. Dazu wurde der Reaktionsansatz (20 µL) mit 2 µL (1 U/µL) CIP (Roche) versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde im Anschluß durch Inkubation bei 85 °C für 20 min hitzeinaktiviert.

3.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten

Durch Ligation mit Hilfe der T4-DNA-Ligase lässt sich geschnittene Plasmid-DNA mit einem kompatibel geschnittenen DNA-Fragment (Insert) zu einem rekombinanten Plasmid verknüpfen. Die Ligation kann sowohl zwischen kohäsiven, als auch zwischen glatten DNA-Enden erfolgen. Für den Ligationsansatz wurden circa 25 ng Vektor-DNA mit der 1 bis 3 fachen molaren Menge an Insert-DNA mit 1 Weiss-Unit bei kohäsiven Enden, beziehungsweise 5 Weiss-Units bei glatten Enden an T4-DNA-Ligase (Fermentas) in Ligationspuffer über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Masse an Insert-DNA wurde dabei wie folgt bestimmt: $m(\text{Insert}) [\text{ng}] = \text{Größe}(\text{Insert}) [\text{bp}] \times m(\text{Vektor}) [\text{ng}] / \text{Größe}(\text{Vektor}) [\text{bp}]$.

3.2.7. Transformation in Bakterien

Die Aufnahme von Plasmid-DNA durch prokaryotische Zellen wird als Transformation bezeichnet. Die aufgenommene Plasmid-DNA wird dabei nicht in das Bakterienchromosom integriert, sondern als eigenständiges Plasmid redupliziert. Um eine Selektion positiver Klone zu ermöglichen enthalten die Plasmide codierende Regionen für Antibiotikaresistenzen, zum Beispiel die codierende Region der β -Lactamase für die Ampicillin-Resistenz. Die Transformation wird mit Hilfe chemisch kompetenter Bakterien erreicht, deren Zellwand durch Schwermetallexposition durchlässig gemacht wurde, was die Aufnahme von externer Plasmid-DNA erleichtert.

Zunächst wurde für die Transformation ein Aliquot chemisch kompetenter Bakterien auf Eis angetaut und mit 10 μL eines Ligationsansatzes nach 3.2.6 beziehungsweise mit 10 ng reinem Vektor für eine Re-Transformation versetzt und vorsichtig durch Rühren mit der Pipettenspitze vermischt. Der Ansatz wurde anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C und ein erneuter Inkubationsschritt für 2 min auf Eis. Transformations-Ansätze mit Plasmiden, die unter anderem eine Ampicillin-Resistenz vermitteln, wurden direkt auf entsprechend antibiotikahaltige LB-Agarplatten mit einer 100 μL Pipettenspitze ausgestrichen. Ansätze mit Plasmiden, die für andere Resistenzgene codieren, wurden mit 900 μL LB-Medium (vorgewärmt auf 37 °C) in einem Thermoschüttler inkubiert (1 h, 225 rpm, 37 °C). 100-500 μL der Bakteriensuspension wurden anschließend auf entsprechend antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.8. PCR-Kolonie-Screening

Eine schnelle und elegante Methode zur Identifizierung positiver Bakterienklone, die das gewünschte DNA-Insert enthalten, stellt das PCR-Kolonie-Screening dar. Dazu wurden mit einer Pipettenspitze Bakterienklone gepickt und in jeweils 10 μL PCR-Ansätzen (entsprechend Tab. 3.1) zweimal auf- und abpipettiert. Die Pipettenspitzen wurden danach in 2 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum gegeben und bei 4 °C zwischengelagert. Die PCR-Ansätze wurden anschließend mit 10 μL RedTaq-ReadyMix versetzt und in das PCR-Gerät transferiert. Das Ergebnis der PCR wurde zunächst mit einem Agarosegel überprüft und anschließend die LB-Medien-Ansätze der positiv identifizierten Klone für eine Plasmid Mini-Präparation (3.1.1) in einem Thermoschüttler inkubiert (über Nacht, 225 rpm, 37 °C).

Tab. 3.1.: PCR-Kolonie-Screening

PCR-Ansatz (20 μL)		PCR-Programm		
2 μL	Primer Sense	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
2 μL	Primer Antisense	Denaturierung	95 °C	15 sec
ad 10 μL	ddH ₂ O	Annealing	56 °C	30 sec
10 μL	RedTaq Ready-Mix	Elongation	72 °C	2 min
		Finale Extension	72 °C	10 min
		Hold	4 °C	∞

3.2.9. Blau-Weiß-Screening von Bakterienklonen

Die direkte Klonierung von PCR-Fragmenten und die Klonierung großer DNA-Fragmente in einen glatt geschnittenen Vektor resultiert zumeist in einer niedrigen Ligationsrate und somit einer hohen Anzahl „falsch-positiver“ Klone durch Re-Ligation des Vektors. Erleichtert werden kann hierbei die Selektion positiver Klone mit Hilfe des Blau-Weiß-Screenings von Bakterienklonen bei Verwendung des pBluescript II SK(-)-Vektors, der für das Gen β -Galaktosidase kodiert. Enthält das Plasmid das gewünschte Insert, ist die kodierende Sequenz der β -Galaktosidase unterbrochen. Positive Klone exprimieren daher keine funktionale β -Galaktosidase und sind nicht in der Lage, X-Gal in 5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindol und Galaktose zu spalten. Aus 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindol entsteht nach Oxidation das blau gefärbte 5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-indigo. Somit sind positive Klone weiß und negative Klone blau gefärbt. Auf die antibiotikahaltigen LB-Agarplatten wurden 200 μL Blau-Weiß-Screening-Lösung ausgestrichen und für 30 min bei 20 °C getrocknet. Danach wurden die Baktieriensuspensionen wie unter 3.2.7 angegeben ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.10. Sequenzierung von DNA-Abschnitten

Die zyklische Sequenzierung (Cycle-Sequencing) von DNA-Abschnitten beruht auf der Kettenabbruchmethode,¹⁵⁰ wonach der Einbau von fluorophor-markierten ddNTP-Molekülen während eines PCR-Zyklus zum Kettenabbruch führt. Die elektrophoretische Trennung der entstandenen PCR-Fragmente und die Detektion der terminalen fluorophor-markierten Didesoxynukleotide erlaubt die Identifizierung der Basenfolge des analysierten DNA-Abschnittes. Die Sequenzierung wurde entsprechend Tab. 3.2 angesetzt und durchgeführt.

Tab. 3.2.: Sequenzierung von DNA-Abschnitten

PCR-Ansatz (10 μ L)		PCR-Programm		
200-500 ng	Plasmid-DNA	Initiale Denaturierung	96 °C	10 sec
1 μ L	Primer (5 pmol)	Denaturierung	96 °C	10 sec
1 μ L	Big Dye Sequencing Puffer (5 \times)	Annealing	50 °C	5 sec
2 μ L	Terminator Ready Reaction Mix	Elongation	60 °C	4 min
ad 10 μ L	ddH ₂ O	Hold	4 °C	∞

Im Anschluß an die PCR wurde die DNA durch Zugabe von 45 μ L HPLC-H₂O, 5 μ L 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 125 μ L Ethanol 95% und Inkubation für 10 min bei 20 °C gefällt. Der Ansatz wurde danach zentrifugiert (10 min, 16000 rpm, 20 °C) und der Überstand abgenommen. Das DNA-Pellet wurde mit 250 μ L Ethanol 70% gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 16000 rpm, 20 °C). Nachdem der komplette Überstand abgenommen worden war, konnte das DNA-Pellet nach einer kurzen Trocknung in 25 μ L HiDi-Formamid durch Vortexen aufgenommen werden. Die gelöste DNA wurde für 2 min bei 80 °C denaturiert und bis zur Sequenzierung bei 4 °C gelagert. Die Auswertung der ermittelten Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Multiple-Alignment-Editors BioEdit¹³⁹ beziehungsweise clustalw.¹⁴¹

3.3. Transfer und Hybridisierung von Nukleinsäuren

3.3.1. Southern-Blot

Die Übertragung von geschnittener DNA nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese mit Hilfe eines Kapillarsoges vom Gel auf eine Membran wird als Southern-Blot bezeichnet.¹⁵¹ Dazu wurden 20 µg vollständig geschnittene genomische DNA mit einem 0,7%igen Agarosegel bei 60 V innerhalb von 6 h aufgetrennt. Das Gel wurde im Anschluß auf einem UV-Transluminator mit einem Fluoreszenzlineal fotografiert und zur Depurierung für 10 min mit 0,2 M HCl auf einer Wippe inkubiert. Danach wurde das Gel kurz mit ddH₂O gespült und zweimal 20 min mit Denaturierungslösung denaturiert. Nach der Inkubation mit Neutralisierungslösung für zweimal 20 min und mit SSC (20 ×) für 10 min wurde der Kapillarblot aufgebaut. Dazu wurde eine der Gelgröße entsprechende Glasplatte quer auf eine Glasschale gelegt. Als Brücke wurden zwei mit SSC (20 ×) angefeuchtete 3MM-Papiere auf die Glasplatte gelegt, deren Enden in die Transferlösung SSC (20 ×) eintauchten. Darauf wurden nacheinander luftblasenfrei das Gel mit den Taschenöffnungen nach unten, eine in ddH₂O angefeuchtete Nylonmembran und nochmals zwei in SSC (20 ×) getränkte 3MM-Papiere gelegt. Um Kurzschlüsse zu vermeiden, wurden freie Stellen der Glasplatte und der Brücke mit exponierten Röntgenfilmen abgedeckt. Um den Kapillarsog herzustellen wurde ein circa 10 cm hoher Stapel Papiertücher auf den Blot gestellt und mit einem Gewicht (0,5 kg) beschwert. Nach dem Transfer über Nacht wurde der Blot abgebaut und die Position der Geltaschen mit Bleistift auf der Membran markiert. Die Nylonmembran wurde zur Entfernung von Gelresten kurz in SSC (2 ×) gewaschen, 1 h bei 20 °C getrocknet und zur Immobilisierung der DNA für 1 h bei 80 °C im Trockenschrank erhitzt.

3.3.2. Northern-Blot

20 µg RNA wurden mit RNA-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 65 °C denaturiert. Daraufhin wurde die RNA zügig auf Eis abgekühlt und im Anschluß in einem Agarosegel (1,2 M Formaldehyd enthaltend) aufgetrennt.¹⁵² Das Gel wurde auf einem UV-Transluminator mit einem Fluoreszenzlineal unter besonderer Berücksichtigung der Position der 18 S und der 28 S Bande dokumentiert. Nach einer kurzen Äquilibration in SSC (20 ×) wurde das Gel mit einem Kapillarblot über Nacht auf eine Hybond-N⁺-Membran geblottet. Nach Abbau des Blots wurde die Nylonmembran zur Entfernung von Gelresten kurz in SSC (2 ×) gewaschen, 1 h bei 20 °C getrocknet und zur Immobilisierung der DNA für 1 h bei 80 °C im Trockenschrank erhitzt.

3.3.3. Herstellung von radioaktiv markierten Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte mit dem Megaprime DNA Labeling System. Das Verfahren basiert auf der Hybridisierung zufälliger, hexamerer Primer mit einer DNA-Sonde und der anschließenden Matrizenverlängerung mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase in Anwesenheit von [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP. Die Sonde wurde durch Restriktionsspaltung aus der entsprechenden Plasmid-DNA ausgeschnitten, über ein Agarosegel gereinigt und die Konzentration des Eluats bestimmt. 25 ng der Sonde wurden mit ddH₂O auf 28 μL aufgefüllt und mit 5 μL hexameren Primern versetzt. Nach Denaturierung (5 min, 95 °C) wurde zur Anlagerung der Primer 10 min auf 20 °C abgekühlt. Danach wurden 10 μL Labeling-Puffer zugegeben, der nicht radioaktives dATP, dGTP und dTTP enthielt. Im Isotopie-Arbeitsbereich folgte die Zugabe von 5 μL [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (10 μCi) und 2 μL Klenow-Fragment (1 U/ μL). Der Ansatz wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert. 2 μL des Ansatzes wurden zu diesem Zeitpunkt für die spätere Messung der β -Aktivität abgenommen. Zur Abtrennung freier, radioaktiver Nukleotide und kurzer Oligonukleotide wurde eine ProbeQuantTM G-50 Micro Säule verwendet. Zunächst wurde die Säule durch Zentrifugation (1 min, 2000 rpm, 20 °C) von überschüssiger Flüssigkeit befreit. Im Anschluß wurde der Reaktionsansatz auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (1 min, 2000 rpm, 20 °C). Vom Eluat wurden 2 μL abgenommen und zusammen mit der ersten Probe an einem Szintillationszähler vermessen. Aus den β -Aktivitäten vor und nach Säulenaufreinigung wurde die [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP-Einbaurate in die Sonde und die absolut einzusetzende Menge an markierter Sonde bestimmt.

3.3.4. Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren

Die Hybridisierung der immobilisierten DNA beziehungsweise RNA erfolgte mit RapidHyb- oder FBI- Puffer, die eine schnelle und sensitive Hybridisierung erlauben. Zur Prähybridisierung wurde die mit ddH₂O angefeuchtete Membran luftblasenfrei mit der Nukleinsäureseite nach innen zeigend in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen mit 0,125 mL/cm² Puffer für 30 min bei 65 °C inkubiert. Währenddessen wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde durch fünfminütiges Aufkochen im Wasserbad denaturiert. Unter leichtem Schwenken wurden 1×10^6 cpm/mL der DNA-Sonde in der Prähybridisierungslösung verteilt und die Membran 60 min im Hybridisierungsofen bei 65 °C hybridisiert. Unspezifisch gebundene Sonde wurde durch mehrmaliges Waschen der inkubierten Membran entfernt. Dazu wurde die Membran jeweils zweimal 10 min bei 65 °C mit $2 \times \text{SSC}/0,1\%$ SDS und unter denselben Bedingungen mit $0,2 \times \text{SSC}/0,1\%$ SDS in einem Schüttelwasserbad gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die verbleibende Radioaktivität auf der Membran mit einem Handmonitor ermittelt.

Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran luftblasenfrei in Folie eingeschweißt und in eine Röntgenfilmkassette mit einem gelöschten BioImager Screen (Fuji) eingelegt. Nach einer Expositionszeit von 1-7 Tagen wurde der Screen an einem Phosphorimager ausgewertet. Alternativ wurde die Membran autoradiographisch mit einer Verstärkerfolie auf einem Röntgenfilm exponiert und in einer Entwicklermaschine entwickelt.

3.4. Zellkultur

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt in Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen. Sämtliche Arbeiten mit den Säugerzellen fanden unter sterilen Bedingungen statt. Sämtliche Puffer, Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

3.4.1. Zellkultur embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)

Die im Folgenden dargestellten Methoden zur Kultur embryonaler Stammzellen basieren auf den etablierten Protokollen der Arbeitsgruppe Willecke, Institut für Genetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.^{153,154} Die murinen, embryonalen HM1 Stammzellen (HM1 ES-Zellen) stammten aus agoutifarbenen, männlichen Blastozysten des Mausstammes Sv129P2/OlaHsd.¹⁰⁸ Diese ES-Zellen sind in der Lage, auf gelatinisierten Zellkulturschalen in Gegenwart von löslichem *leukemia inhibiting factor* (LIF) auch in Abwesenheit von Fibroblasten („Feeder“-Zellen) zu wachsen. Es zeigte sich jedoch, dass durch die Verwendung von Feeder-Zellen zum einen die Zellmorphologie deutlich verbessert werden konnte und zum anderen der Ausdifferenzierungsgrad der ES-Zellen minimiert wurde. Für die Zellkultur der embryonalen Stammzellen wurden ausschließlich Einmal-Plastikpipetten (BD Falcon beziehungsweise Sarstedt) und Zellkulturflaschen und -platten der Firma BD Falcon verwendet.

3.4.1.1. Präparation von murinen, embryonalen Fibroblasten (MEF)

Embryonen aus schwangeren C57BL/6-Mäusen wurden am Tag 13,5 dpc präpariert und mit PBS gewaschen. Nach Entfernen des Kopfes, der Extremitäten und der inneren Organe wurde das verbleibende Gewebe erneut mit PBS gewaschen und mit einem Skalpell zerkleinert. Die so erhaltenen Gewebestücke wurden in 10 mL Trypsin-Lösung resuspendiert und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wurde alle 5 min durch Schwenken gut durchmischt, wobei durch Zusatz von DNase-Lösung die Viskosität

entscheidend verringert werden konnte. Die Zellsuspension wurde im Anschluß circa 3-5 mal mit einer 10 mL Pipette auf- und abpipettiert und zur Inaktivierung des Trypsins in 35 mL DMEM-Medium mit 10% FCS überführt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 700 rpm wurde das Pellet in DMEM-Medium mit 10% FCS resuspendiert und die vereinzelt Zellen in einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale ausplattiert. Nach circa drei Tagen wurde Medium von den noch subkonfluent bewachsenen Schalen abgenommen und auf Mycoplasmen untersucht. Bei negativem Ergebnis wurden die Zellen bei Erreichen der Konfluenz eingefroren. Dazu wurden die abgelösten Zellen abzentrifugiert, in 1 mL ES-Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden dann in einen mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (Nalgene) gestellt und über Nacht bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Anschließend wurden die Röhrchen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.4.1.2. Herstellung von „Feeder-Zellen“

Murine, embryonale Fibroblasten (MEF) dienen als sogenannter „feeder layer“ für die ES-Zellen. Für die Kokultur von ES-Zellen mit Fibroblasten wurden letztere mitotisch inaktiviert um ein Überwuchern der ES-Zellen durch Fibroblasten zu vermeiden. Die unter Kap. 3.4.1.1 präparierten und eingefrorenen MEF-Zellen wurden wie folgt expandiert. Nach dem Auftauen wurden die murinen, embryonalen Mausfibroblasten zunächst für 4 Tage auf drei 10 cm-Kulturschalen kultiviert, dann 1:10 geteilt und weitere 3 Tage kultiviert. Danach wurden alle Zellen pelletiert, in einem 50 mL Zentrifugationsröhrchen vereinigt und auf Eis bis zur γ - Bestrahlung aufbewahrt. Die Bestrahlung mit einer Energiedosis von 15 Gy führte zur mitotischen Inaktivierung der Zellen, die anschließend erneut auf 10 cm-Kulturschalen ausgesät wurden. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen nach Pelletieren in Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen eingefroren. Bei Verwendung der Fibroblasten wurden diese nach dem Auftauen in ES-Medium aufgenommen und direkt in einer der Fläche der Kulturschalen entsprechenden Dichte ausgesät:

Tab. 3.3.: Verwendung von „Feeder-Zellen“

Kulturschale	Anzahl auszusäender „Feeder-Zellen“
48-Well-Zellkulturplattenkavität	75000
24-Well-Zellkulturplattenkavität	100000
6-Well-Zellkulturplattenkavität	500000
T25-Kulturflasche	1300000
T75 Kulturflasche	3800000
10 cm-Schale	3000000

3.4.1.3. Einfrieren von HM1 ES-Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen T25-Zellkulturflasche nach dem Trypsinieren in 10 mL ES-WT-Medium aufgenommen und in ein 15 mL Zentrifugationsröhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde pelletiert (5 min, 800 rpm, 20 °C), und anschließend in 1,5 mL ES-WT-Medium resuspendiert. Je 0,5 mL dieser Suspension wurden in drei beschriftete Kryo-Röhrchen, in denen bereits 0,5 mL ES-Einfriermedium vorgelegt war, pipettiert und nach dem Verschließen kurz gemischt. Die Röhrchen wurden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (Nalgene) gestellt und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurden die Röhrchen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.4.1.4. Auftauen von HM1 ES-Zellen

Zum Auftauen wurden die Zellen durch zügiges Überführen eines Kryo-Röhrchens aus dem flüssigen Stickstoff in ein Wasserbad (37 °C) kurz angetaut und der Inhalt in ein 15 mL Zentrifugationsröhrchen überführt, in dem 9 mL ES-WT-Medium vorgelegt war. Die Zellen wurden sedimentiert (5 min, 800 rpm, 20 °C) und vorsichtig in 5 mL ES-WT-Medium resuspendiert. Anschließend wurde der Suspension eine entsprechende Menge an Feeder-Zellen zugefügt und auf eine gelatinisierte (durch Inkubation für 10 min mit 0,1%-iger Gelatine-Lösung) T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag.

3.4.1.5. Passagieren von HM1 ES-Zellen

Die Zellkultur von HM1 Zellen erfolgte in ES-WT-Medium, das üblicherweise alle 2-3 Tage bei Bedarf jedoch täglich gewechselt wurde. Bei einer Konfluenz von etwa 90 bis 100% wurden die ES-Zellen in einem Verhältnis von 1:2 oder 1:3 passagiert. Dazu wurde das überstehende ES-WT-Medium abgesaugt und die Zellen kurz mit etwa 1/10 des Kulturvolumens an ES-Trypsin (37 °C) gewaschen. Nach erneutem Absaugen der Lösung wurden etwa 1/10 des Kulturvolumens an ES-Trypsin (37 °C) zugegeben und für 1 bis 3 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden dann bei Bedarf durch moderates Klopfen gelöst und nach Zugabe von 10 mL ES-WT-Medium und mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in ein 15 mL Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 800 rpm, 20 °C) und das Zellpellet anschließend in entsprechender Menge an ES-WT-Medium oder ES-Selektionsmedium resuspendiert, dem zusätzlich eine der Fläche der Zellkulturflasche entsprechende Menge an Feeder-Zellen zugefügt wurde (siehe Tab. 3.3). Die Zellsuspension wurde in gelatinisierte (durch Inkubation für 10 min

mit 0,1%iger Gelatinelösung) T25- beziehungsweise T75-Zellkulturflaschen ausgesät und mit frischem ES-WT-Medium auf das entsprechende Kulturvolumen aufgefüllt. Bei einer Kulturgröße von 48- und 24-Well-Zellkulturplatten wurden die Zellen direkt ohne einen Zentrifugationsschritt gesplittet, ab einer Kulturgröße von 6-Well-Zellkulturplatten wurden sie nach dem Trypsinieren wie oben angegeben abzentrifugiert.

3.4.1.6. Elektroporation von HM1 ES-Zellen zur homologen Rekombination

Die stabile Transfektion von HM1 ES-Zellen erfolgte mit Hilfe der Elektroporation von linearisiertem Plasmid. Dazu wurden 350 µg des mit Hilfe des Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit aufgereinigten Targeting-Vektors eingesetzt (siehe 3.1.1.3). Dieser wurde anschließend durch eine Restriktionsspaltung linearisiert, mit $\frac{1}{10}$ Volumenteil an 3 M Natriumacetat und dem 2,5 fachen Volumen an absolutem Ethanol ausgefällt, zweimal mit 70% EtOH gewaschen und in 100 µL sterilfiltrierten TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration des linearisierten Plasmids wurde vor der Elektroporation nochmals mit Hilfe eines Agarosegels bestimmt. Für die Elektroporation wurde eine konfluent bewachsene T75-Zellkulturflasche mit HM1 ES-Zellen möglichst niedriger Passagenzahl trypsinisiert, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt (wichtig!) und zur Abtrennung der Feeder-Zellen für 30 min in eine neue gelatinisierte T75-Zellkulturflasche überführt. Die Fibroblasten adhärieren in diesem Zeitraum an die Wand der Zellkulturflasche, während die HM1 ES-Zellen im Medium suspendiert verbleiben. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50 mL Zentrifugationsröhrchen überführt und die Zellkonzentration der Einzelzellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Zentrifugation (5 min, 800 rpm, 20 °C) wurden die Zellen in ($1 \times$) HBS-Puffer aufgenommen, sodass 800 µL der Suspension 3×10^7 Zellen enthielten. 800 µL dieser Zellsuspension wurden mit 100 µL linearisiertem Targeting-Vektor vermengt und in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Biorad-Gene Pulser mit einer Spannung von 800 V und einer Kapazität von 3 µF. Nach einer Inkubation von 10 min bei 20 °C wurden für eine Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen 450 µL der Zellsuspension vorsichtig in 100 mL ES-WT-Medium, für eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen 300 µL der Zellsuspension vorsichtig in 50 mL ES-WT-Medium und für eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen die verbleibenden 150 µL der Zellsuspension vorsichtig in 50 mL ES-WT-Medium resuspendiert und anschließend jeweils 10 mL der Suspension auf gelatinisierte 10 cm-Zellkulturschalen ausplattiert.

3.4.1.7. Selektion auf stabile Integration und homologe Rekombination

Zur Selektion auf Anwesenheit des im Targeting-Vektor integrierten Selektionsmarkergens HPRT wurde 48 h nach der Elektroporation durch Wechsel des ES-WT-Mediums gegen ES-HAT-Selektionsmedium begonnen. Zunächst zweimal nach jeweils zwei Tagen, anschließend alle 3 Tage wurde das HAT-haltige Medium mit den abgestorbenen Zellen gewechselt. Resistente Klone ließen sich nach etwa 5 Tagen mikroskopisch erkennen, die allerdings erst nach etwa 10 Tagen Selektion eine Größe erreichten, die die Isolierung der einzelnen Zellklone ermöglichte. Dazu wurden die Klone jeweils mit Hilfe einer Kolbenhubpipette und 100 μ L Spitzen von der Kulturschale abgeschabt, in 150 μ L Kulturmedium aufgesaugt und in eine Kavität einer 96-Well-Platte durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die vereinzelt Zellen wurden anschließend in eine Kavität einer 48-Well-Zellkulturplatte transferiert, in der bereits 300 μ L HAT-Selektionsmedium und eine entsprechende Anzahl von Feeder-Zellen vorgelegt waren. Bis zum Erreichen einer ausreichenden Konfluenz des Zellklons wurde das Medium alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Beim ersten Trypsinsierungsschritt von einer 48- auf eine 24-Well-Zellkulturplatte wurde die Hälfte der Zellsuspension abgenommen, aus der dann die genomische DNA embryonaler Stammzellen, wie unter 3.1.2 beschrieben, isoliert und zur Genotypisierungs-PCR eingesetzt wurde. Die Expansion der in der PCR als positiv identifizierten, homolog rekombinierten Klone erfolgte schrittweise über eine 6-Well-Zellkulturplatte, eine T25-Zellkulturflasche und schließlich drei konfluent bewachsene T25-Zellkulturflaschen unter Verwendung von ES-HAT-Selektionsmedium. Für eine spätere Blastozysteninjektion wurden die Zellen einer Zellkulturflasche eingefroren. Die Zellen der anderen beiden Zellkulturflaschen wurden zur Isolierung genomischer DNA embryonaler Stammzellen mit anschließender Southern-Blot-Hybridisierung und für die Karyotypanalyse eingesetzt.

3.4.1.8. Karyotyp-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone

Für die Gewinnung von keimbahngängiger Chimären nach der Blastozysteninjektion ist es essentiell, dass die ES-Zellen ihren normalen Karyotyp von 40 akrozentrischen Chromosomen während der Kulturphase beibehalten. Alle potentiell für die Blastozysteninjektion einzusetzenden ES-Zellklone wurden aus diesem Grund einer Karyotypanalyse unterzogen. Hierfür wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen T25-Kulturflasche verwendet. Nach Entfernung des Mediums wurde zur Arretierung der Zellen in der Metaphase der Mitose 1 mL Medium mit 10 μ L Demecolcine-Lösung (Sigma) zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit ES-PBS gewaschen, trypsinisiert und in einem 15 mL Plastikröhrchen durch Zentrifugation pelletiert (15 min, 700 rpm, 20 °C). Das Pellet wurde nach Abnahme des Überstandes durch Klopfen gelöst und in 1 mL

0,56%iger KCl-Lösung durch nochmaliges Klopfen suspendiert. Während einer zehnmütigen Inkubationsphase bei 20 °C schollen die Zellen osmotisch an. Anschließend wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation pelletiert (15 min, 700 rpm, 20 °C) und das Pellet mit eiskaltem, frisch angesetztem Methanol:Eisessig (3:1) durch Klopfen resuspendiert. Die anschließende Inkubation von 5 min bei 20 °C diente einer ersten Fixierung, die nach einer erneuten Sedimentation noch zweimal mit Methanol:Eisessig (3:1) wiederholt wurde. Nach der letzten Sedimentation wurden die Zellen in 1 mL Methanol:Eisessig (3:1) aufgenommen, vorsichtig zu einer homogenen Suspension resuspendiert und mit einer Pasteurpipette aus 20-30 cm Höhe auf saubere Objektträger aufgetropft. Die Anfärbung der Chromosomen erfolgte durch eine Inkubation mit Giemsa Färbelösung (1 min) und anschließende Differenzierung der Färbung durch zweimaliges Waschen mit Wasser. Nach dem Trocknen bei 20 °C wurden überschüssige Färbereste mit ddH₂O entfernt, die Objektträger erneut getrocknet und mit DPX-Mounting Medium und Deckgläsern eingedeckelt. Je ES-Zellklon wurden mindestens 20 auswertbare Chromosomenanhäufungen ausgezählt.

3.4.2. Zellkultur primärer, dermaler Fibroblasten (PDF)

Für die Präparation primärer, dermaler Fibroblasten entsprechend dem Protokoll von Takashima¹⁵⁵ wurden neugeborene Mäuse des gewünschten Genotyps verwendet. Nach Entfernung von Kopf, Schwanz und Extremitäten wurde die Haut kurz mit 70% Ethanol gereinigt und im Anschluß auf der Rückenseite longitudinal eingeschnitten. Die Haut konnte dann nach beiden Seiten vom Torso abgezogen werden. Das Hautexplant wurde anschließend mit der Epidermis nach unten in eine 6-Well-Zellkulturplatte auf 3 mL Dispase-Lösung gelegt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur anschließenden Separation der Dermis von der Epidermis wurde das Hautstück mit der Epidermis nach unten auf den Boden einer 10 cm-Zellkulturschale gelegt und mit einer Pinzette leicht hin und her bewegt. Durch die Adhäsion an der Oberfläche trennt sich die Dermis leicht von der Epidermis. Die Dermis wurde in ein 15 mL Plastikröhrchen mit 3 mL Kollagenase-Lösung überführt und 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei wurden der Ansatz alle 10-15 min zur leichteren Dissoziation der Dermis leicht geschüttelt. Danach wurden die Dermisaggregate nach Zugabe von 5 mL Medium mit einer 10 mL-Pipette durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und über einen Cell Strainer (BD Falcon) in ein 50 mL Zentrifugationsröhrchen, in dem 20 mL Medium (37 °C) vorgelegt waren, überführt. Zur vollständigen Überführung des Ansatzes wurden nochmal 5 mL Medium in das 15 mL Plastikröhrchen gegeben, kurz auf- und abpipettiert und anschließend über den Cell Strainer in das 50 mL Plastikröhrchen überführt. Aus diesem Ansatz wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die dermalen Fibroblasten wurden

durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 800 rpm, 20 °C) und nach Resuspension in Medium in einer Zelldichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät (entspricht 2×10^6 Zellen für eine 10 cm-Zellkulturschale).

3.4.3. Zellkultur von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in unbeschichteten 10 cm-Zellkulturschalen kultiviert, wobei das Medium der Zellen alle 2-3 Tage gewechselt wurde. Aufgeteilt wurden HeLa-Zellen bei einer Konfluenz von etwa 90% in einer Verdünnung von 1:10. Dazu wurde das Medium mit Glas-Pasteurpipetten abgesaugt, die Zellen einmal mit 10 mL PBS gewaschen und anschließend etwa 1 mL Trypsin-Lösung zugegeben. Nach einer Inkubation von circa 3 min bei 37 °C lösten sich die Zellen von der Kulturschale ab. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 5 mL des entsprechenden Mediums inaktiviert. Das Ausplattieren der sich in Suspension befindlichen HeLa-Zellen erfolgte in der gewünschten Verdünnung. Die neuen Kulturschalen wurden mit frischem Medium auf das Kulturvolumen von 10 mL aufgefüllt. Die Volumina für Zellkulturschalen anderer Größe wurden entsprechend skaliert.

3.4.4. Transfektion mit ExGen 500

Für die Transfektion von HeLa-Zellen wurde ExGen 500, ein Polyethylenimin, eingesetzt. Der Transfektionsvorgang beruht darauf, daß sich der ExGen 500/DNA-Komplex auf der Zellmembran absetzt und nach erfolgter Endozytose die DNA aus dem Komplex freigesetzt wird. Diese gelangt dann über das Zytosol in den Zellkern. Für die Transfektion wurden je 5×10^4 HeLa-Zellen pro Kavität auf eine mit Deckgläschen vorbereitete 24-Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte vor der Transfektion ein Waschschritt mit PBS, um Serumreste zu entfernen, woraufhin 500 µL FCS-freies DMEM zugegeben wurden. Anschließend wurde 1 µg Plasmid DNA in 100 µL einer 150 mM NaCl-Lösung in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß verdünnt (DNA-Ansatz). Daneben wurden 16,6 µL ExGen 500 Reagenz wurden mit 43,3 µL 150 mM NaCl-Lösung gemischt und im Anschluß zum DNA-Ansatz gegeben. Der Ansatz wurde 10 sec gevortext, anschließend 10 min bei 20 °C inkubiert und dann in die entsprechenden Kavitäten pipettiert. Nach 6 h wurden die Zellen wieder mit serumhaltigem Medium kultiviert. Der immunzytochemische Nachweis wurde entsprechend 3.6.5.2 durchgeführt.

3.4.5. Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau

Um die Anzahl vitaler Zellen quantitativ zu bestimmen wurden die mit Trypsin abgelösten Zellen zentrifugiert und in einem adäquaten Volumen Zellkulturmedium aufgenommen. Davon wurde ein kleines Aliquot abgenommen und mit dem entsprechenden Volumen Trypanblau-Lösung versetzt. 20 μL dieser Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter einem Phasenkontrast-Mikroskop wurden die vitalen, ungefärbten Zellen in den vier Großquadranten ausgezählt. Die absolute Zellzahl errechnete sich nach folgender Gleichung: $\text{Zellen/mL} = \text{gezählte Zellen}/2 \times 10^4$.

3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann ein distinktes DNA-Fragment *in vitro* exponentiell und selektiv amplifiziert werden.¹⁵⁶ Das Prinzip der PCR beruht auf der Bindung von zwei circa 20 bp großen Oligonukleotiden (Primer) an bekannte, komplementäre DNA-Bereiche, die das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren. Nach Denaturierung der DNA-Matrize werden die 3'-Enden der Primer durch hitzestabile DNA-Polymerasen aus den Bakterien *Thermus aquaticus* oder *Pyrococcus furiosus* verlängert. Nach einer erneuten Denaturierung dienen die neu synthetisierten DNA-Stränge ebenfalls als Matrize, an die sich Primer anlagern können. Durch Wiederholen des Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung von Primern und DNA-Synthese, wird der durch die Primer begrenzte DNA-Abschnitt selektiv amplifiziert. Die Temperatur der einzelnen Zyklen wird mit Hilfe eines programmierbaren Thermocyclers geregelt. Das Ergebnis der PCR wird durch eine Agarosegelelektrophorese (siehe Kap. 3.5.3) eines Aliquots des PCR-Ansatzes visualisiert.

Die nachfolgend eingesetzten Primer wurden entsprechend den Herstellerangaben in einer Konzentration von 100 pmol/ μL mit ddH₂O gelöst und nach 1:20 Verdünnung direkt in den PCR-Ansätzen verwendet.

3.5.1. Expressionsuntersuchungen von mRNA-Transkripten mittels PCR

3.5.1.1. Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription

Mit Hilfe des Quantitect Reverse Transcription Kits wurde die in 3.1.5, beziehungsweise 3.1.6 isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde 1 μg RNA mit 2 μL gDNA Wipeout Puffer (7 \times) versetzt und auf ein Volumen von 14 μL mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Nach einem Inkubationsschritt (2 min, 42 °C) wurde der Reaktionsansatz direkt auf Eis

abgekühlt. Zum Reverse-Transkription Mastermix, bestehend aus 1 μL reverser Transkriptase, 4 μL Quantiscript 20 °C Puffer (5 \times) und 1 μL Primermix, wurden die 14 μL RNA-Ansatz hinzugefügt und die RNA bei 42 °C für 15 min in cDNA umgeschrieben. Die Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte bei 95 °C für 3 min.

3.5.1.2. PCR zum Nachweis der Expression von HATH₁₋₃₁-EGFP-EGFP-mRNA in ES-Zellen

Ein 896 bp langes Amplikon zeigte das Vorhandensein der HATH₁₋₃₁-EGFP-EGFP-mRNA in den untersuchten ES-Zellklonen an.

Tab. 3.3.: Nachweis von HDGF-EGFP-mRNA-Transkripten

PCR-Ansatz (50 μL)		PCR-Programm		
1 μL	cDNA	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
5 μL	Primer 1290	Denaturierung	95 °C	15 sec
5 μL	Primer 1559	Annealing	55 °C	30 sec
5 μL	dNTP-Mix (2 mM)	Elongation	72 °C	2 min
5 μL	<i>Pfu</i> -Puffer + MgSO ₄ (10 \times)	Finale Extension	72 °C	10 min
1 μL	<i>Pfu</i> -Polymerase	Hold	4 °C	∞

3.5.1.3. Quantitative Real-Time PCR

Für die quantitative Analyse der Expression von mRNA-Transkripten ist die reverse Transkription gefolgt von einer PCR Technik der Wahl. Diese sogenannte Real-Time PCR ist extrem sensitiv und erlaubt sowohl die Quantifizierung von Transkripten mit niedriger Expression, als auch solche mit geringer Expressionsveränderung.¹⁵⁷ Interkalierende Farbstoffe, wie zum Beispiel SYBR Green, das selektiv in der *minor groove* doppelsträngiger DNA bindet, erlauben mit entsprechender Hardware die Visualisierung der exponentiellen Amplifizierung eines Ziel-DNA-Abschnittes.¹⁵⁸ Die Quantifizierung ist dabei sowohl absolut, als auch relativ möglich. In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung basierend auf der relativen Expression eines Zielgens im Bezug auf ein Referenzgen verwendet. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe eines mathematischen Modells, das im Gegensatz zu der üblich angewendeten Comparative $2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$ -Methode die Effizienz der Amplifizierung berücksichtigt.¹⁵⁹ Die quantitative Real-Time PCR wurde mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit[®] durchgeführt. Dazu wurde die unter 3.5.1.1 hergestellte cDNA mit ddH₂O auf ein Volumen von 200 μL aufgefüllt und für die Bestimmung der Effizienz eine Verdünnungsreihe in den Schritten 1:10, 1:100 und 1:1000 mit ddH₂O hergestellt. 5 μL cDNA-Lösung beziehungsweise deren Verdünnungen wurden pro Ansatz in die Kavität einer 96-Well-PCR-Platte pipettiert und 20 μL Mastermix (12,5 μL QuantiTect SYBR

Green PCR Master Mix ($2 \times$) und 200-500 nM Primer mit dem entsprechenden Volumen ddH₂O ergänzt) zugefügt. Bei Bedarf wurde die Mg-Konzentration angepasst. Die PCR-Platte wurde zentrifugiert (5 min, 2000 rpm, 20 °C), die PCR-Analyse im Anschluß mit einem Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System durchgeführt (Tab. 3.4) und mit Hilfe des SDS-Softwarepaketes ausgewertet. Die Effizienz wurde aus den erhaltenen CP-Werten der Verdünnungsreihe mit Hilfe von Excel berechnet. Die Auswertung der Expression der HDGF-verwandten Proteine HRP-2, HRP-3 und LEDGF in neonatalem Gehirn erfolgte mit dem Programm REST 2008.

Tab. 3.4.: Expressionsanalyse von HDGF-verwandten Proteinen mittels quantitativer Real-Time-PCR

PCR-Ansatz (25 µL)		PCR-Programm			
5 µL	cDNA-Template	Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	} 40 ×
300 nM	Primer Sense	Denaturierung	96 °C	10 sec	
300 nM	Primer AS	Annealing	57 °C	30 sec	
12,5 µL	SYBR Green Mix ($2 \times$)	Elongation	72 °C	30 sec	
ad 25 µL	ddH ₂ O	Dissoziation	95 °C	15 sec	
			55 °C	20 sec	
			95 °C	15 sec	

3.5.2. PCR-Untersuchungen transgener ES-Zellen und Mäuse

3.5.2.1. PCR zum Nachweis der homologen Rekombination des Vektors pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in in ES-Zellen

Die PCR zur Genotypisierung der isolierten ES-Zellklone auf homologe Integration des Targeting-Vektors erfolgte mit der Phusion[®] Taq-Polymerase. Ein Amplikon von 3,3 kb zeigte die homologe Rekombination des Vektors pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in in HM1 ES-Zellen an.

Tab. 3.5.: Genotypisierung von ES-Zellklonen auf Integration von 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in'

PCR-Ansatz (20 µL)		PCR-Programm			
5 µL	DNA-Lysat	Initiale Denaturierung	96 °C	5 min	} 40 ×
2 µL	Primer 1393	Denaturierung	98 °C	15 sec	
2 µL	Primer 1181	Annealing	64 °C	30 sec	
2 µL	dNTP-Mix (2 mM)	Elongation	72 °C	2 min	
4 µL	GC-Puffer ($5 \times$)	Finale Extension	72 °C	10 min	
0,2 µL	Phusion [®] Taq-Polymerase	Hold	4 °C	∞	
ad 20 µL	ddH ₂ O				

3.5.2.2. PCR zur Genotypisierung von HDGF-EGFP-Knock-in Mäusen

Ein Amplikon von 554 bp zeigte das Vorhandensein des Wildtyp HDGF-Allels an. Nach erfolgter Rekombination mit dem Targeting-Vektor zeigte ein Amplikon von 835 bp das Vorliegen des HDGF-EGFP-Allels an.

Tab. 3.6.: Genotypisierung von transgenen HDGF-EGFP-Mäusen

PCR-Ansatz (20 μ L)		PCR-Programm			
2 μ L	DNA-Lysat	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	} 35 \times
2 μ L	Primer 1814	Denaturierung	95 °C	15 sec	
2 μ L	Primer 1815	Annealing	59 °C	30 sec	
2 μ L	Primer 1816	Elongation	72 °C	2 min	
ad 10 μ L	ddH ₂ O	Finale Extension	72 °C	10 min	
10 μ L	RedTaq Ready-Mix	Hold	4 °C	∞	

3.5.3. Agarosegelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe der nativen Agarosegelelektrophorese. DNA- beziehungsweise RNA-Moleküle wandern hierbei aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung Anode. Neben der Molekülgröße beeinflusst die Konformation (einzelsträngig, doppelsträngig, zirkulär) die Wanderungsgeschwindigkeit. Für die Auftrennung der Nukleinsäuren wurden in Abhängigkeit von der Molekülgröße Agarosekonzentrationen zwischen 0,7% und 2,0% eingesetzt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer (1 \times) aufgekocht und unter fließendem Wasser abgekühlt. Bei einer Temperatur von circa 40 °C (Handgelenktest) wurde Ethidiumbromid-Lösung (20 mg/mL) in die Gellösung gegeben (Endkonzentration an Ethidiumbromid = 0,5 μ g/mL) um DNA und RNA bei Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar zu machen. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit der entsprechenden Menge DNA-Ladepuffer (6 \times) versetzt. Parallel wurden entsprechende DNA-Längenstandards aufgetragen, die eine qualitative und semi-quantitative Beurteilung der zu analysierenden Proben ermöglichten. Die Elektrophorese wurde bei Spannungen von 100-120 V durchgeführt.

3.6. Nachweise von Proteinen

3.6.1. Proteinextraktion

Für die Protein-Analyse von Geweben wurden frisch entnommene Gewebe in RIPA-Lysepuffer mit Hilfe eines Dounce- oder Duall-Homogenisators homogenisiert. Pro 100 mg Gewebe wurde 1 mL RIPA-Lysepuffer eingesetzt. Für die Analyse von Zellen wurden die trypsinierten Zellen mit PBS gewaschen und nach einem Zentrifugationsschritt (900 rpm, 5 min, 20 °C) direkt in RIPA-Lysepuffer aufgenommen. Die Extraktionslösung wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (14000 rpm, 15 min, 4 °C). Der gewonnene Überstand wurde für die Proteinbestimmung und weitere Analysen eingesetzt. Die Lagerung von Zell- und Gewebelysaten erfolgte bei -20 °C.

3.6.2. Proteinbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den aufgearbeiteten Zell- und Gewebelysaten wurde das BioRad DC Assay System verwendet, das auf der Methode von Lowry basiert.¹⁶⁰ Für die Herstellung einer Kalibrierkurve wurde eine BSA-Stammlösung (10 mg/mL in PBS) entsprechend in RIPA-Lysepuffer verdünnt. Die Zell- und Gewebelysate wurden gegebenenfalls mit RIPA-Lysepuffer im Verhältnis 1:5 oder 1:10 an den Kalibrierbereich angepasst. Jeweils 5 µL der Kalibrierstandards und der Proben wurden als Doppelwerte in die Kavitäten einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von 25 µL frisch hergestellter Lösung A' (alkalische Kupfertartratlösung und Surfactant-Lösung) und 200 µL Lösung B (verdünntes Folin-Reagenz) erfolgte ein Inkubationsschritt für 15 min bei 20 °C. Die Auswertung wurde anschließend durch Bestimmung der Absorption an einem GENios Mikroplaterreader bei einer Wellenlänge von 750 nm durchgeführt.

3.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer molekularen Masse, unabhängig von ihrer Eigenladung, erfolgte mit Hilfe diskontinuierlicher SDS-PAGE. Dazu wurden denaturierende, SDS-haltige Gele basierend auf der Methode von Laemmli¹⁶¹ entsprechend Tab. 3.7 angefertigt. Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit RIPA-Lysepuffer auf etwa gleiche Proteingehalte (≈ 2 mg/mL) eingestellt, mit Laemmli-puffer ($4 \times$) versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Als Größenstandard wurden 2 µL Prestained Page Ruler verwendet. Die Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen des Sammelgels gegeben und die Elektrophorese bei kleinen Gelen initial mit 60 V gestartet. Nach Erreichen des Trenngels

wurde die Spannung auf 100-120 V erhöht. Die elektrophoretische Trennung bei großen Gelen wurde über Nacht bei 16 °C und einer Stromstärke von 15 mA durchgeführt. Kurz bevor die Lauffront den unteren Rand des Gels erreichte, wurde das Gel aus der Kammer genommen und für die Western-Blot-Analyse vorbereitet.

Tab. 3.7.: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

	Kleines Gel		Großes Gel	
	Sammelgel	Trenngel	Sammelgel	Trenngel
ddH ₂ O	1,2 mL	2,4 mL	6,1 mL	14,4 mL
40% Acrylamid	0,25 mL	1,25 mL	1,25 mL	7,5 mL
Sammelgelpuffer	0,5 mL	—	2,5 mL	—
Trenngelpuffer	—	1,25 mL	—	7,5 mL
10% SDS	20 µL	50 µL	100 µL	300 µL
10% APS	20 µL	50 µL	100 µL	300 µL
TEMED	2 µL	5 µL	10 µL	30 µL

3.6.4. Western-Blot-Analyse nach dem Semi-Dry-Verfahren

Unter dem Begriff Western- oder Immunoblot versteht man den Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran, die meist aus Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluorid besteht. Der Western-Blot ermöglicht eine Identifizierung bestimmter Proteine aus einem Proteingemisch durch spezifische Antikörper. Für die Western-Blot-Analyse nach dem Semi-Dry-Verfahren wurde das Gel nach der Elektrophorese vorsichtig in Towbin-Puffer¹⁶² überführt und 5 min auf einem Kreisschüttler äquilibriert. Währenddessen wurden 12 Whatman-Papiere in Towbin-Puffer getränkt und eine Nitrocellulose-Membran (jeweils auf die dem Gel entsprechende Größe zugeschnitten) in ddH₂O von Herstellungsrückständen befreit. Für den Blot wurden 6 Stück der getränkten Whatman-Papiere auf die Anode der Blotkammer gelegt, gefolgt von der angefeuchteten Nitrocellulose-Membran, dem zu blottenden Gel und weiteren 6 Stück Whatman-Papier. Eventuell eingeschlossene Luftblasen wurden durch Rollen über den Blotansatz mit einer 10 mL Messpipette entfernt. Das Blotten erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 60 min und wurde mit Hilfe der Ponceaus-Färbung überprüft. Dafür wurde die Nitrocellulose-Membran für wenige Sekunden in der Ponceaus-Gebrauchslösung inkubiert und im Anschluß mit ddH₂O gewaschen. Damit konnte sowohl die Gleichmäßigkeit der Probenmenge als auch des Transfers auf die Membran überprüft werden. Die Färbung wurde durch mehrmaliges Waschen mit ddH₂O entfernt. Anschließend wurden die Membranen zur Blockierung freier Bindungsstellen mit Western-Blocklösung für 30 min bei 20 °C auf einem Kreisschüttler inkubiert. Nach der Blockierung wurde die Membran dreimal für je 5 min mit 10 mL TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, der in 10 mL

TBST/Western-Blocklösung (9+1) verdünnt wurde, erfolgte bei 4 °C über Nacht. Es folgten erneut drei Waschschrte für je 5 min mit 10 mL TBST und anschließend die Inkubation des ebenfalls in 10 mL TBST/Western-Blocklösung (9+1) verdünnten Sekundärantikörpers (speziesspezifisch, peroxidasegekoppelt) für 1 h bei 20 °C. Im Anschluß wurde die Membran zweimal je 5 min mit 10 mL TBST und einmal 5 min mit ddH₂O gewaschen. Für die Detektion über verstärkte Chemilumineszenz (ECL) wurde das SuperSignal[®] West Pico ECL Kit entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Membran zwischen zwei Folien in eine Filmkassette eingelegt und ein RX-Film aufgelegt. Nach verschiedenen Expositionszeiten (10 sec-5 min) wurden die Filme maschinell entwickelt. Zur Normalisierung der Signale auf sogenannte „Housekeeping“-Proteine wurde die Membran im weiteren Verlauf mit Primärantikörpern gegen β -Actin oder GAPDH und fluorophor-markierten Sekundärantikörpern inkubiert. Die Auswertung erfolgte dann an einem LI-COR Laserscanner.

3.6.5. Immunfluoreszenznachweise von Proteinen

Die Immunfluoreszenz-Analyse ermöglicht den Nachweis von Proteinen in Zellen und Geweben mit Hilfe von Antikörpern. Damit ist sowohl eine Aussage über die Expression des Proteins im Gewebe und der Zelle, als auch über seine Lokalisation möglich.

3.6.5.1. Immunfluoreszenzanalysen an Gefrierschnitten

Für die Immunfluoreszenz-Analyse präparierte Gewebe wurden in einem „Kryo mould“ direkt in TissueTek[®] eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Anschließend konnten am Kryostaten bei einer Umgebungstemperatur von -21 °C und einer dem Gewebe angepassten Objekttemperatur zwischen -18 °C und -25 °C Gefrierschnitte angefertigt werden. Das Trimmen der Gewebe erfolgte mit 50 μ m; die Schnittdicke der Gefrierschnitte betrug 10-12 μ m. Die Schnitte wurden auf Superfrost[®]Plus Objektträger aufgezogen und für 1 h luftgetrocknet. Nicht sofort benutzte Gewebeschnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C in Alufolie verpackt gelagert. Die Gefrierschnitte wurden zunächst für 5 min mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Danach wurde 3 \times für je 10 min mit PBS gewaschen. Im Anschluß erfolgte eine Permeabilisierung mit 0,01% Triton X-100 für 30 min. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen folgte eine 30 minütige Inkubation mit 1% BSA in PBS. Primär- und Sekundärantikörper wurden in der entsprechenden Verdünnung mit 1% BSA in PBS verdünnt. Die Inkubation des Primärantikörpers wurde über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Es folgten wiederum drei Waschschrte mit PBS und daraufhin die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 1 h bei 20 °C. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch erneutes

dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Zur unspezifischen Zellkernmarkierung wurden die Präparate 5 min mit DAPI- oder PI-Lösung inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS und zur Entfernung von Salzen mit ddH₂O gewaschen. Die Präparate wurden abschließend in absoluten Ethanol taucht, kurz luftgetrocknet und in Mounting-Medium eingedeckelt. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Schnitte lichtgeschützt bei 20 °C aufbewahrt.

3.6.5.2. Immuncytochemie (ICC)

Für den immuncytochemischen Nachweis von Proteinen in Zellen wurden 3×10^4 Zellen in 500 µL des entsprechenden Mediums auf einen 10 mm Cover slip in einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen durch Zugabe von 500 µL 8% PFA/20% Sucrose für 10 min bei 20 °C fixiert. Nach einem Waschschrift mit 1 mL PBS erfolgte die Permeabilisierung mit 0,2% Triton X-100 für 2 min bei 20 °C. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde für 30 min mit 3% BSA in PBS inkubiert. Primär- und Sekundärantikörper wurden in der entsprechenden Verdünnung mit 1% BSA in PBS verdünnt. Die nachfolgenden Schritte wurden auf beziehungsweise in einem 30 µL Tropfen in wasserdampfgesättigter Atmosphäre durchgeführt. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 h bei 20 °C folgten drei Waschschriffe mit PBS und daraufhin die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 1 h bei 20 °C. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Zur unspezifischen Kernfärbung wurden die Cover slips 5 min mit DAPI-Lösung inkubiert, zweimal mit PBS und zur Entfernung von Salzen mit ddH₂O gewaschen. Die Cover slips wurden abschließend in absoluten Ethanol getaucht, kurz luftgetrocknet und mit Mounting-Medium auf einen Objektträger aufgebracht. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Objektträger lichtgeschützt bei 20 °C aufbewahrt.

3.6.6. Immunhistochemie (IHC)

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Gefrierschnitte zunächst für 5 min mit 4% PFA fixiert und im Anschluß $3 \times$ für je 10 min mit PBS gewaschen. Zur Deaktivierung endogener Peroxidasen folgte eine 5 minütige Inkubation mit 1% H₂O₂. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Permeabilisierung mit 0,5% Triton X-100 für 5 min. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde dann 30 min mit 2% BSA in PBS inkubiert. Primär- und Sekundärantikörper wurden in der entsprechenden Verdünnung mit 2% BSA in PBS verdünnt. Die Inkubation des Primärantikörpers wurde über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS und daraufhin die Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper für 1 h bei

20 °C. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch erneutes dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Nach Inkubation mit ABC-Lösung für 1 h bei 20 °C wurden die Schnitte mit HistoGreen-Substrat gefärbt, kurz mit PBS gewaschen und zweimal 30 sec mit absolutem Ethanol und zweimal 30 sec mit Xylol entwässert. Die Präparate wurden abschließend in DPX-Medium eingedeckelt.

3.7. Histologische Untersuchungen

3.7.1. Alizarinrot-Alcianblau-Färbung von Knochen- und Knorpelgewebe

Mit Hilfe der Farbstoffe Alcianblau und Alizarinrot können Knorpel- und Knochengewebe selektiv gefärbt werden.⁹⁷ Dafür wurden Mäuse des Entwicklungstages P10 mit Diethylether narkotisiert und für 30 s in heißes Wasser gelegt um die Mazeration der Organe zu erleichtern. Die Haut wurde im Anschluß vorsichtig mit Pinzetten abgezogen und die Eingeweide sowie die Inhalte der Peritoneal- und Pleuralregion entfernt. Die Torso der Mäuse wurden anschließend mit 95% Ethanol über Nacht fixiert und danach zur Entfernung von Körperfett über Nacht in Aceton transferiert. Nach einem kurzem Waschschrift mit ddH₂O folgte die Färbung des Knorpelgewebes mit Alcianblau-Färbelösung für circa 24 h. Die Mäuse wurden dann mehrmals mit 70% Ethanol über einen Zeitraum von 6-8 h gewaschen und zur Klärung über Nacht bei 4 °C in 1% KOH gegeben. Am nächsten Tag folgte die Färbung des Knochengewebes mit Alizarinrot-Färbelösung für circa 10 h bei 20 °C. Die gefärbten Skelette wurden für 2 Tage in 1% KOH/20% Glycerol geklärt und abschließend in Glycerol/absolutem Ethanol (1:1) gelagert. Die Dokumentation der gefärbten Skelette erfolgte auf einem Leuchttisch mit einer Digitalkamera.

3.8. Sonstige Nachweise

3.8.1. Zellzyklus-Analyse

Wird eine mit Propidiumiodid (PI) inkubierte Zellsuspension im Durchflusszytometer analysiert, so ist es aufgrund der stöchiometrischen Bindung von PI an doppelsträngige DNA möglich die Zellen entsprechend den detektierten Fluoreszenzsignalen den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus zuzuordnen:¹⁶³

Tab. 3.7.: Zellzyklus-Analyse

Phase	Chromosomensatz
G _{0/1}	diploid (1n)
G ₂	tetraploid (2n)
S	zwischen di- und tetraploid

Dafür wurden zunächst 2×10^6 PDF-Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 1500 rpm, 20 °C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 300 µL PBS suspendiert. Die Zellen wurden nach Zugabe von 700 µL eiskaltem, absolutem Ethanol *abs.* für 1 h bei 4 °C fixiert. Um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden, wurde der Ansatz bei Zugabe des absoluten Ethanols auf niedriger Stufe gevortext. Nach Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, 20 °C) wurden die Zellen in 1 mL PBS und nach Zusatz von 5 µL Saponin für 15 min bei 20 °C inkubiert. Um Störungen durch RNA auszuschließen, wurde nach Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, 20 °C) das Zellpellet mit 200 µL PBS aufgenommen, mit 100 µL RNase-Lösung versetzt und 30 min bei 20 °C inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluß zentrifugiert (5 min, 1500 rpm, 20 °C), mit 1 mL PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, 20 °C) in 400 µL PBS/PI aufgenommen. Nach Färbung der DNA (15 min, im Dunkeln, 20 °C) erfolgte die Zellzyklusanalyse an einem FACS Calibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson). Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der hämatologisch-onkologischen Abteilung des Instituts für Pathologie (Arbeitskreis Prof. Rücker, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt.

3.8.2. FACS-Analyse von Vollblut

Für die Untersuchung einer möglichen Expression von HDGF und anderen zellspezifischen Markern in Lymphozyten wurde 4 Wochen alten Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen. Pro Maus wurden zunächst 10-20 µL Heparin in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt. Nachdem die Mäuse für circa 5 min zur Erweiterung der Gefäße unter eine

Rotlichtlampe gesetzt wurden, erfolgte die Entnahme eines Blutropfens mit einer heparinisierten Glaskapillare aus der Schwanzvene. Das Blut wurde direkt im Anschluß in das vorbereitete Heparin überführt. Zur Erythrozytenlyse wurden 300 µL Ammoniumchlorid-Lysepuffer zum Schwanzvenenblut gegeben und kurz gevortext. Der Ansatz wurde 5 min bei 20 °C inkubiert und nach Zugabe von 1 mL PBS zentrifugiert (4 min, 2000 rpm, 20 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet nach Resuspendieren in 200 µL FACS-Puffer in FACS-Röhrchen überführt und mit weiteren 2 mL FACS-Puffer versetzt. Nach Zentrifugation (10 min, 1600 rpm, 8 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und ein CD3, CD4, CD8-Antikörpermix in der entsprechenden Verdünnung in 100 µL FACS-Puffer zugegeben. Die Färbung erfolgte 20 min auf Eis. Zum Waschen wurden 2 mL FACS-Puffer zugefügt und der Ansatz zentrifugiert (10 min, 1600 rpm, 8 °C). Die Messung erfolgte nach Resuspendieren des Pellets in 300 µL FACS-Puffer an einem FACS Canto Durchflussszytometer (Becton Dickinson) in Zusammenarbeit mit der hämatologisch-onkologischen Abteilung (Prof. Rücker, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn). Die nachfolgende Auswertung wurde mit der CELLQuest-Software und mit WinMDI 2.8 durchgeführt.

3.8.3. Untersuchung der Proliferation mit ³H-Thymidin

Um den Einfluss von exogenem HDGF auf die Proliferation primärer, dermaler Fibroblasten zu untersuchen wurde der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin während der DNA-Replikation bestimmt. Dazu wurden je 5×10^3 PDF-Zellen (Passagenzahl < 5) pro Kavität auf eine mit 0,1% Gelatine beschichtete 96-Well-Platte ausplattiert. Nach 24 h wurde zweimal mit DMEM-Medium gewaschen. Für die weitere Kultivierung über einen Zeitraum von 48 h wurde PDF-Medium/10% FCS als Positivkontrolle, PDF-Medium/0,1% FCS als Negativkontrolle und PDF-Medium/0,1% mit Zusatz von verschiedenen Mengen an rHDGF-His verwendet. Danach wurde pro Kavität 0,5 µCi ³H-Thymidin zugegeben, leicht geschwenkt und für weitere 24 h inkubiert. Für die Messung wurde der Überstand abgenommen, die Kavitäten mit PBS gewaschen und die Zellen mit 50 µL Trypsin abgelöst. Die Zellen konnten dann mit einem Brandel M-96 Harvester über UNI Filter-96 GF/B-Platten geerntet werden, wobei die DNA an der Silica-Matrix des Filters adhärte. Nach gründlichem Spülen mit ddH₂O wurde die Filterplatte kurz getrocknet und eine Szintillationsflüssigkeit zupipettiert. Die so vorbereitete Platte konnte dann an einem TopCount NXT β-Counter vermessen werden. Die Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Fr. Nicole Florin (Arbeitskreis Prof. Müller, Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn).

3.8.4. Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität

Für die Messung der Caspase 3/7-Aktivität wurde der Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) eingesetzt. Dazu wurden 5×10^3 PDF-Zellen/Kavität in einer mit 0,1% Gelatine beschichteten 96-Well-Platte (LumitracTM, Greiner Bio-One) ausplattiert. Am folgenden Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt und zu definierten Zeitpunkten TNF α und CHX (10 μ g/mL) zur Apoptoseinduktion hinzugefügt. Die Bestimmung der Caspase-Aktivität erfolgte nach Zugabe von Caspase-Glo 3/7 Reagenz und einer Inkubation von 1 h bei 20 °C durch Messung der Lumineszenz an einem GENios Mikroplaterader.

3.8.5. Untersuchung der Zellvitalität nach Apoptoseinduktion

Der Alarmablue Assay ermöglicht die quantitative Bestimmung der Zellproliferation und die Bestimmung einer relativen Zytotoxizität. Der Test basiert auf einem Farbstoff als Redox-Indikator, der sowohl seine chromophoren, als auch seine fluorophoren Eigenschaften je nach Redoxzustand ändert (die oxidierte Form fluoresziert nicht). In Gegenwart von Zellen entsteht durch Redoxäquivalente aus dem Zellstoffwechsel die fluoreszierende Form. Für die Untersuchung wurden 5×10^3 PDF-Zellen/Kavität in einer mit 0,1% Gelatine beschichteten 96-Well-Platte ausplattiert und am folgenden Tag das Zellkulturmedium gewechselt. Zur Induktion der Apoptose wurden neben TNF α und CHX (10 μ g/mL) auch H₂O₂ und UV-Strahlung mittels eines UV-Crosslinkers verwendet. Am darauffolgenden Tag wurde Medium mit 10%(v/v) Alarmablue-Reagenz zugefügt und nach einer Inkubationszeit von 3 h die Fluoreszenz bei 590 nm an einem GENios Mikroplaterader gemessen. Die Vitalität der unbehandelten Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die anderen Ansätze relativ dazu betrachtet.

3.8.6. EGFP-Analysen an Mausorganen

Die Embryonen einer schwangeren Maus aus einer heterozygoten Verpaarung wurden am Tag 12,5 dpc präpariert und in PBS überführt. Für die Analyse der Organe auf EGFP-Expression wurden adulte Mäuse von HDGF^{+/+} und HDGF^{EGFP/EGFP} Mäusen präpariert und in PBS transferiert. Die Embryonen und Organe wurden mehrmals zur Entfernung von Haaren, Blut und Geweberesten mit PBS gewaschen und anschließend unter einem Stereomikroskop MS5 (Zeiss) ausgestattet mit einem Fluoreszenzmodul und einem GFP plus Filterset HBO 100 W untersucht. Bilder wurden mit einer ProgRes c10plus Kamera

mit Hilfe der ProgRes Capture-Pro 2.1 Software dokumentiert und mit Corel Photo Paint bearbeitet. Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Radoslaw Dobrowolski (Arbeitskreis Prof. Willecke, Institut für Genetik, Universität Bonn) durchgeführt.

3.9. Tierexperimentelles Arbeiten

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten nach den Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes und waren durch das Regierungspräsidium Köln (Genehmigungsnummer: AZ50.203.2-BN24,45/04: „*Untersuchung der Bedeutung von Mitgliedern der Hepatoma-derived growth factor Familie mit Hilfe von Gen-defizienten Mäusen*“) genehmigt worden. Alle Tiere, denen Organe entnommen wurden, wurden zunächst mit Diethylether betäubt. Adulte Tiere wurden im Anschluß durch zervikale Dislokation und unter zwei Wochen alte Tiere durch Decapitation getötet. Die verwendeten Mauslinien wurden in FilterTop-Boxen mit einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

3.9.1. Verhaltenstests an Mäusen

3.9.1.1. Rotarod-Test

Der Rotarod-Test erlaubt die Analyse der flexiblen Bewegungskoordination der Vorder- und Hinterbeine und gibt Aufschlüsse über die Fähigkeit Balance zu halten.¹⁶⁴ Die Untersuchungen wurden wie bei Kuhn *et al.*¹⁶⁵ beschrieben durchgeführt. Während der initialen Gewöhnungsphase wurden adulte, männliche Mäuse an drei aufeinander folgenden Tagen für je 10 sec bei 3 rpm auf das langsam drehende Rotarod gesetzt. Am vierten Tag wurden die Mäuse für 1 min auf das Rotarod bei 12 rpm gesetzt und die Anzahl der Fälle in dieser Zeit gemessen. Um eine konstante Versuchsdauer von 1 min zu gewährleisten, wurde bei jedem Fallen die Zeit angehalten.

3.9.1.2. „Open-Field“-Test

Der Open-Field-Test wurde zur Untersuchung des Erkundungsverhaltens von HDGF^{+/+} im Vergleich zu HDGF^{EGFP/EGFP} Mäusen eingesetzt. Dafür wurden adulte, männliche Mäuse einzeln für jeweils 5 min in eine offene Box Typ ENV-515-16 (44 cm x 44 cm) mit Plexiglas-Wänden gesetzt. Lichtschranken, die die Fläche in kleinere Quadrate unterteilen, registrierten die Bewegungen der Mäuse. Aus den erhaltenen Daten konnten verschiedene Verhaltensparameter mit Hilfe von Activity V4.36 (MedAssociates Inc., St. Albans, USA) abgeleitet und später mit Hilfe von Excel ausgewertet werden.

3.9.2. Oraler Glukosetoleranz-Test

Zur Bestimmung der Glukosetoleranz wurden adulte Mäuse über Nacht unter vollständigem Futterentzug mit freiem Zugang zu Wasser nüchtern gesetzt. Am nächsten Tag wurde zum Zeitpunkt $t=0$ zunächst das Gewicht und die Glukosekonzentration im Vollblut („Nüchternwert“) bestimmt. Dazu wurde ein kleines Stück der Schwanzspitze entfernt und ein Tropfen Blut mit einem Ascensia Elite Blutzuckermessgerät untersucht. Anschließend wurden 1,5 mg/g Körpergewicht D(+)-Glukosemonohydrat in physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Nach $t=25, 45, 70, 105, 145$ und 165 Minuten wurde die Glukosekonzentration im aus der Schwanzspitze entnommenen Vollblut gemessen.

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung von Targeting-Vektoren für die gezielte Inaktivierung des HDGF-Gens

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ausschaltung des HDGF-Gens durch homologe Rekombination in murinen, embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) und davon ausgehend die Etablierung einer transgenen Mauslinie. Initial mussten hierzu zunächst geeignete Targeting-Vektoren kloniert werden.

Als Ausgangsvektor diente der Vektor 'pHWlox1', der ein HPRT-Minigen zur positiven Selektion enthält, das von zwei *loxP*-Sequenzen gleicher Orientierung flankiert wird. Zu beachten ist, dass eine effiziente Targeting-Strategie möglichst lange Homologiebereiche zum Zielgen voraussetzt, deren Länge aber eine bestimmte Größe nicht überschreiten sollte. Hierbei weisen asymmetrische Targeting-Vektoren mit einem kürzeren und einem längerem Homologiebereich zum einen eine höhere Rekombinationswahrscheinlichkeit auf und zum anderen ermöglicht ein kurzer Homologiebereich ein schnelles Screenen embryonaler Stammzellklone mit Hilfe der PCR. Alle nachfolgend beschriebenen Vektoren wurden vor weiteren Klonierungsschritten mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten und in ausgewählten Bereichen durch Sequenzierung überprüft.

Zu Beginn dieser Arbeit standen keine DNA-Fragmente des HDGF-Gens für die Klonierung von Austauschvektoren zur Verfügung. Daher wurden aus den bekannten Sequenzdaten des murinen HDGF-Gens (Ensembl:ENSMUSG00000004897) spezifische Primer für die Amplifikation ausgewählter Genbereiche abgeleitet (siehe Abb. 4.1) und mittels PCR amplifiziert. Als Matrize diente isogenomische DNA aus HM1-ES-Zellen, sowie DNA aus dem genomischen BAC-Klon (RP23-377C20). Die erhaltenen Fragmente wurden nach Klonierung in entsprechend geschnittene pBSK(-)-Vektoren mit T7- und T3-Primern sequenziert.

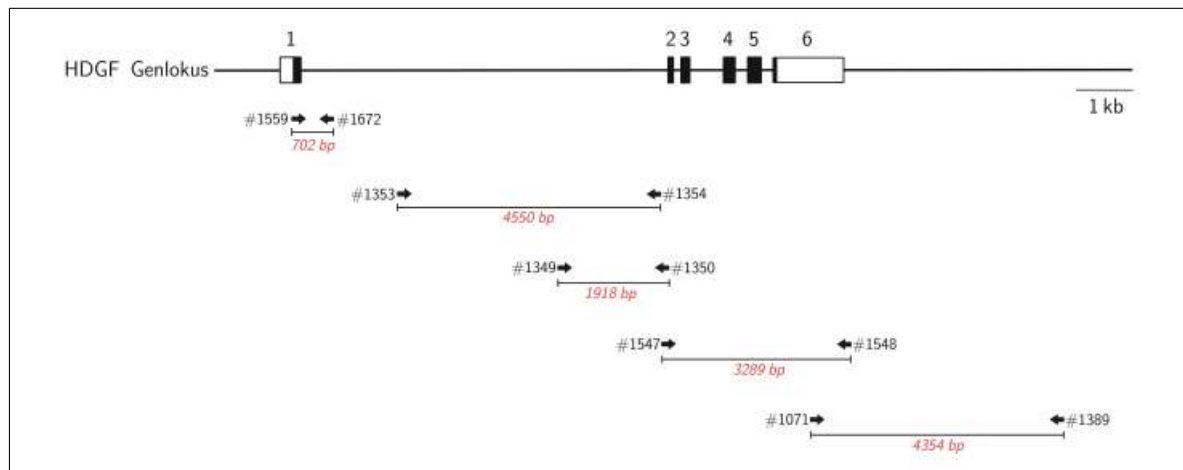


Abb. 4.1.: Darstellung der amplifizierten Genbereiche des HDGF-Gens. Die dargestellten Fragmente wurden mit den angegebenen Primern und DNA aus HM1-ES-Zellen beziehungsweise dem genomischen BAC-Klon RP23-377C20 als Matrize mittels PCR amplifiziert und in pBSK(-)-Vektoren kloniert. Die amplifizierten Bereiche wurden ansequenziert und mit bekannten Sequenzen des murinen HDGF-Gens verglichen. (Schwarze Boxen stellen kodierende Sequenzen und weiße Boxen nicht kodierende Bereiche des HDGF-Gens dar.)

4.1.1. Klonierung von pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in

Für die Erzeugung einer transgenen Mauslinie mit konstitutiver HDGF-Defizienz wurde der Austauschvektor 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in' kloniert (Abb. 4.2), der zur Deletion des genomischen Bereichs zwischen Exon 2 und 6 des HDGF-Gens führt und gleichzeitig die kodierende Sequenz von EGFP hinter der Splice-Akzeptor-Stelle von Exon 2 in das Leseraster (*in frame*) des HDGF-Gens inseriert. Dieser Vektor bewirkt nach erfolgreicher Rekombination die Ausschaltung von HDGF und stattdessen die Expression eines HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins unter Kontrolle des HDGF-Promotors.

4.1.1.1. Klonierung der 5'-homologen Region und des EGFP-Reportergens

Der für den Targeting-Vektor verwendete 5'-Homologiebereich wurde mittels PCR mit den Primern #1349 und #1350 und genomischer HM1-DNA als Matrize amplifiziert. Das so erhaltene 1918 bp-Amplikon enthielt Bereiche aus Intron 1, die Splice-Akzeptor-Sequenz von Exon 2, sowie die ersten 6 Basenpaare von Exon 2 (siehe Abb. 4.1). Die Amplifikate wurden anschließend phosphoryliert und in einen mit *EcoRV* geschnittenen, dephosphorylierten 'pBSK(-)'-Vektor kloniert. Ein weiterer Ansatz wurde *Bam*HI gespalten und das daraus resultierende 1741 bp große Fragment in den ebenfalls mit *Bam*HI geschnittenen, dephosphorylierten Vektor 'pEGFP-N3' kloniert (Abb. 4.2). Im Rahmen einer Sequenzanalyse ausgewählter Abschnitte des hergestellten Vektors 'pEGFP-N3 HDGF 1,7 kb sense'

wurden keine Mutationen gefunden und die korrekte Klonierung der Splice-Akzeptor-Sequenz und der ersten 6 Basenpaare von Exon 2 in das Leseraster des EGFP-Gens bestätigt (Daten nicht gezeigt).

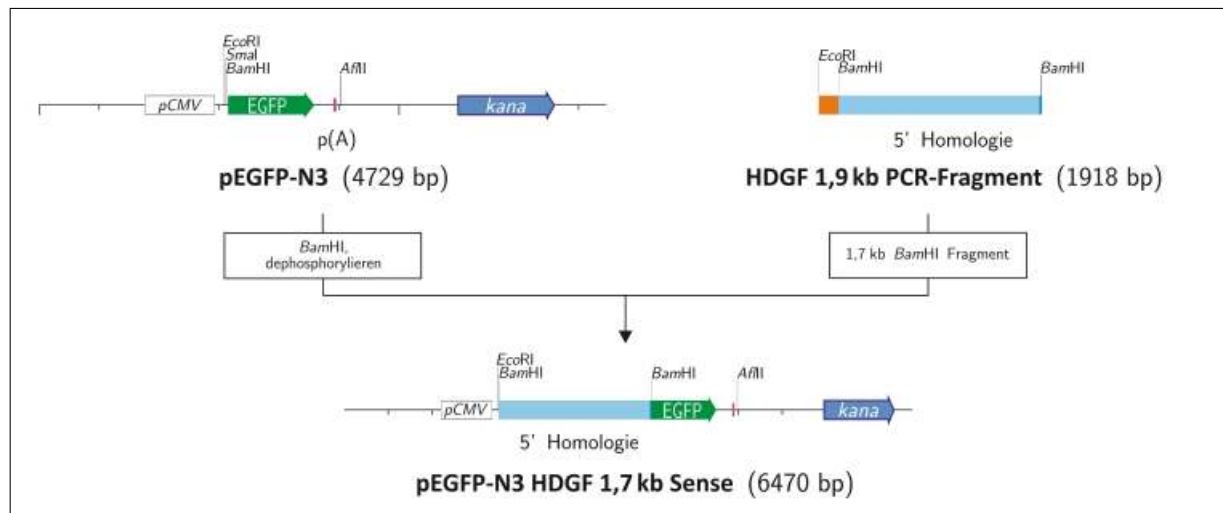


Abb. 4.2.: Klonierungsstrategie der 5'-Homologie und des Reportergens EGFP. Der mit Hilfe spezifischer Primer amplifizierte Bereich aus Intron 1 des HDGF-Gens wurde nach Verdau mit *Bam*HI in einen analog geschnittenen, dephosphorylierten 'pEGFP-N3'-Vektor kloniert.

4.1.1.2. Klonierung der 3'-homologen Region

Die Herstellung des 3'-Homologiebereichs erfolgte ebenfalls durch PCR, diesmal unter Verwendung der Primer #1071, #1389 und genomischer DNA von HM1-Zellen als Matrize. Die PCR-Reaktion lieferte ein 4354 bp großes Amplikon, das einen Teil von Exon VI und der in 3'-Richtung des HDGF-Gens gelegenen Region umspannt (siehe Abb. 4.1). Das Fragment wurde *blunt end* in einen mit *Sma*I geschnittenen, dephosphorylierten 'pBSK(-)'-Vektor kloniert, wobei die Ligation sowohl in *sense*, als auch in *antisense* Orientierung in Bezug zu den T3- und T7 Promotoren erfolgte. Für die nachfolgend beschriebenen Klonierungen der Targeting-Vektoren 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in' und 'pRG2-floxHDGF:mRFP-Knock-in' wurde ausschließlich der Vektor 'pBSK(-)-HDGF 4,0 kb AS' verwendet.

4.1.1.3. Klonierung des Endvektors 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in'

Wie in Abb. 4.3 ① dargestellt, wurde zur Fertigstellung des Austauschvektors zunächst die 5'-homologe Region mit dem EGFP-Reportergen aus dem Vektor 'pEGFP-N3 HDGF-1,7 kb sense' nach Verdau mit *Eco*RI und *Afl*II als 2747 bp großes Fragment isoliert.

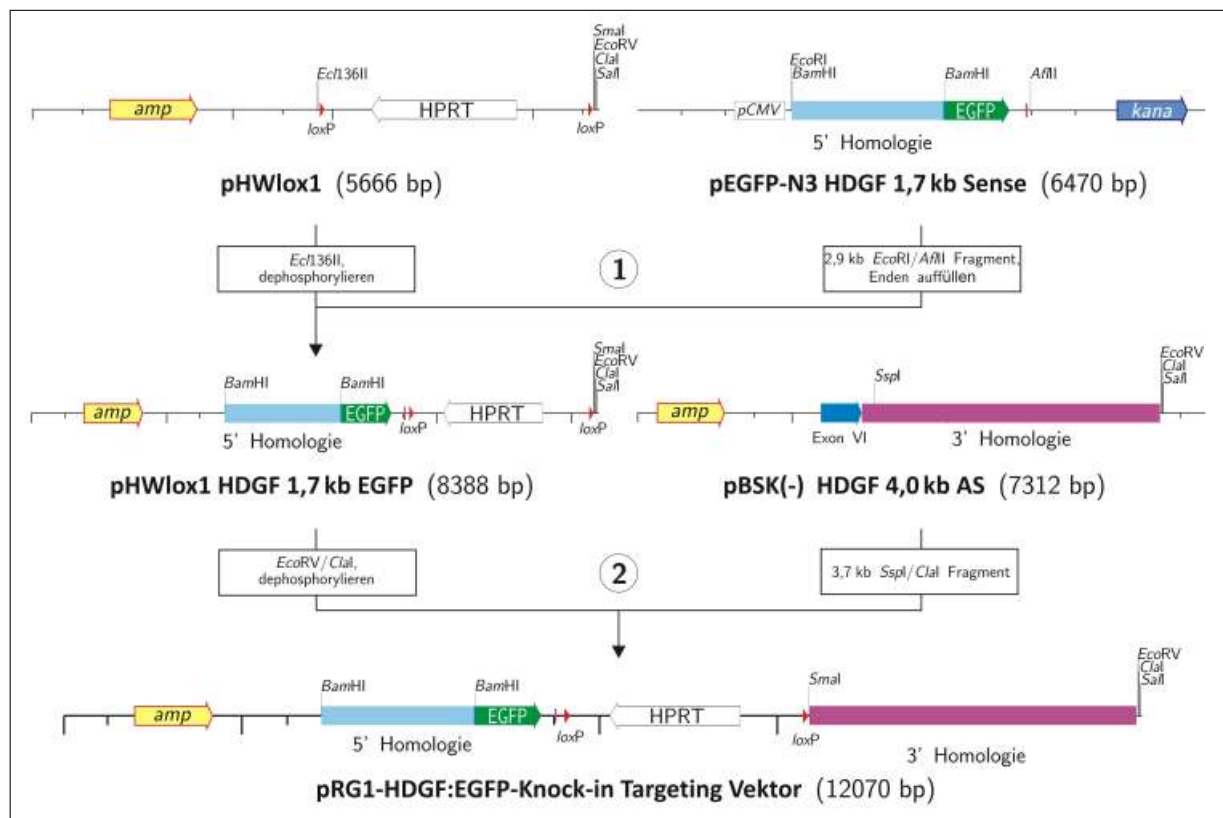


Abb. 4.3.: Klonierung des Targeting-Vektors 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in'. ① Aus dem Vektor 'pHWlox1 HDGF 1,7 kb EGFP' wurde durch Restriktionsspaltung mit *EcoRI* und *AflII* ein 2747 bp großes Fragment mit der 5'-homologen Region und dem EGFP-Reportergen isoliert und in den mit *Ecl136II* geschnittenen und dephosphorylierten 'pHWlox1'-Vektor inkloniert. ② Im abschließenden Schritt wurde die 3'-Homologie als 3695 bp großes *SspI/ClaI*-Fragment aus dem Vektor 'pBSK(-) HDGF4,0 kb AS' in den mit *EcoRV/ClaI* geschnittenen 'pHWlox1 HDGF 1,7 kb EGFP'-Vektor inseriert.

Das mit Hilfe des *Klenow*-Fragmentes aufgefüllte Fragment wurde *blunt end* in einen mit *Ecl136II* geschnittenen, dephosphorylierten 'pHWlox1'-Vektor inkloniert. Der resultierende Vektor 'pHWlox1 HDGF 1,7 kb EGFP' wurde anhand geeigneter Restriktionsspaltungen auf die richtige Orientierung des inserierten Fragments überprüft. Der 3'-Homologiebereich wurde im abschließenden Klonierungsschritt als 3695 bp großes Fragment mit den Restriktionsenzymen *SspI* und *ClaI* aus dem 'pBSK(-) HDGF 4,0 kb AS'-Vektor isoliert (Abb. 4.3 ②). Durch abschließende Ligation mit dem durch *EcoRV* und *ClaI* geschnittenen 'pHWlox1 HDGF 1,7 kb EGFP'-Vektor erhält man den vollständigen Targeting-Vektor, dessen erwartete Struktur durch ausgewählte Restriktionsspaltungen überprüft und bestätigt wurde (Abb. 4.4).

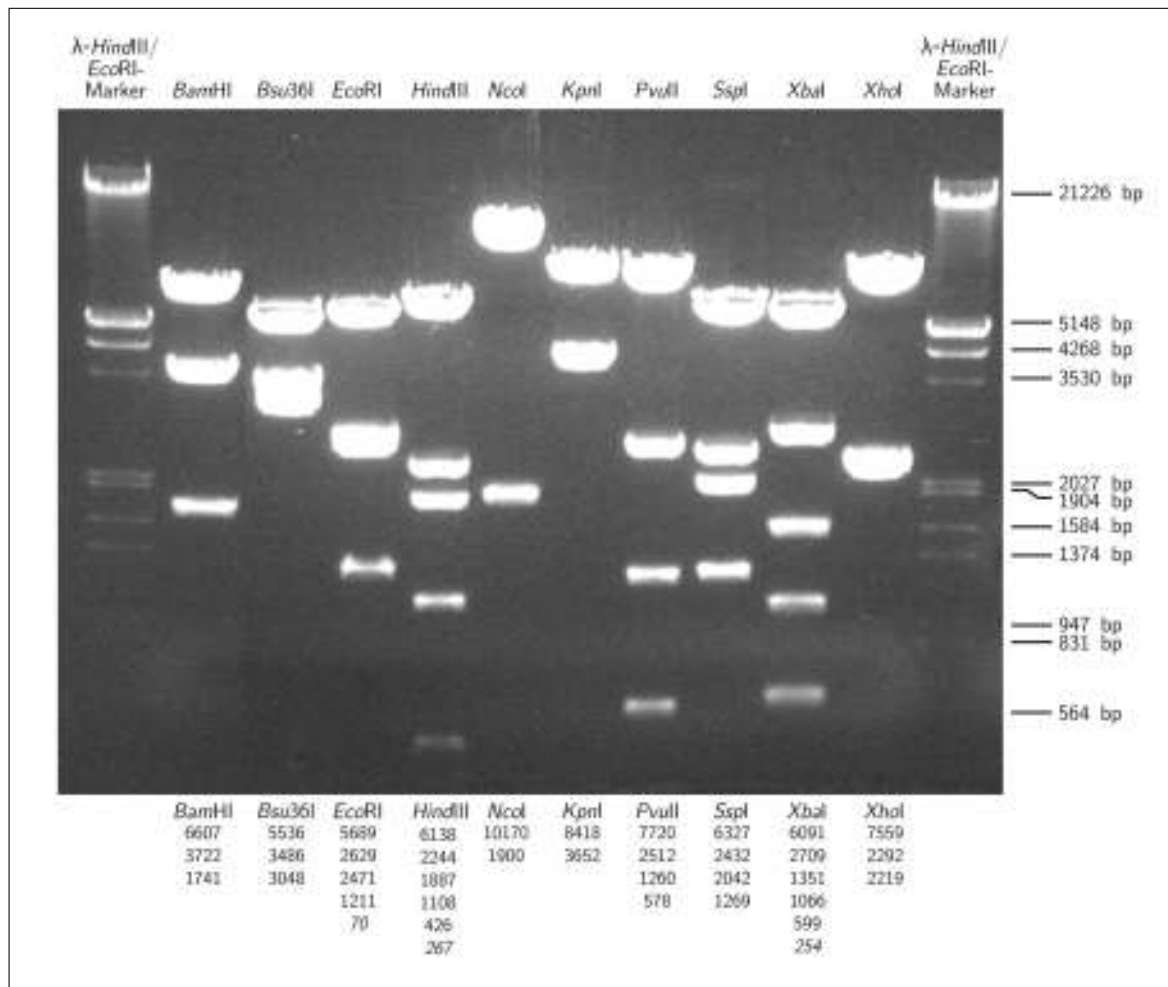


Abb. 4.4.: Restriktionsanalyse des Targeting-Vektors 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in'. Jeweils 1 µg Plasmid-DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen verdaut. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte mit einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert. Die im Gel gezeigten Spaltprodukte (angegeben in bp) entsprachen sämtlich den erwarteten Fragmentgrößen (die zugehörige Vektorkarte mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen ist im Anhang aufgeführt). Kursiv angegebene Fragmente konnten bei Aufnahme nicht mehr dokumentiert werden, waren aber im Originalgel vorhanden.

4.1.1.4. Herstellung eines PCR-Testvektors

Zur Durchführung eines schnellen und sensitiven Testverfahrens auf homologe Rekombination des Austauschvektors 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in' in einzelnen, stabil transfizierten ES-Zellklonen wurde eine PCR-Methode etabliert, die bei homologer Rekombination des 5'-Homologiebereichs in das Mausgenom ein spezifisches Amplikon liefert. Die Methode wurde unter Verwendung des Testvektors 'pPCR-Testvektor:pRG1' etabliert, der eine erfolgreiche homologe Rekombination in das Mausgenom lediglich simuliert.

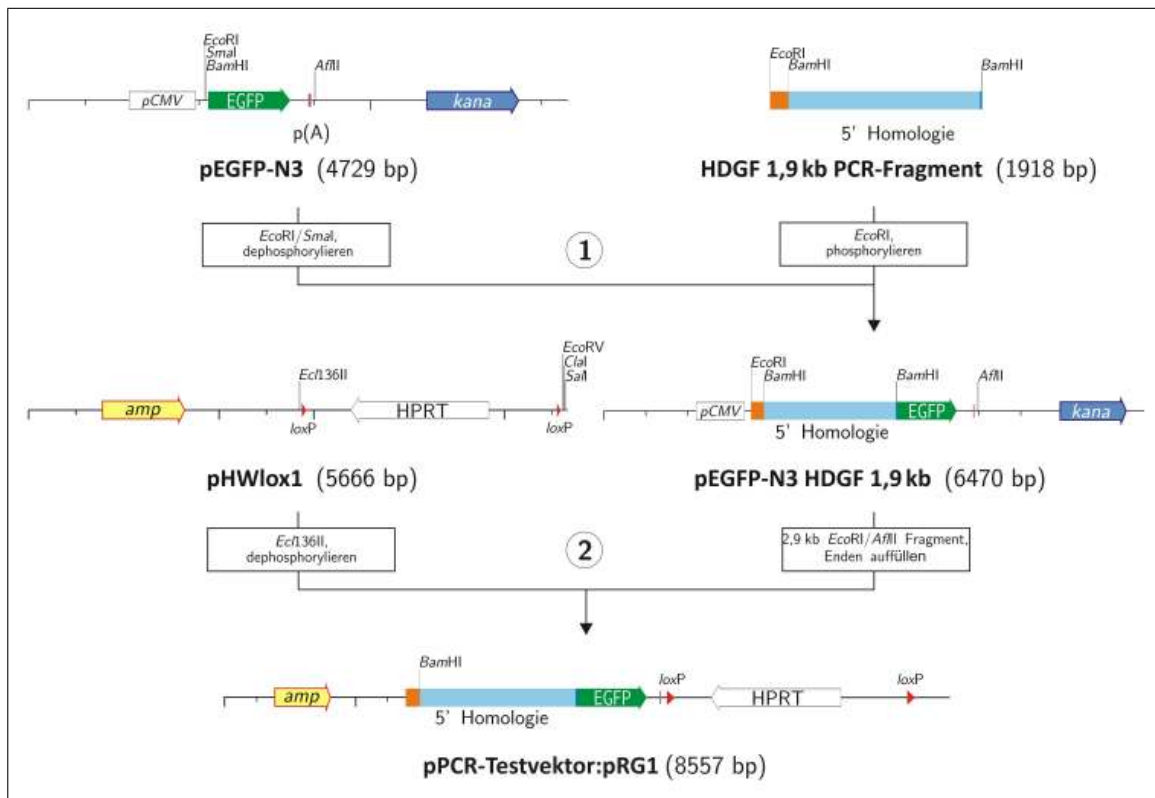


Abb. 4.5.: Herstellung des PCR-Testvektors '*pPCR-Testvektor:pRG1*'. ① Das mit den Primern #1349 und #1350 amplifizierte Fragment aus Intron 1 des HDGF-Gens wurde nach Verdau mit *EcoRI* und Phosphorylierung in den mit *EcoRI* und *SmaI* geschnittenen und dephosphorylierten '*pEGFP-N3*'-Vektor kloniert. ② Durch anschließende Restriktionsspaltung mit *EcoRI* und *AflIII* konnte ein 2887 bp großes Fragment mit der um 158 bp verlängerten 5'-homologen Region und dem EGFP-Reportergen isoliert werden. Nach Einklonierung dieses Fragments in den mit *Ecl136II* geschnittenen, dephosphorylierten '*pHWlox1*'-Vektor erhält man den Testvektor '*pPCR-Testvektor:pRG1*'.

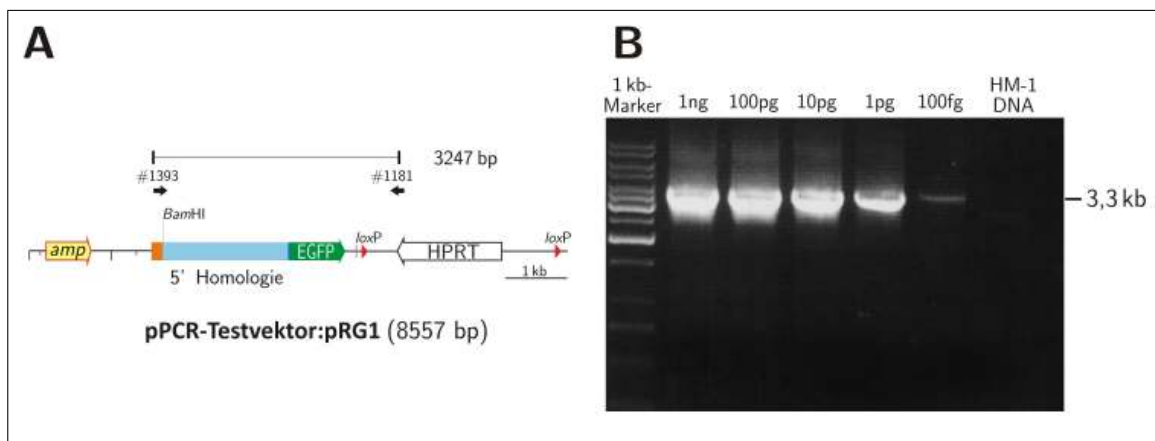


Abb. 4.6.: Etablierung einer PCR-Methode zur schnellen Analyse von ES-Zellklonen. (A) Schematische Darstellung der Strategie für das initiale ES-Zellscreening mittels PCR. (B) Ergebnis einer PCR-Analyse mit den Primern #1393, #1181 und verschiedenen Konzentrationen des Testplasmids '*pPCR-Testvektor:pRG1*' mit genomischer DNA aus HM1-ES-Zellen als Hintergrund. Das spezifische Amplicon von 3,3 kb diente als positiver Nachweis der homologen Rekombination.

Die Herstellung des Testvektors erfolgte hierbei parallel zum Targeting-Vektor mit dem Unterschied, dass ein um 158 bp stromaufwärts längerer 5'-Homologiebereich vor das EGFP-Gen kloniert wurde (Abb. 4.5). Aus dem verlängerten Sequenzbereich wurde ein spezifischer Primer abgeleitet (# 1393), mit dem eine PCR-Methode etabliert werden konnte, die auf einem Bereich des HPRT-Minigens und dem stromaufwärts des 5'-Homologiebereiches gelegenen, 158 bp langen Sequenzbereich fusst, der im Targeting-Vektor selbst nicht vorhanden ist (Abb. 4.6 A).

Abbildung 4.6 B zeigt das Ergebnis der Test-PCR mit den Primern #1393 und #1181 bei verschiedenen Konzentrationen an Plasmid-DNA mit genomischer HM1-Zell-DNA als Hintergrund. Die PCR lieferte noch bei einem Einsatz von 100 fg des Vektors das gewünschte Amplifikat mit einer Länge von 3247 bp.

4.1.2. Klonierung von pRG2-floxHDGF:mRFP-Knock-in

Mit Hilfe der amplifizierten DNA-Fragmente des HDGF-Gens und unter Verwendung verschiedener Vektoren wurde ein konditionaler Austauschvektor für das murine HDGF-Gen hergestellt. Dabei sollte die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion eines Teils des Leserasters von HDGF zur Expression eines nachgeschalteten, monomeren, rot fluoreszierenden Reporterproteins (mRFP) führen. Ziel der Klonierungsstrategie war die Minimierung von Veränderungen des HDGF-Lokus. Die 5'-gelegene *loxP*-Sequenz wurde vor die Splice-Akzeptor-Sequenz von Exon 2 kloniert während die 3'-gelegene *loxP*-Sequenz hinter das endogene Polyadenylierungssignal von HDGF eingefügt wurde. Für die funktionale Expression der Reporter-gen-mRNA nach Cre-Rekombinase vermittelter HDGF-Deletion wurde die kodierende Region des Reporterproteins mRFP analog zur Klonierung von 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in' in das Leseraster des HDGF-Gens hinter die Splice-Akzeptor-Sequenz und die ersten 6 Basen von Exon 2 kloniert. Nach Cre-vermittelter Deletion sollte so die Expression eines Fusionsproteins aus den 31 N-terminalen Aminosäuren von HDGF und mRFP (HATH₁₋₃₁-mRFP) unter Kontrolle des endogenen HDGF-Promotors erfolgen.

4.1.2.1. Klonierung des Reportergens und der 3'-homologen Region sowie des PCR-Testvektors

Abb. 4.7 zeigt die Klonierungsstrategie zur Klonierung der 3'-homologen Bereiche und des Reportergens. Zu Beginn wurde aus dem bereits hergestellten Vektor 'pHWlox1 HDGF 1,7 kb EGFP' ein 1,2 kb langes *MscI/SacII*-Fragment, das circa 300 bp von Intron 1, die

Splice-Akzeptor-Sequenz mit den ersten 6 Basen von Exon 2, sowie die in das Leseraster des HDGF-Gens eingefügte, kodierende Region des Reportergens EGFP enthält, mit einem mit *EcoRV* und *SacII* geschnittenen, dephosphorylierten 'pBSK(-)'-Vektor ligiert.

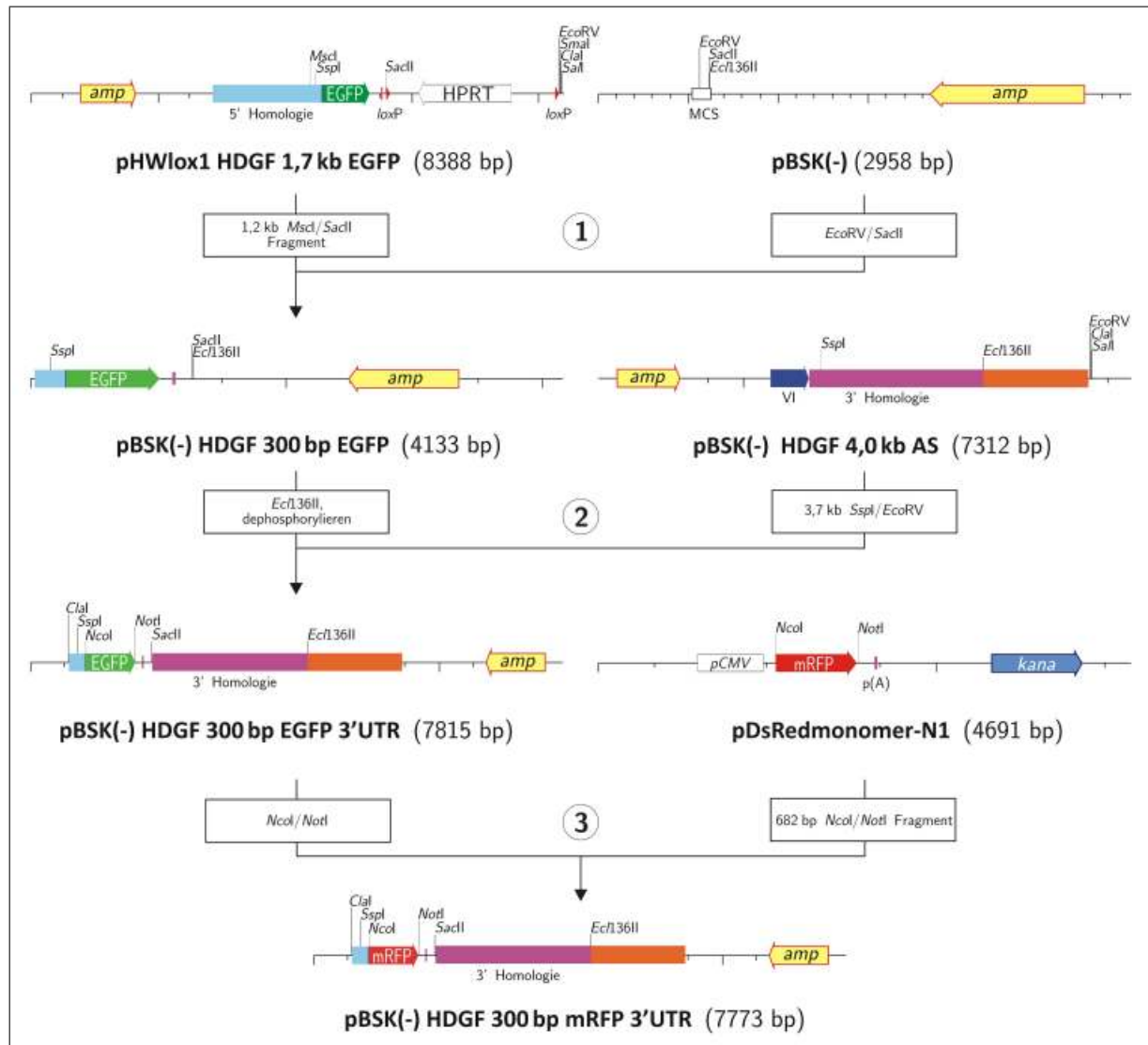


Abb. 4.7.: Klonierungsstrategie des Reportergens und der 3'-homologen Region. ① Im ersten Schritt wurde aus dem bereits vorliegenden Vektor 'pHWlox1 HDGF 1,7 kb EGFP' ein 1,2 kb langes *MscI/SacII*-Fragment mit Teilen von Intron 1, der Splice-Akzeptor-Sequenz mit den ersten 6 Basen von Exon 2, sowie der in das Leseraster des HDGF-Gens eingefügte, kodierende Region des Reportergens EGFP isoliert und in den mit *EcoRV/SacII* geschnittenen, dephosphorylierten 'pBSK(-)'-Vektor kloniert. ② Nach anschließender Restriktionsspaltung des entstandenen Vektors 'pBSK(-) HDGF 300 bp EGFP' mit *Ecl136II* konnte die 3'-homologe Region als 3,7 kb *SspI/EcoRV*-Fragment aus 'pBSK(-) HDGF 4,0 kb AS' inseriert werden. ③ Durch Umklonierung des 682 bp langen *NcoI/NotI*-mRFP-Fragments aus 'pDsRedmonomer-N1' in den entsprechend geschnittenen 'pBSK(-) HDGF 300 bp EGFP 3'UTR'-Vektor wurde das EGFP-Reportergen durch mRFP ausgetauscht und der Vektor 'pBSK(-) HDGF 300 bp mRFP 3'UTR' erhalten, der ebenfalls zur Etablierung einer Screening-PCR von ES-Zellklonen nach erfolgreicher, homologer Rekombination mit pRG2 eingesetzt werden konnte.

In den daraus resultierenden Vektor 'pBSK(-) HDGF 300 bp EGFP' wurde anschließend über die *Ecl*136II-Schnittstelle ein 3,7 kb *Ssp*I/*Eco*RV Fragment aus dem 'pBSK(-)-HDGF 4,0 kb AS'-Vektor kloniert, das 3'-gelegene Bereiche hinter Exon 6 beinhaltet. Da initial ein Austauschvektor hergestellt werden sollte, der EGFP als Reporter gen benutzt, musste nach Fertigstellung des Vektors 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in' ein alternatives Reporter gen, das sich von EGFP differenzieren lässt, berücksichtigt werden. Daher wurde das 682 bp lange *Nco*I/*Not*I-mRFP-Fragment aus 'pDsRedmonomer-N1' isoliert, in den entsprechend geschnittenen 'pBSK(-) HDGF 300 bp EGFP 3'UTR'-Vektor eingebracht und so der Vektor 'pBSK(-) HDGF 300 bp mRFP 3'UTR' erhalten, der gleichzeitig zur Etablierung einer Screening-PCR zur schnellen Analyse von ES-Zellklonen eingesetzt werden konnte.

4.1.2.2. Klonierung des geflochtenen Bereichs und der Selektionskassette

Die Klonierungsstrategie der durch *loxP*-Sequenzen flankierten Bereiche, sowie der 5'- und 3'-homologen Regionen ist in Abb. 4.8 graphisch dargestellt. Die im Austauschvektor geflochtenen Sequenzen wurden in einen Vektor kloniert, in dem zwei gleichorientierte *loxP*-Sequenzen vorlagen. Der für diesen Schritt benötigte Vektor 'pHWlox1a' wurde zuvor durch *Bam*HI/*Sal*I-Verdau, anschließendes Auffüllen der Enden mittels *Klenow*-Fragment und abschließende Religation des Ausgangsvektors 'pHWlox1' hergestellt. In diesem Vektor konnte durch *Eco*RI-Verdau die HPRT-Kassette zwischen den *loxP*-Sequenzen gegen ein 3,3 kb langes Fragment getauscht werden, das den genomischen Bereich von Exon 2 bis Exon 6 des HDGF-Gens umspannt. Dieses Fragment wurde durch *Eco*RI-Spaltung aus dem das genomische 3,3 kb PCR-Fragment enthaltenden Vektor 'pBSK(-)-HDGF 3,3 kb' isoliert und in das Vektorrückgrad des *Eco*RI-geschnittenen 'pHWlox1a'-Vektors kloniert, wodurch im Zielvektor 'pHWlox1a HDGF 3,3kb' die genomischen Sequenzen von Exon 2 bis 6 flankiert durch *loxP*-Sequenzen vorlagen. Als Selektionsmarker wurde zudem in die *Sal*I-Schnittstelle des Vektors 'pHWlox1a HDGF 3,3 kb' ein 1,9 kb großes *Sal*I-Fragment einer durch *FRT*-Sequenzen flankierten Neomycin-Selektionskassette aus 'pBSK:FRT-neo-FRT' eingefügt.

4.1.2.3. Klonierung des Zielvektors 'pRG2-floxHDGF:mRFP-Knock-in'

Der 5'-Homologiebereich, bestehend aus genomischen Sequenzen von Intron 1, wurde als ein 4,5 kb *Xho*I/*Cl*aI-Fragment aus dem Ausgangsvektor 'pBSK(-) HDGF 4,5 kb' gewonnen und nach Glättung der Enden in den ebenfalls mit *Xho*I geschnittenen, geglätteten Vektor 'pHWlox1a HDGF 3,3 kb FRT-neo-FRT' kloniert um den Vektor 'pHWlox1a Intron I HDGF 3,3 kb FRT-neo-FRT' zu gewinnen. Das 3,0 kb große *Ssp*I/*Ecl*136II

Fragment aus 'pBSK(-) HDGF 300 bp mRFP 3'UTR', das das Reporter-gen und die 3'-Homologiebereiche beinhaltet, wurde zur endgültigen Herstellung des Targeting-Vektors in die mit dem *Klenow*-Fragment geglättete *NotI*-Schnittstelle des Vektors 'pHWlox1a Intron I HDGF 3,3 kb FRT-neo-FRT' kloniert. Die Struktur des fertiggestellten Austauschvektors 'pRG2-floxHDGF:mRFP-Knock-in' wurde durch ausgewählte Restriktionsspal-tungen überprüft (Daten nicht gezeigt).

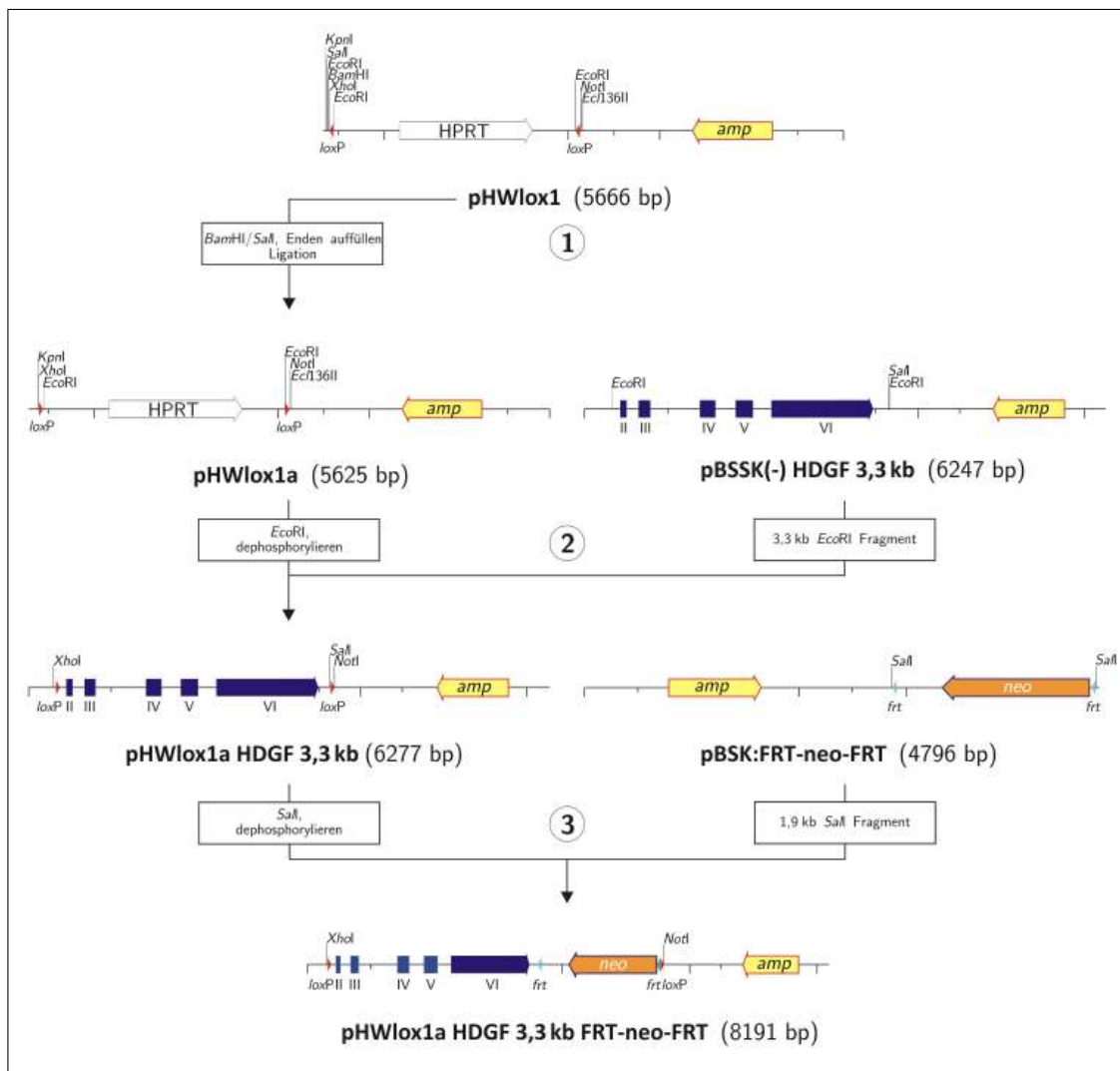


Abb. 4.8.: Klonierungsstrategie des geflochtenen Bereichs und der Selektionskassette. ① Aus dem Vektor 'pHWlox1' wurde im initialen Schritt nach *Bam*HI/*Sal*I-Verdau, Auffüllen der Enden mittels *Klenow*-Fragment und Religation ein modifizierter Vektor 'pHWlox1a' hergestellt, aus dem mit Hilfe eines *Eco*RI-Verdau die sich zwischen den gleichorientierten *loxP*-Sequenzen befindende HPRT-Selektionskassette entfernt wurde. ② Stattdessen wurde zwischen die *loxP*-Sequenzen ein 3,3 kb langes *Eco*RI-Fragment, das den genomischen Bereich von Exon 2 bis Exon 6 des HDGF-Gens umspannt, aus dem Vektor 'pBSK(-) HDGF 3,3 kb' einkloniert. ③ Die durch *frt*-Sequenzen flankierte Neomycin-Selektionskassette wurde als 1,9 kb großes *Sal*I-Fragment aus 'pBSK:FRT-neo-FRT' ausgeschnitten und in die *Sal*I-Schnittstelle des Vektors 'pHWlox1a HDGF 3,3 kb' eingefügt.

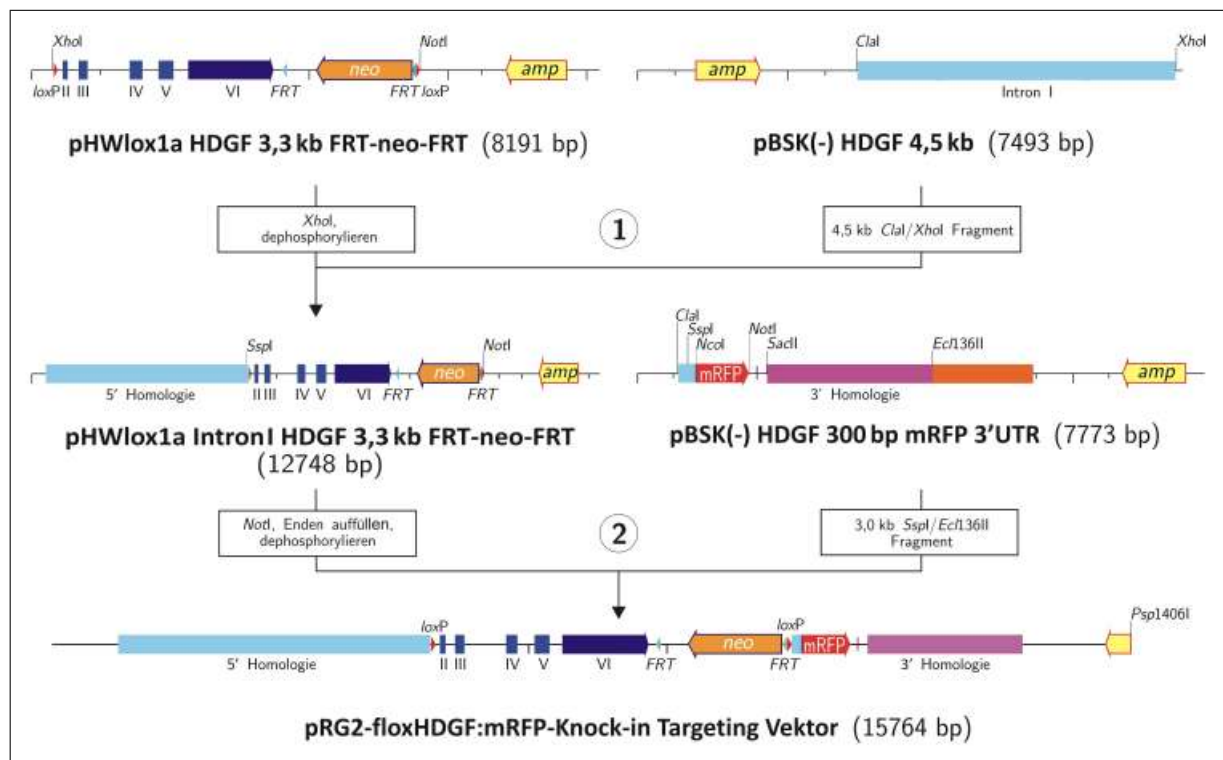


Abb. 4.9.: Klonierungsstrategie des Austauschvektors 'pRG2-floxHDGF:mRFP-Knock-in'. ① Aus dem Vektor 'pBSK(-) HDGF 4,5 kb' wurde durch Restriktionsspaltung ein 4,5 kb *XhoI*/*Clal*-Fragment des 5'-Homologiebereiches isoliert und nach Glättung in den ebenfalls mit *XhoI* geschnittenen, geglätteten Vektor 'pHWlox1a HDGF 3,3 kb FRT-neo-FRT' kloniert. ② Im abschließenden Schritt der Herstellung des Austauschvektors 'pRG2-floxHDGF:mRFP-Knock-in' wurde das mRFP-Reportergen und der 3'-Homologiebereich als 3,0 kb großes *SspI*/*Ecl136II* Fragment aus 'pBSK(-) HDGF 300 bp mRFP 3'UTR' ausgeschnitten und über die mit dem Klenow-Fragment geglättete *NotI*-Schnittstelle in den Vektor 'pHWlox1a Intron I HDGF 3,3 kb FRT-neo-FRT' eingeführt.

4.1.2.4. Überprüfung der Expression von HDGF und mRFP

Zum Nachweis des korrekten Spleißens und zur Überprüfung der funktionalen Expression des HDGF-Proteins im mit *loxP*-Sequenzen flankierten Zustand und des HATH₁₋₃₁-mRFP-Reporterproteins wurde ein Testvektor hergestellt, in dem die zu testenden Genabschnitte hinter das Exon 1 des HDGF-Gens kloniert wurden, das unter Kontrolle eines starken, ubiquitär aktiven CMV-Promotors stand. Abbildung 4.10 A zeigt die Klonierungsstrategie zur Herstellung des Testvektors. Nach transienter Transfektion des Testvektors in HeLa-Zellen wurde die Expression des HDGF-Proteins und des HATH₁₋₃₁-mRFP-Reporterproteins mit geeigneten Detektionsmethoden nachgewiesen. Wie in Abbildung 4.10 B, C zu erkennen, wurde die Expression des HDGF-Proteins durch Insertion der *loxP*-Sequenzen nicht beeinflusst. Nach transienter Transfektion des Testplasmids wurde HDGF von HeLa-Zellen exprimiert und war durchweg nukleär lokalisiert. Auch das

HATH₁₋₃₁-mRFP Fusionsprotein konnte nach simultaner, transientscher Transfektion des Testvektors 'pcDNA3 floxHDGF:mRFP-Knock-in Testvektor' mit 'pCre-Pac' durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.10 C).

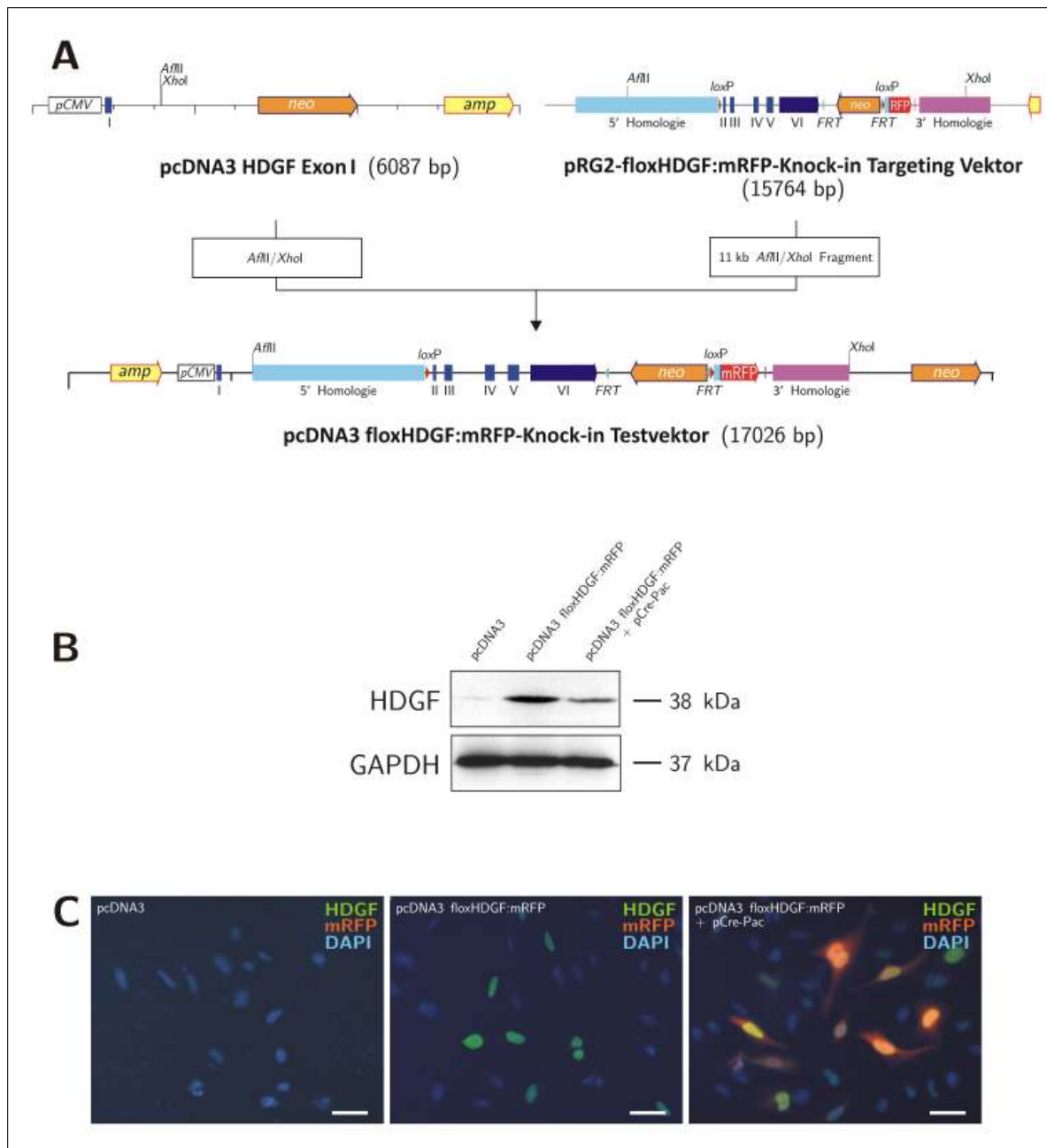


Abb. 4.10.: Funktionsüberprüfung der HDGF- und mRFP-Expression. (A) Klonierung eines Testvektors zur Funktionsüberprüfung von HDGF und der Cre-Rekombinase vermittelten Expression des Fusionsproteins aus dem N-Terminus von HDGF und mRFP. (B) Die Western-Blot-Analyse von HeLa-Zelllysaten nach transientscher Transfektion mit spezifischen Antikörpern gegen HDGF bestätigten die funktionale Expression von HDGF. Die gleichzeitige Expression von Cre-Rekombinase führte zu einer Verringerung des HDGF-Signals. (C) Nach simultaner, transientscher Transfektion des Testvektors und des 'pCre-Pac'-Vektors konnte das Reporterprotein HATH₁₋₃₁-mRFP fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden.

4.2. Erzeugung und Analyse homolog rekombinierter, muriner ES-Zellen

Für die Transfektion durch Elektroporation in HM1-ES-Zellen wurde der Targeting-Vektor 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in' mit Hilfe des Restriktionsenzym *Sall* linearisiert. Nach erfolgter Elektroporation entstanden bei homologer Rekombination solche ES-Zellklone, die aufgrund der Integration des HPRT-Minigen in HAT-supplementiertem Medium überleben. In diesen ES-Zellklonen ist ein Allel genomisch im HDGF-Lokus wie in Abb. 4.11 dargestellt mutiert.

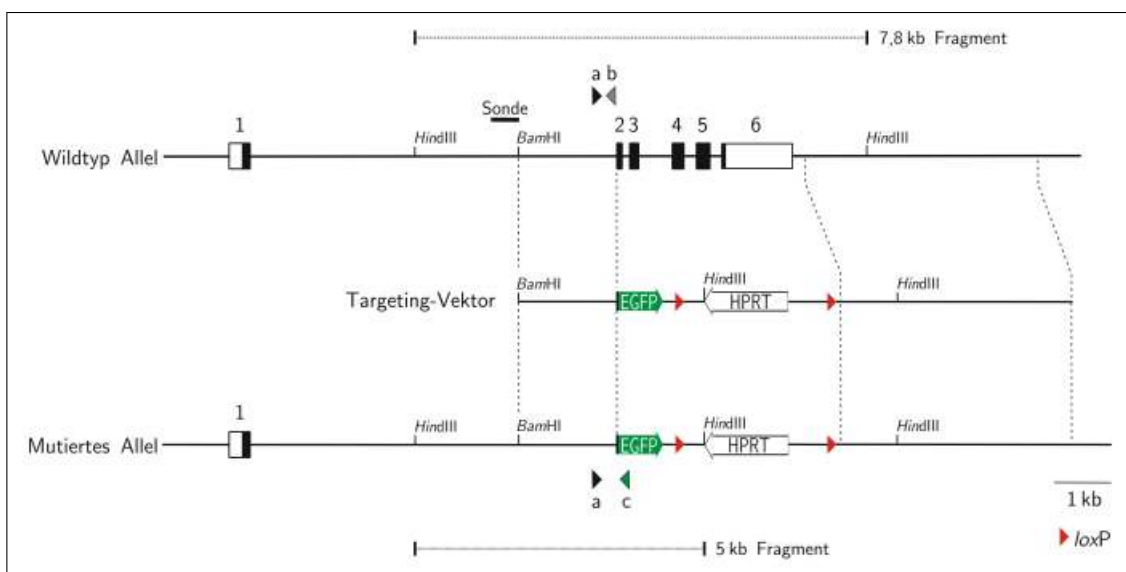


Abb. 4.11.: Schema der homologen Rekombination in den Wildtyp-Lokus des HDGF-Gens von ES-Zellen. Abgebildet sind der HDGF-WT-Lokus, der Austauschvektor pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in und der mutierte HDGF-Lokus nach erfolgreicher homologer Rekombination. Eingezeichnet sind zudem die 5'-Sonde, die zur Durchführung der Southern-Blot Hybridisierung verwendet wurde und die verwendeten Schnittstellen für das Restriktionsenzym *HindIII*. Die Positionen a, b und c sind die der Primer, die jeweils für die Genotypisierung der transgenen HDGF-EGFP-Mäuse verwendet wurden. (Schwarze Boxen stellen kodierende Sequenzen und weiße Boxen nicht kodierende Bereiche des HDGF-Gens dar.)

Zur Charakterisierung homolog rekombinierter ES-Zellklone, die die Selektion durch HAT-Supplement überlebten, wurde DNA isoliert und mittels der bereits etablierten Test-PCR zum Nachweis der homologen Rekombination analysiert (siehe Kap. 4.1.1.4). PCR-positive Klone wurden anschließend mit einer Southern-Blot-Hybridisierung nach Restriktionsspaltung mit *HindIII* untersucht. Dabei liefert die 5'-externe Sonde für das heterozygot vorliegende Wildtyp-Allel ein 7,8 kb Fragment und für das homolog rekombinierte Allel ein 5 kb Fragment (Abb. 4.11). Außerdem wurde die Einfachintegration des Targeting-Vektors durch die Verwendung der externen Sonde, die homolog zu einem

Bereich außerhalb des 5'-Homologiebereichs des HDGF-Gens ist, überprüft. So konnte zudem die Testung unspezifischer, nicht homologer Integrationen in das Genom vermieden werden.

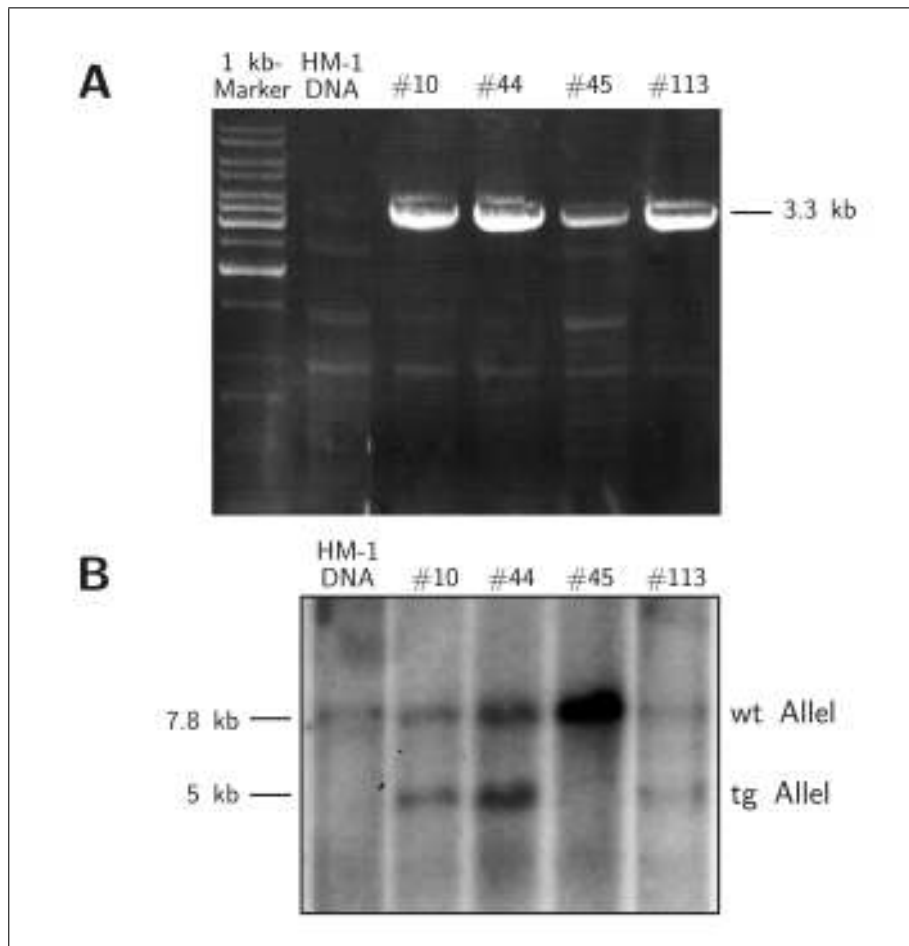


Abb. 4.12.: *Homologe Rekombination des Vektors 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in' in ES-Zellklonen.* (A) Die PCR-Analyse von 4 der 144 isolierten Klone zeigte ein homolog rekombiniertes Allel (Primer #1393 und #1181). (B) Die Southern-Blot-Analyse von *HindIII* geschnittener genomischer DNA mit einer externen Sonde bestätigte die homologe Rekombination in den Klonen 10, 44 und 113 durch das Vorliegen des mutierten Allels (tg) und des Wildtyp-Allels (wt).

Insgesamt wurden 144 ES-Zellklone isoliert, von denen nach PCR-Analyse 4 homolog rekombiniert waren (Abb. 4.12 A), was einer Rekombinationsrate von 2,8% entsprach. Für 3 dieser Klone konnte die homologe Rekombination durch Southern-Blot-Analysen bestätigt werden (Abb. 4.12 B). Klon #45 scheint ein Mischklon zu sein, der bereits im Vergleich zu den anderen untersuchten Klonen nur ein schwach positives Ergebnis bei der PCR-Untersuchung zeigte. Abweichend konnte im Rahmen der Southern-Blot-Analyse nur das Vorliegen des Wildtyp-Allels von 7,8 kb detektiert werden. Um die Expression und

Funktionalität des nach homologer Rekombination gebildeten Fusionsproteins aus dem N-Terminus von HDGF und EGFP zu untersuchen, wurde aus den vier PCR-positiv getesteten ES-Zellklonen mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die anschließende RT-PCR-Analyse mit spezifischen Primern für den N-Terminus von HDGF (#1559) und für EGFP (#1470) zeigte die Expression der HATH₁₋₃₁-EGFP-mRNA in allen vier untersuchten Klonen. Die Expression in Klon #45 war verglichen mit den anderen Klonen niedriger, was das Vorliegen eines Mischklones bestätigt (Abb. 4.13 A). Zur Verifizierung des korrekten Splice-Vorgangs wurde das 246 bp große PCR-Fragment stammend aus der cDNA von Klon #10 *blunt end* in einen mit *EcoRV* geschnittenen 'pBSK(-)'-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Die Auswertung der Sequenzdaten bestätigte das korrekte Splicen im mutierten HDGF-Lokus sowie die richtige Insertion von EGFP in das Leseraster des HDGF-Gens (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass der N-Terminus von HDGF (31 Aminosäuren) die Funktion des EGFP-Reportergens negativ beeinflusst, wurde die kodierende Region des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins mit Hilfe der Primer #1559 und #1296, sowie der cDNA von ES-Zellklon #10 als Matrize amplifiziert. Das 847 bp große Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *SalI* geschnitten und in einen ebenfalls mit *KpnI/SalI* linearisierten 'pcDNA3'-Vektor kloniert. Der aus der Ligation resultierende Vektor 'pcDNA3-HATH₁₋₃₁-EGFP-Knock-in' wurde mit ExGen500 in HeLa-Zellen transient transfiziert. Die EGFP-Fluoreszenz im Zytosol der transfizierten Zellen belegt die Funktionalität des exprimierten HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins (Abb. 4.13 B).

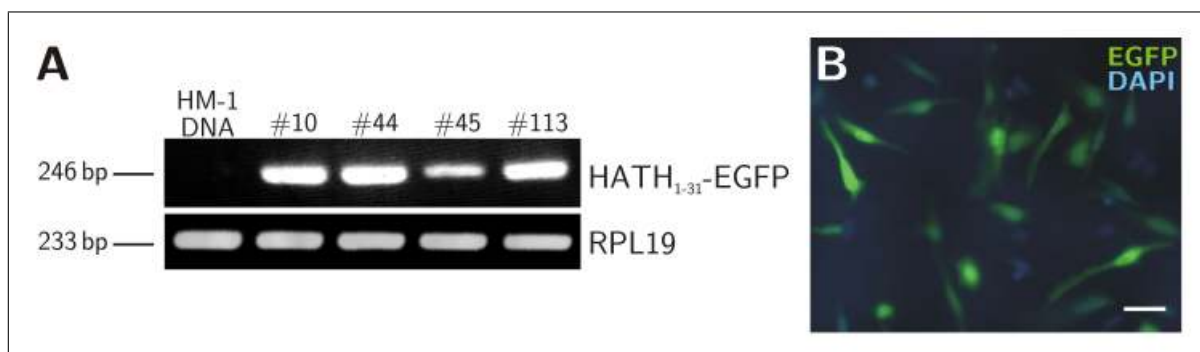


Abb. 4.13.: Überprüfung der Expression von HATH₁₋₃₁-EGFP in ES-Zellklonen. (A) Die RT-PCR-Untersuchung von cDNA aus positiv identifizierten Klonen mit den Primern #1559 und #1470 lieferte ein Amplikon von 246 bp in allen 4 untersuchten Klonen (RPL19 als Kontrolle). (B) Transfektion des Plasmids 'pcDNA3-HATH₁₋₃₁-EGFP-Knock-in' in HeLa-Zellen. Der positive Nachweis der grünen Fluoreszenz im Zytosol der transfizierten HeLa-Zellen bestätigt die Funktionalität des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins.

Daneben ist es wichtig, dass die ES-Zellen ihren normalen Karyotyp von 40 akrozentrischen Chromosomen während der Kulturphase beibehalten. Voraussetzung für die Gewinnung keimbahngängiger Chimären nach Blastozysteninjektion von ES-Zellen ist ein normaler Karyotyp von 40 akrozentrischen Chromosomen. Da mit zunehmender Passagenzahl von ES-Zellen häufig eine verstärkte Aneuploidie auftritt,¹⁶⁶ wurde die

Anzahl vorhandener Chromosomen in den ES-Zellklonen #10 und #44 untersucht. Für beide ES-Zellklone konnte ein Anteil von etwa 70% an Zellen mit vollständig diploidem Chromosomensatz ($n = 40$) gezeigt werden.

4.3. Erzeugung und Zucht von HDGF-defizienten Mäusen

Nachdem drei ES-Zellklone positiv auf homologe Rekombination des Targeting-Vektors 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in' in den HDGF-WT-Lokus getestet waren, wurden aus den ES-Zellklonen #10 und #44 mittels Blastozysteninjektion chimäre Mäuse erzeugt. Die Durchführung der Blastozysteninjektion erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Zimmer und dem Haus für experimentelle Therapie (HET) der Universität Bonn.



Abb. 4.14.: *Chimäre Maus 'GB'*. Gezeigt ist die chimäre Maus 'GB' mit einem Chimärismusgrad von etwa 75%, die aus Sv129P2/OlaHsd HM1-ES-Zellen und C57BL/6-Blastozysten hervorgegangen ist. Die anschließende Verpaarung mit C57BL/6 Weibchen führte zu agoutifarbenen Nachkommen.

Aus fünf Blastozysteninjektionen der beiden Sv129P2/OlaHsd HM1-ES-Zellklone in 50 CD1- und 48 C57BL/6 -Blastozysten resultierten 8 Nachkommen. Von diesen wurden 6 männliche hochchimäre Nachkommen ('GA'-'GF') mit C57BL/6-Hintergrund weiter untersucht (Beispiel siehe Abb. 4.14). Nach dem Erreichen der Geschlechtsreife wurden die Chimären mit C57BL/6 Weibchen verpaart. Alle 6 Chimären zeigten hier eine Keimbahntransmission, die am agoutifarbenen Fell ihrer Nachkommen zu erkennen war. Die Injektion von Sv129P2/OlaHsd HM1-ES-Zellen in C57BL/6-Blastozysten und die anschließende Verpaarung mit C57BL/6 Mäusen führte zu Nachkommen mit einem gemischten

Stammhintergrund, der die Grundlage für alle folgenden Verpaarungen bildete. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden Tiere mit gemischtem Stammhintergrund verwendet. Um Effekte durch einen gemischten Stammhintergrund ausschliessen zu können, wurde parallel die Rückkreuzung auf einen reinen C57BL/6-Hintergrund begonnen.

Die Bestimmung des Genotyps der Nachkommen aus Verpaarungen chimärer Mäuse und allen darauf folgenden Verpaarungen erfolgte mit Hilfe einer Multiplex-PCR (Abb. 4.15 A). Dafür wurden drei Primer verwendet, die homolog zu Sequenzbereichen von Intron 1 der HDGF-Gensequenz (#1814 und #1815, siehe Abb. 4.11 a, b) und einem Sequenzabschnitt des EGFP-Gens (#1816, siehe Abb. 4.11 c) waren. Die PCR resultierte in einem 835 bp Fragment, das spezifisch das mutierte HDGF-Allel anzeigte beziehungsweise einem Amplikon der Größe 554 bp, das dem Wildtyp-Allel entspricht.

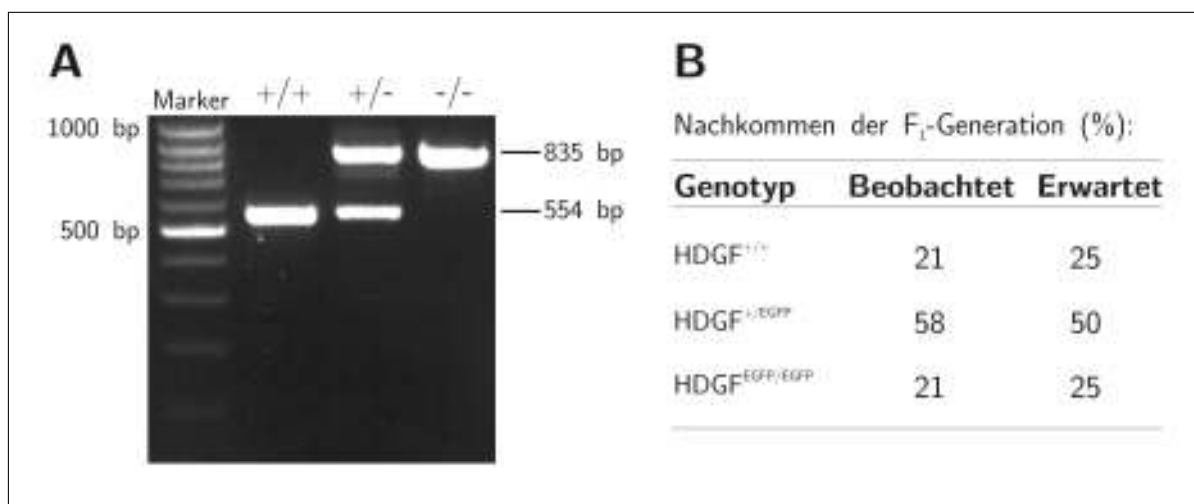


Abb. 4.15.: Bestimmung des Genotyps mittels PCR. (A) Die PCR-Reaktion mit einer Kombination aus drei verschiedenen Primern (#1814, #1815 und #1816) lieferte für das Wildtyp Allel ein Amplifikationsprodukt von 554 bp und für das mutierte HDGF-EGFP Allel ein Amplikon von 835 bp. (B) Die Genotypen von 117 untersuchten Nachkommen der F₁-Generation entsprachen den Mendelschen Regeln. +/+ = HDGF^{+/+}, +/- = HDGF^{+EGFP}, -/- = HDGF^{EGFP/EGFP}

Zur Überprüfung der Multiplex-PCR-Analyse wurde zudem genomische DNA aus der Leber von Mäusen aller drei möglichen Genotypen isoliert. Für die Southern-Blot-Analyse wurden 10 µg DNA mit dem Restriktionsenzym *Hind*III gespalten und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit der externen 5'-Sonde hybridisiert. Die Ergebnisse des Southern-Blots bestätigten die Spezifität der Genotypisierungs-PCR und damit den erfolgreichen Knock-out des HDGF-Lokus (Abb. 4.16).

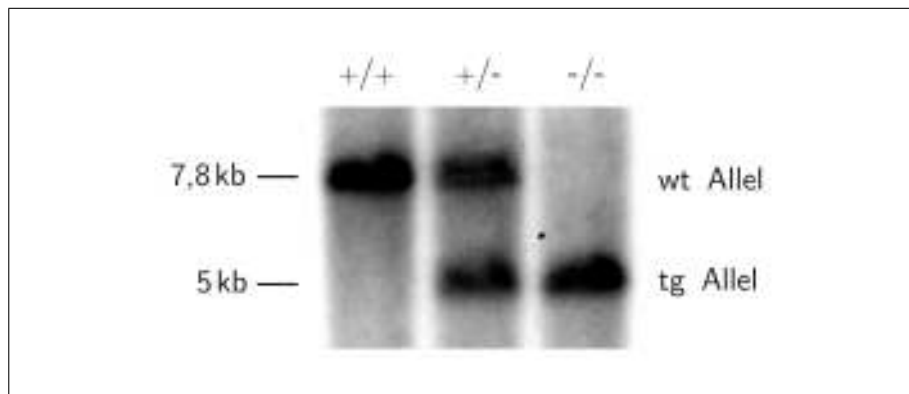


Abb. 4.16.: *Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA aus Leber.* Genomische DNA wurde aus der Leber von Nachkommen der chimären Mäuse isoliert. Nach Restriktionsspaltung mit *HindIII* wurde eine Southern-Blot-Analyse mit der externen 5'-Sonde aus der Untersuchung der ES-Zellklone durchgeführt. +/+ = HDGF^{+/+}, +/- = HDGF^{+/-EGFP}, -/- = HDGF^{EGFP/EGFP}.

4.4. Expressionsanalysen an Mäusen mit mutiertem HDGF-Allel

4.4.1. Nachweis der fehlenden Expression der HDGF-mRNA

Zunächst wurde die Expression von HDGF und EGFP in Mäusen verschiedener Genotypen auf RNA-Ebene mittels Northern-Blot-Hybridisierung kontrolliert um die erfolgreiche homologe Rekombination des HDGF-Genlokus zu bestätigen (Abb. 4.17). Die dafür eingesetzten Sonden waren komplementär zur kodierenden Sequenz von EGFP und zur nonHATH-Region der HDGF-mRNA, die nach homologer Rekombination durch die kodierende Sequenz von EGFP ersetzt sein sollte. In homozygoten HDGF-EGFP-Knock-in Mäusen sollte demnach mit der nonHATH-Sonde kein Signal im Northern-Blot zu erkennen sein. Wildtyp-Mäuse und solche, die ein heterozygot mutiertes HDGF-Allel tragen, sollten hingegen eine Bande bei 2,2 kb aufweisen. Umgekehrt sollten heterozygote und homozygote HDGF-EGFP-Knock-in Tiere ein positives Signal mit der EGFP-Sonde zeigen. Zur Analyse wurde die Gesamt-RNA aus Gehirnen adulter Mäusen isoliert und die gleichmäßige Beladung des Agarosegels durch Färbung mit Ethidiumbromid sichergestellt. Wie in Abb. 4.17 zu erkennen, konnte sowohl in Wildtyp-Mäusen, als auch in heterozygoten Mäusen die HDGF-Sonde an komplementäre Sequenzen der RNA hybridisieren, während diese Sequenzen in der RNA von Mäusen mit zwei mutierten HDGF-Allelen nicht vorhanden waren. Eine Abschwächung des Signals in heterozygoten Mäusen lässt keine Erhöhung der HDGF-Promotoraktivität des verbliebenen HDGF-Allels erwarten.

Hybridisierungen mit der EGFP-Sonde zeigten wie zu erwarten ein positives Signal in heterozygoten und homozygoten HDGF-EGFP-Knock-in Tieren, wohingegen EGFP in Wildtyp-Tieren nicht vorhanden war.

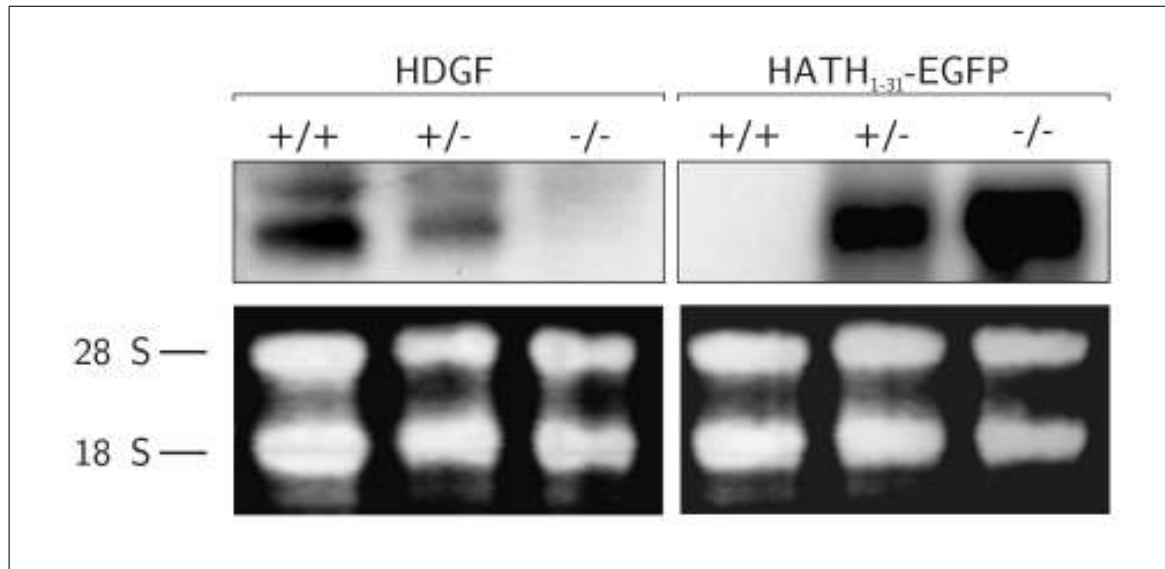


Abb. 4.17.: Northern-Blot-Analyse von HDGF- und HATH₁₋₃₁-EGFP-mRNA. 35 µg Gesamt-RNA aus dem Gehirn adulter Mäuser wurde in einem Formaldehyd/1% Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit radioaktiv markierten Sonden homolog zum nonHATH-Bereich von HDGF und zur kodierenden Sequenz von EGFP hybridisiert. Die Äquivalenz der aufgetragenen RNA-Menge wurde durch eine Färbung mit Ethidiumbromid sichergestellt. +/+ = HDGF^{+/+}, +/- = HDGF^{+EGFP}, -/- = HDGF^{EGFP/EGFP}

Darüberhinaus wurde die Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Expression von HDGF und des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins auf Proteinebene genutzt. Dazu wurde aus dem Gehirn adulter Tiere der verschiedenen Genotypen Gesamt-Protein isoliert. Äquivalente Mengen an Gehirnprotein wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen transferiert und mit einem polyklonalen anti-HDGF-Antikörper und einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper inkubiert. Die Western-Blot-Analyse bestätigte das Ergebnis der Northern-Blot-Analyse. HDGF konnte als prominente Bande bei 38 kDa in Wildtyp-Tieren und in um circa die Hälfte reduzierter Intensität in heterozygoten HDGF-EGFP-Knock-in Tieren nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde das HATH₁₋₃₁-EGFP-Reporterprotein nur in heterozygoten und homozygoten HDGF-defizienten Mäusen exprimiert. Die Expressionsstärke des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins und von HDGF auf mRNA- und Proteinebene in den verschiedenen Genotypen deutet auf keine Regulation der HDGF-Promotoraktivität durch den HDGF-EGFP-Knock-in hin (Abb. 4.18).

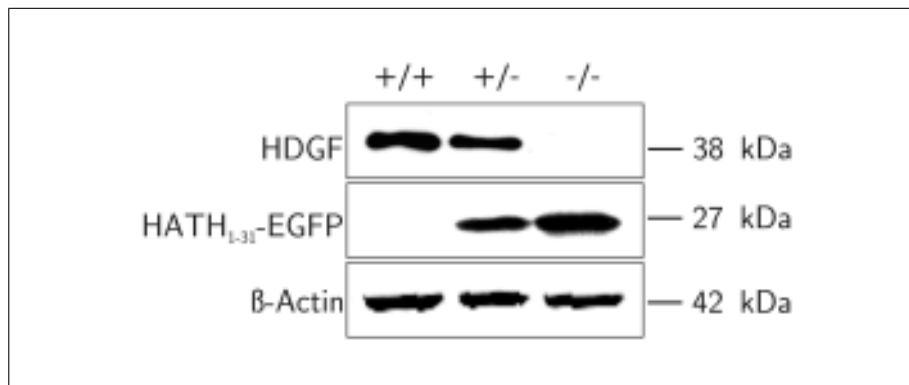


Abb. 4.18.: Western-Blot-Analyse von HDGF und HATH₁₋₃₁-EGFP in Gehirnllysaten. Die Gehirne adulter Mäuse wurden zunächst in RIPA-Lysepuffer lysiert. Anschließend wurden 30 µg des Gesamt-Lysats durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Visualisierung erfolgte durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen HDGF und EGFP mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL) und Autographie. β-Actin diente als Ladekontrolle. +/+ = HDGF^{+/+}, +/- = HDGF^{+/-}, -/- = HDGF^{-/-}

4.4.2. EGFP-Reporteranalysen in HDGF-EGFP-Knock-in Tieren

Da der verwendete Targeting-Vektor ein EGFP-Reporter gen enthält, kann die Expression des Reporterproteins dazu genutzt werden, Daten über die zeitliche und örtliche Expression des HDGF-Gens in verschiedenen Geweben der Maus zu erhalten. Zellen, die normalerweise HDGF exprimieren, sollten in Mäusen, die mindestens ein mutiertes HDGF-Allel tragen, anstelle des HDGF-Proteins ein Fusionsprotein aus dem N-Terminus von HDGF (31 Aminosäuren) und dem EGFP-Reporterprotein exprimieren. Wie bereits gezeigt, wurden die Fluoreszenzeigenschaften von EGFP durch den veränderten N-Terminus nicht beeinflusst. Northern- und Western-Blot-Analysen bestätigten die organisch übereinstimmende Expression des HATH₁₋₃₁-EGFP Reporterproteins mit dem HDGF-Protein.

4.4.2.1. Expression des HATH₁₋₃₁-EGFP-Reporterproteins in verschiedenen Geweben

Für die Analyse der Fluoreszenz des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins wurden Organe adulter Mäuse der unterschiedlichen Genotypen und Embryonen des Entwicklungsstages E 12,5 einer Verpaarung heterozygoter Mäuse an einem Epifluoreszenz-Mikroskop untersucht. In heterozygoten und homozygoten HDGF-EGFP-Knock-in Geweben konnte ein deutliches EGFP-Signal detektiert werden. Wildtyp-Gewebe zeigte abhängig vom untersuchten Organ, vor allem bei stark Blut enthaltenden Organen wie Herz und Milz,

eine schwache, unspezifische Hintergrundfluoreszenz. Embryonen des Entwicklungstages E 12,5 zeigten eine ubiquitäre Expression des HATH₁₋₃₁-EGFP-Repoterproteins (Abb. 4.19 A). Makroskopisch waren jedoch keine morphologischen Auffälligkeiten im Vergleich zu Wildtyp E 12,5 Embryonen zu erkennen. Eine starke EGFP-Fluoreszenz war außerdem im Gehirn (Abb. 4.19 B) und Hoden (Abb. 4.19 C), sowie in Uterus, Dickdarm, Milz und Thymus adulter Tiere vorhanden (Daten nicht gezeigt). Die Analyse von Niere, Leber, Lunge und Herz ergab lediglich eine schwache EGFP-Fluoreszenz in homozygoten HDGF-EGFP-Knock-in Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren (Daten nicht gezeigt).

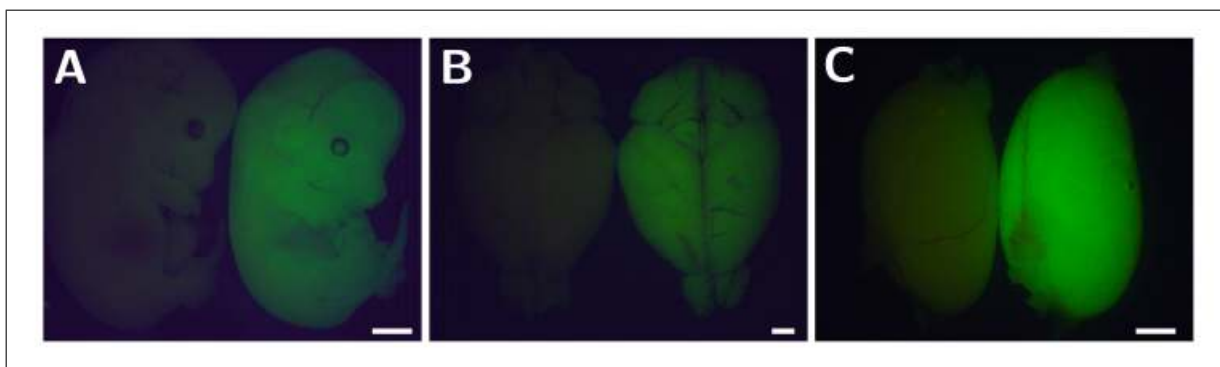


Abb. 4.19.: Expression von HATH₁₋₃₁-EGFP in HDGF-defizienten Mäusen. Die Untersuchung des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins mit Epifluoreszenzmikroskopie zeigt eine kräftige EGFP-Fluoreszenz in Embryonen des Embryonalaltages E 12,5 (A), im Gehirn (B) und Hoden (C) adulter HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäuse. Als Kontrollen dienten entsprechende HDGF^{+/+} Embryonen und Organe. (Maßstab: 1 mm)

4.4.2.2. Expression von HDGF in lymphatischen Geweben

Die Expression von HDGF wurde in der Milz adulter Mäuse mit Northern- und Western-Blot-Analysen beschrieben.^{21,29} Übereinstimmend konnte auch das HATH₁₋₃₁-EGFP-Reporterprotein durch Epifluoreszenzmikroskopie in der Milz HDGF-defizienter Mäuse detektiert werden. Darüber hinaus wurde ein positives EGFP-Signal im Thymus adulter HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäuse nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Ausgehend von diesen Daten wurde die Expression von HDGF und des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins in lymphatischen Geweben adulter Mäuse mit einer Western-Blot-Analyse untersucht. Wie in Abb. 4.20 zu erkennen ist, wird HDGF in Knochenmark, Milz und Thymus von Wildtyp-Tieren als dominantes Polypeptid von 38 kDa exprimiert. Auffallend war zudem die Detektion eines 40 kDa großen Proteins in Milz und Thymus. Die Expression des HATH₁₋₃₁-EGFP-Reporterproteins konnte in den entsprechenden Geweben von HDGF^{EGFP/EGFP} Tieren beobachtet werden.

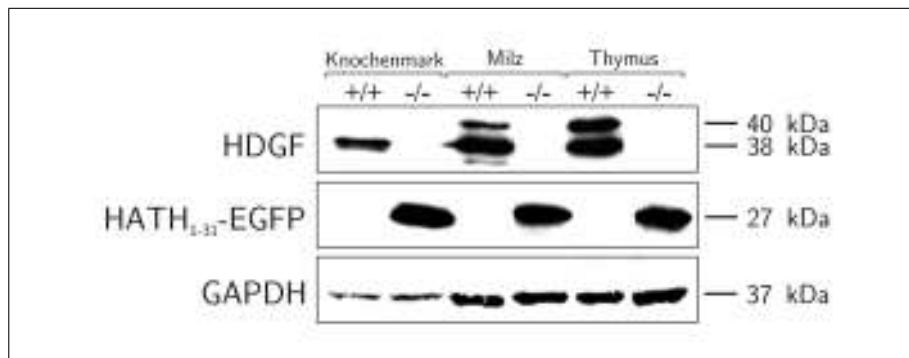


Abb. 4.20.: Western-Blot-Analyse von Organen und Geweben des Immunsystems. Milz, Thymus und Knochenmark aus dem Femur adulter Mäuse wurden mit RIPA-Lysepuffer lysiert. 30 µg der Gesamt-Lysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen HDGF und EGFP erfolgte die Visualisierung durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL) und Autographie. GAPDH diente als Ladekontrolle und wurde nach Inkubation mit einem fluorophormarkierten Sekundärantikörper an einem Odyssey Laserscanner detektiert. +/+ = HDGF^{+/+}, -/- = HDGF^{EGFP/EGFP}

Eine Lokalisation von HDGF in der Milz wurde bisher noch nicht beschrieben, aber die Analyse der EGFP-Fluoreszenz läßt eine Expression in der weißen Pulpa der Milz vermuten (Abb. 4.21 A). Eine Immunfluoreszenz-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen HDGF bestätigte letztendlich die Lokalisation von HDGF in Arealen der weißen Pulpa. Darüber hinaus konnte HDGF, wenn auch weniger ausgeprägt, in der roten Pulpa und der Milzkapsel nachgewiesen werden (Abb. 4.21 B). Im Vergleich dazu wurde keine spezifische Färbung an Milzgewebe HDGF-defizienter Tiere nachgewiesen (Abb. 4.21 C).

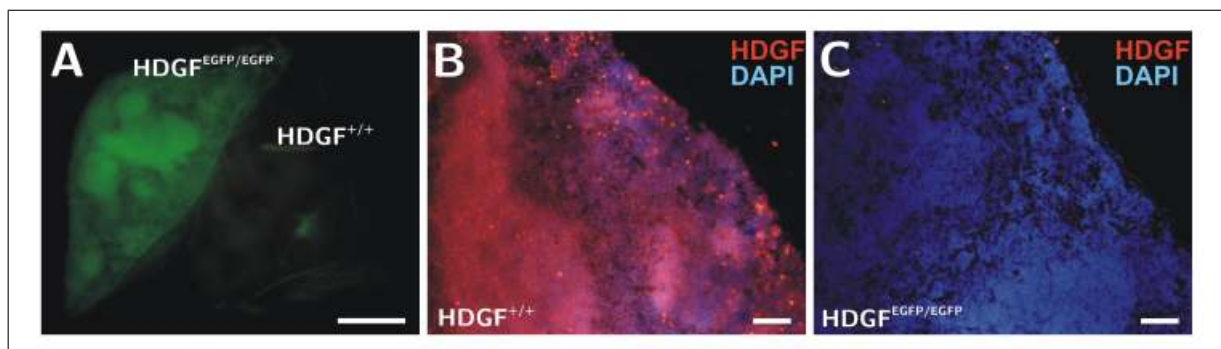


Abb. 4.21.: Expression von HDGF und HATH₁₋₃₁-EGFP in lymphatischen Organen. (A) Epifluoreszenzmikroskopische Analyse eines Querschnittes der Milz. Adulte HDGF^{EGFP/EGFP} Tiere zeigen ein intensives EGFP-Signal in distinkten Arealen der Milz. (Maßstab: 1 mm) (B) Immunfluoreszenz-Analyse von HDGF in der Milz adulter Wildtyp-Mäuse. Sagittale Kryoschnitte wurden mit anti-HDGF-Antikörpern inkubiert, gebundene Antikörper mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (rot) und Zellkerne mit DAPI angefärbt (blau). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Wildtyp-Gewebe ergab eine intensive Färbung von Arealen der weißen Pulpa und der Kapsel. (C) Gewebe von HDGF^{EGFP/EGFP} Tieren zeigte keine spezifische Färbung. (Maßstab: 100 µm)

Da in der weißen Pulpa unter anderem T-Lymphozyten lokalisiert sind, wurde zunächst mit Hilfe einer FACS-Analyse untersucht, ob es sich bei den HDGF-positiven Zellen in den Arealen der weißen Pulpa um T-Lymphozyten handelt.

Dazu wurden periphere T-Lymphozyten aus Schwanzvenenblut 4 Wochen alter Mäuse mit fluorophormarkierten Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 inkubiert und mittels FACS-Analyse untersucht. Wie in Abb. 4.22 erkennbar, wurde das HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsprotein in peripheren CD3⁺ T-Lymphozyten von HDGF^{EGFP/EGFP} Tieren exprimiert. In Analogie konnte die Expression des HATH₁₋₃₁-EGFP-Reporterproteins in CD4⁺- und CD8⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

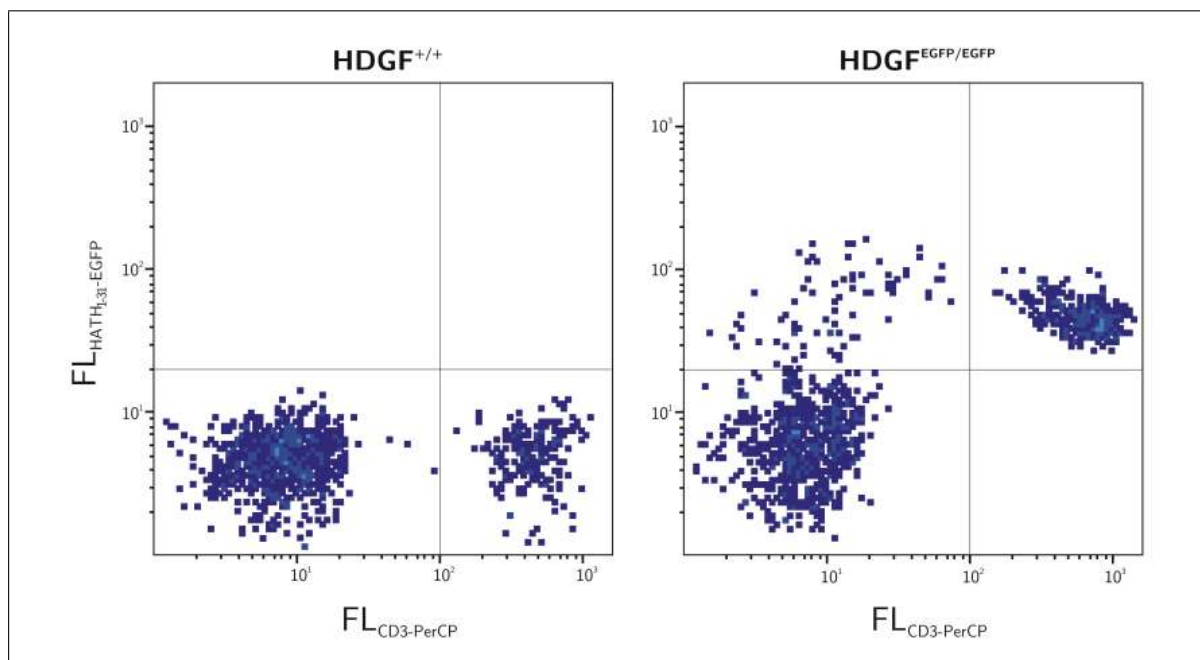


Abb. 4.22.: FACS-Analyse von peripheren T-Lymphozyten in Vollblut. Das Schwanzvenenblut 4 Wochen alter Tiere wurde nach Lyse der Erythrozyten mit spezifischen fluorophor-markierten anti-CD3-Antikörpern inkubiert und an einem BD FACS Canto Durchflusszytometer vermessen. CD3⁺ T-Lymphozyten aus dem Vollblut von HDGF^{EGFP/EGFP}-Tieren exprimierten das HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsprotein. FL_{HATH₁₋₃₁-EGFP} = relative Fluoreszenzintensität des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins; FL_{CD3-PerCP} = relative Fluoreszenzintensität CD3-positiver T-Lymphozyten.

Zur Überprüfung eines Effektes der HDGF-Defizienz auf die Subpopulationen von CD3⁺-T-Lymphozyten, wurden die Anteile an CD4⁺- und CD8⁺-positiven T-Lymphozyten quantitativ bestimmt. Die relativen Anteile der CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen an den CD3⁺ T-Lymphozyten waren in den untersuchten HDGF-EGFP-Knock-in-Mäusen gering, wenn auch signifikant verändert (Abb. 4.23 A, $p = 0,004$). Konsequenterweise war, wie in Abb. 4.23 B erkennbar, das CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis in den HDGF^{EGFP/EGFP} signifikant erhöht ($p = 0,003$).

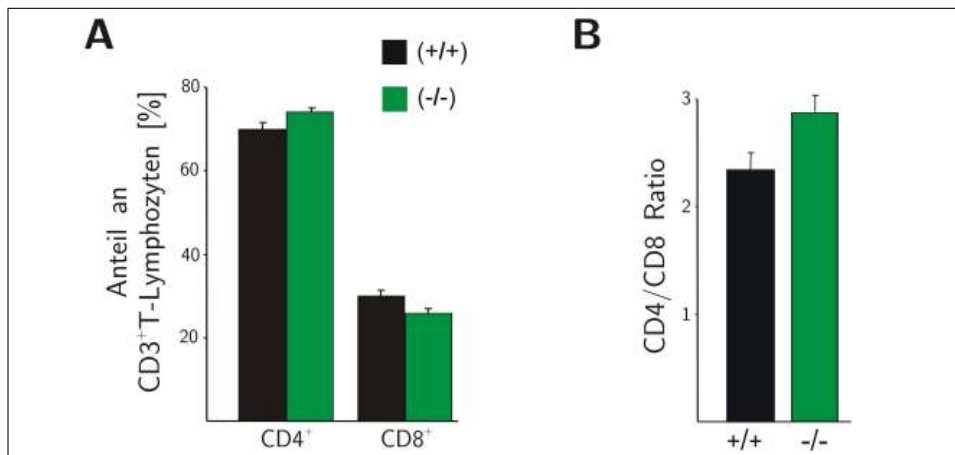


Abb. 4.23.: Untersuchung der Subpopulationen der CD3⁺ T-Lymphozyten. (A) Die relativen Anteile von CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen an CD3⁺ T-Lymphozyten waren in HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen signifikant verändert ($p = 0,004$). (B) Das CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis war in HDGF^{EGFP/EGFP} Tieren signifikant erhöht ($p = 0,003$). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD von jeweils 4 Tieren pro Genotyp angegeben.

4.4.2.3. Expression von HDGF und HATH₁₋₃₁-EGFP im Auge adulter Mäuse

Bei der Untersuchung verschiedener Organe und Gewebe mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie zeigten die Augen von HDGF^{EGFP/EGFP} Tieren eine starke EGFP-Fluoreszenz, während in Augen von Wildtyp-Kontrolltieren keine Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.24 A).

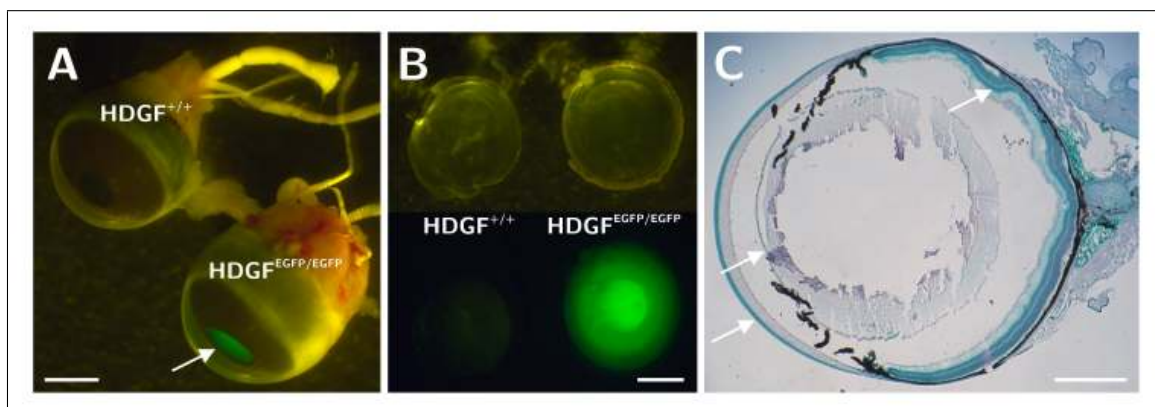


Abb. 4.24.: Expression von HDGF und HATH₁₋₃₁-EGFP im Auge. (A) Die epifluoreszenzmikroskopische Analyse des Auges adulter HDGF^{EGFP/EGFP} Tiere zeigt ein stark positives EGFP-Signal. (B) Eine intensive Expression des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins konnte zudem durch Epifluoreszenzuntersuchung der Linsen von HDGF^{EGFP/EGFP} Tieren nachgewiesen werden. (C) Immunhistochemische Detektion von HDGF im Auge adulter HDGF^{+/+}-Mäuse. Sagittale Kryoschnitte des Auges wurden nacheinander mit anti-HDGF-Antikörpern, Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörpern sowie ABC-Lösung inkubiert und abschließend mit Histogreen angefärbt. Die Pfeile deuten auf die HDGF-positiven Signale in der Cornea, dem Linsenepithel und der Retina. (Maßstab: 1 mm)

Im Laufe der nachfolgenden Präparation der Augen konkretisierte sich die Lokalisation der EGFP-Fluoreszenz auf die Linse (Abb. 4.24 B) und die Retina (Daten nicht gezeigt). Zur Verifizierung der bislang nicht beschriebenen Expression von HDGF im Auge wurde eine immunhistochemische Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen HDGF durchgeführt. Wie in Abb. 4.24 C zu erkennen ist, wird HDGF stark in der Cornea und der Retina exprimiert. Die Expression in der Linse ist vornehmlich im Linsenepithel zu erkennen. In Gefrierschnitten von Augen HDGF-defizienter Tiere konnte keine spezifische Färbung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Aufklärung der genauen zellulären Lokalisation von HDGF im Auge wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse von Gefrierschnitten mit spezifischen Antikörpern gegen HDGF durchgeführt.

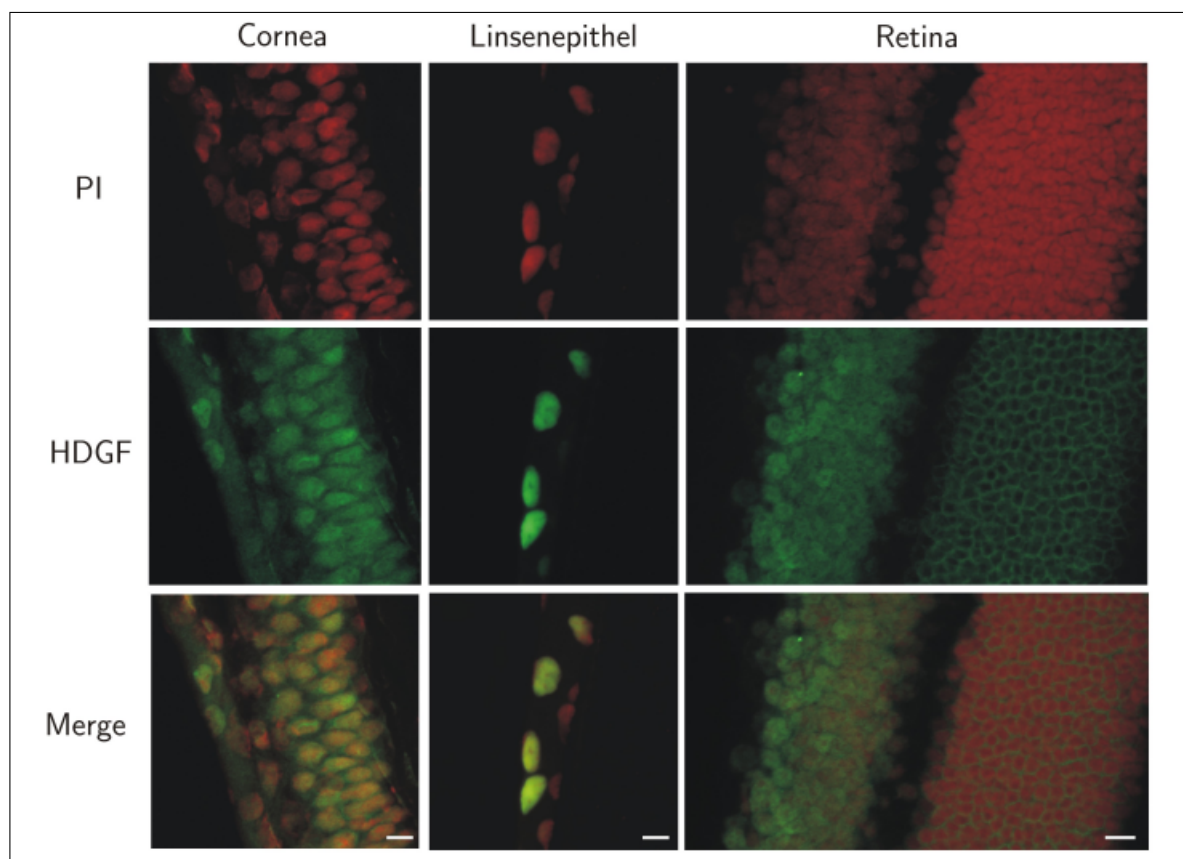


Abb. 4.25.: *Subzelluläre Lokalisation von HDGF im Auge.* (A) Immunfluoreszenz-Analyse von HDGF im Auge adulter HDGF^{+/+}-Mäuse. Sagitale Kryoschnitte wurden mit anti-HDGF-Antikörper inkubiert und gebundene Antikörper mit einem Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper (grün) visualisiert. Die nukleäre Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Propidiumjodid (PI)(rot) wobei die Überlagerung beider Farbkanäle die Kolokalisation durch gelb-orange Färbung anzeigt. Die Untersuchung am Konfokalmikroskop ergab eine nukleäre und zytosolische Expression von HDGF in Epithelzellen der Cornea. Während das Linsenepithel und die innere Körnerzellschicht der Retina eine streng nukleäre Lokalisation zeigt, wurde HDGF zudem extranukleär im Zytosol von Zellen der äußeren Körnerzellschicht der Retina exprimiert. (Maßstab: 10 µm)

Die Analyse der mit Propidiumjodid gefärbten Schnitte bestätigte die Expression von HDGF in der Cornea, dem Linsenepithel und der Retina (Abb. 4.25). In der Cornea konnte HDGF in der Epithelschicht nachgewiesen werden. HDGF zeigte hier eine nukleäre und zytosolische Lokalisation. Im Gegensatz dazu war HDGF im Linsenepithel streng nukleär lokalisiert. Während HDGF in der inneren Körnerzellschicht der Retina ebenfalls streng nukleär lokalisiert war, konnte in der äußeren Körnerzellschicht eine zytoplasmatische Lokalisation von HDGF beobachtet werden.

4.5. Charakterisierung HDGF-defizienter Mäuse

4.5.1. Der Verlust von HDGF ist nicht embryonal-letal

Um zu klären inwieweit die HDGF-Defizienz zu einem embryonal-letalen Phänotyp führt, wurden heterozygote Nachkommen miteinander verpaart. In der F₁-Generation entsprachen die einzelnen Genotypen von 117 Nachkommen den Erwartungswerten der Mendelschen Regeln (Abb. 4.15 B).

HDGF-defiziente Tiere waren über einen Beobachtungszeitraum von zwei Jahren lebensfähig und zeigten keine erhöhte Sterberate im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren. Sowohl weibliche als auch männliche HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäuse waren fertil; die Verteilung der Geschlechter betrug erwartungsgemäß je 50%.

4.5.2. HDGF-defiziente Tiere zeigen eine normale Entwicklung

Erste Untersuchungen von HDGF-defizienten Mäusen ließen keine offensichtlichen, morphologischen Veränderungen oder Verhaltensauffälligkeiten erkennen. Während der frühen postnatalen Entwicklung waren HDGF-defiziente Neugeborene nicht von Wildtyp-Geschwistern zu unterscheiden.

Zur Überprüfung inwieweit HDGF einen Einfluss auf die Entwicklung neugeborener Tiere ausübt, wurden die Körpergewichte von Wildtyp- und HDGF-EGFP-Knock-in-Tieren nach der Abstillphase in Woche 2 über einen Zeitraum von 5 Wochen bestimmt. Die untersuchten Mäuse beider Genotypen zeigten dabei eine identische Gewichtszunahme (Abb. 4.26). Auch nach 6 Monaten war das mittlere Körpergewicht gleich (Daten nicht gezeigt).

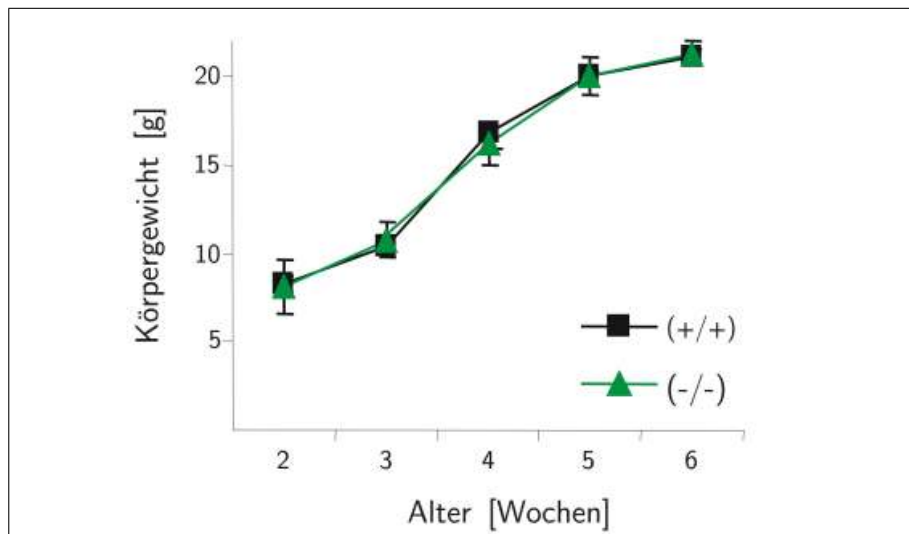


Abb. 4.26.: Normales Wachstum HDGF-defizienter Mäuse. Die Körpergewichte männlicher Wildtyp-Tiere ($n = 6$) und von HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen ($n = 9$) wurden wöchentlich nach dem Abstillen (Woche 2) bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. +/+ = HDGF^{+/+}; -/- = HDGF^{EGFP/EGFP}

4.5.3. Die HDGF-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Organogenese

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Deletion von HDGF keinen Einfluss auf die morphologische Entwicklung der Maus hat, folgte in Zusammenarbeit mit Prof. Hartmann, Anatomisches Institut der Universität Bonn, die histologische Untersuchung von Organen, in deren Entwicklung HDGF eine mögliche Funktion zugeschrieben wird. Dafür wurden Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Darm, Milz und weitere Organe von Embryonen des Entwicklungstages E 16,5 und adulten Mäusen, jeweils von Wildtyp- und HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen, verglichen. Die Analyse der untersuchten Gewebe von Embryonen des Entwicklungstages E 16,5 zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen (Untersuchung von Prof. Hartmann, Daten nicht gezeigt). In Abb. 4.27 sind Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Toluidinblau von Herz, Leber, Darm und Milz beider Genotypen dargestellt. Es konnte kein Unterschied in der Morphologie und der zellulären Architektur der untersuchten Gewebe erkannt werden. Pathologisch auffällige Veränderungen wurden nicht festgestellt.

Für LEDGF, ein Mitglied der HDGF-Proteinfamilie, konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung zu Anomalitäten des Skelettaufbaus in neugeborenen und adulten LEDGF-defizienten Mäusen führt.¹⁶⁷ Um zu klären ob HDGF ebenfalls einen Effekt auf die Skelettentwicklung ausübt, wurden neugeborene Mäuse und solche des Entwicklungstages P 10 zur spezifischen Darstellung von Knochen- und Knorpelgewebe mit Alizarinrot und Alcianblau gefärbt.

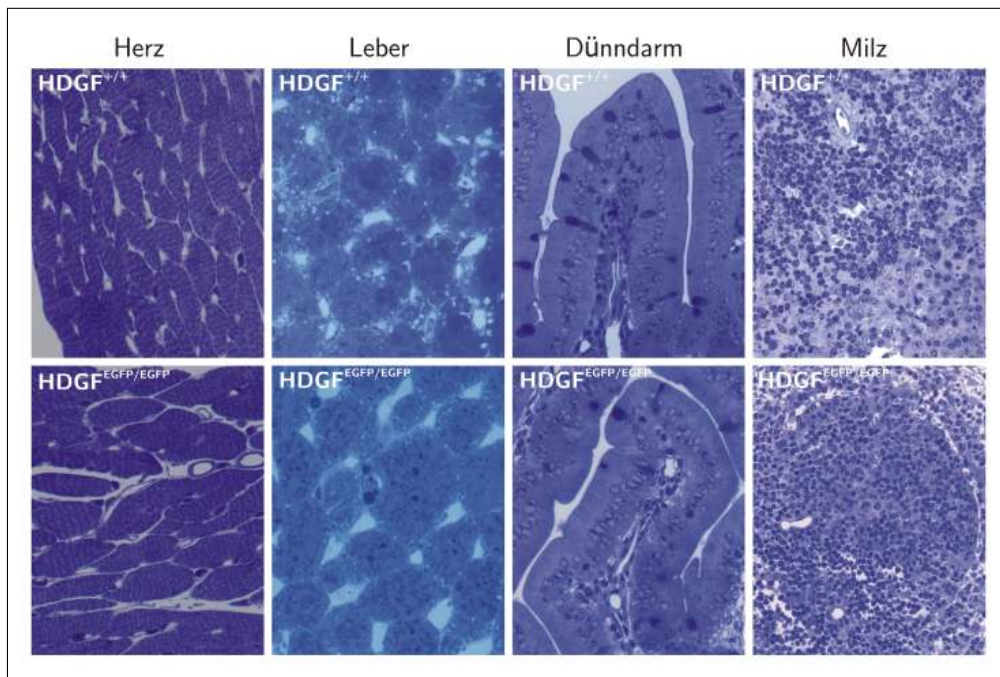


Abb. 4.27.: *Histologische Analyse ausgewählter Gewebe.* Die lichtmikroskopische Untersuchung von HE- und Toluidinblau-gefärbten Semidünnschnitten HDGF-exprimierender Gewebe gab keinen Hinweis auf pathologische Veränderungen in HDGF-EGFP-Knock-in Mäusen. Die histologische Analyse erfolgte in Kooperation mit Prof. Hartmann, Anatomisches Institut der Universität Bonn.

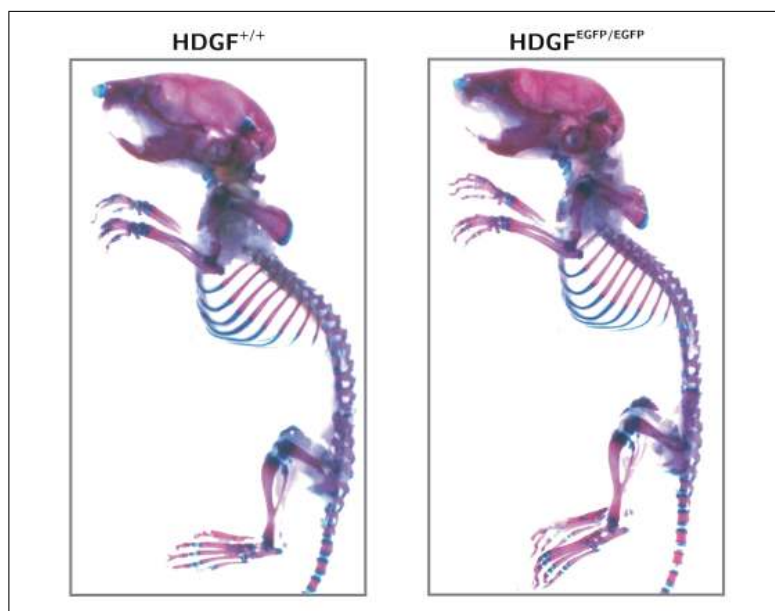


Abb. 4.28.: *Alizarinrot-Alcianblau-Skelettfärbung.* Die Knochen- und Knorpelgewebe von Mäusen des Entwicklungstages P 10 wurden mit Alizarinrot- und Alcianblau-Färbelösung gefärbt. Die Skelette von HDGF-EGFP-Knock-in Tieren wiesen keine Defekte im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf.

Dabei konnten keine Auffälligkeiten im kraniofazialen Bereich und im Skelettaufbau von Neugeborenen Wildtyp- und HDGF-EGFP-Knock-in Tieren festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Skelette von P 10 Tieren beider Genotypen wiesen identische Dimensionen des Brustkorbs auf und waren komplett entwickelt (Abb. 4.28). Morphologisch auffällige Defekte bedingt durch eine HDGF-Defizienz wurden nicht beobachtet.

HDGF zeigt eine ausgeprägte Expression in distinkten Arealen des Cerebellums und des Cerebrums und wird darüber hinaus als neurotropher Faktor beschrieben.^{29,30,73} Daher wurden die Gehirne von Wildtyp- und HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen im Detail analysiert.

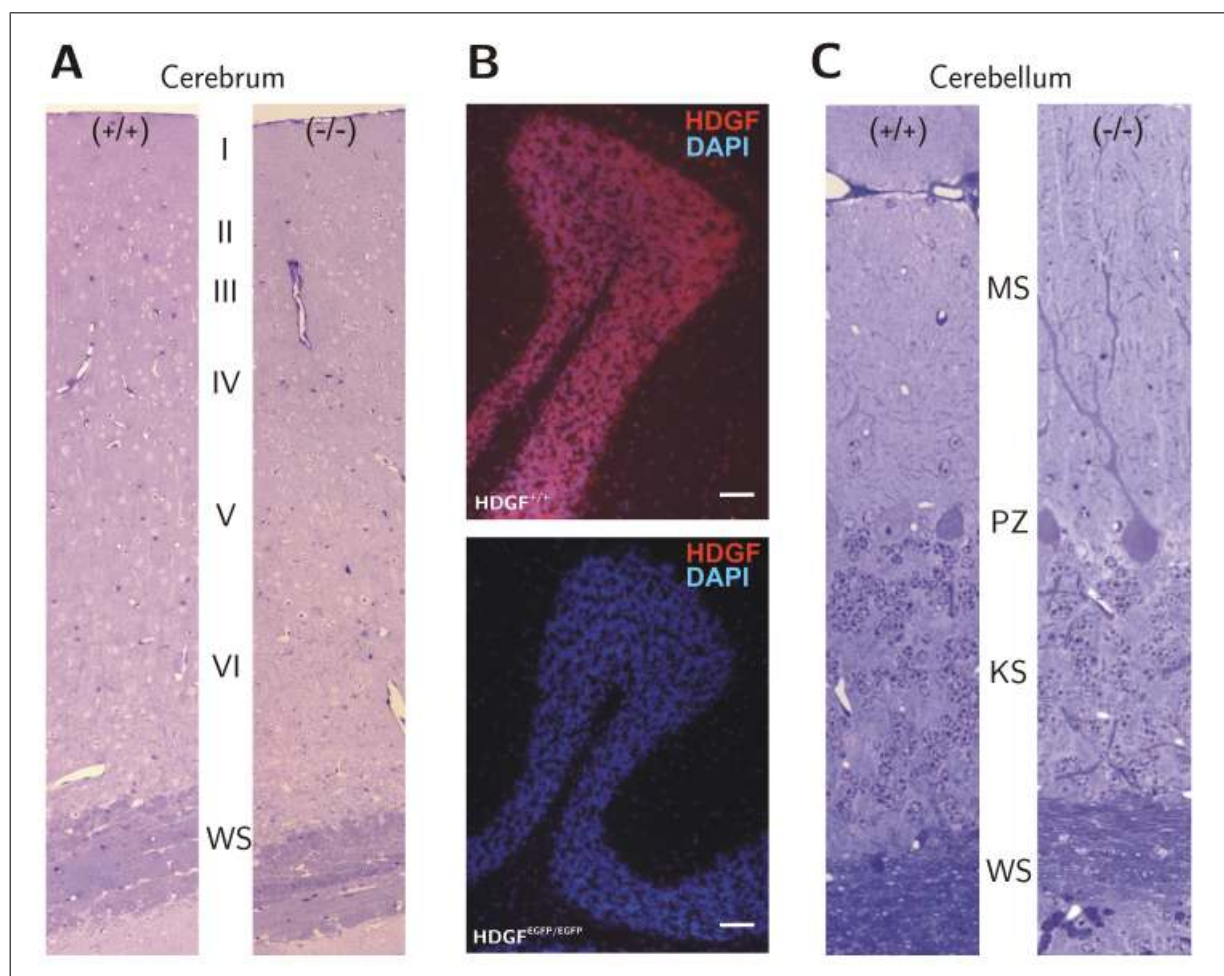


Abb. 4.29.: Mikroskopische Analyse von Gehirnstrukturen. (A) Die HDGF-Defizienz führt zu keinen strukturellen Veränderungen innerhalb der Mikroarchitektur der sechs Schichten des Cortex von HDGF-EGFP-Knock-in Tieren im Vergleich zum Wildtyp. I = Molekularschicht, II = externe Granuläre Schicht, III = externe Pyramidale Schicht, IV = interne Granuläre Schicht, V = interne Pyramidale Schicht, VI = Multiforme Schicht, WS = Weiße Substanz. (B) Die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Kryoschnitten mit anti-HDGF-Antikörpern bestätigt die vollständige Defizienz von HDGF. (Maßstab: 50 µm) (C) Der molekulare Aufbau der Zellschichten des Kleinhirns wurde durch die HDGF-Defizienz nicht beeinträchtigt. MS = Molekularschicht; PZ = Purkinjezellen, KS = Körnerzellschicht, WS = Weiße Substanz.

Frisch präparierte Gehirne zeigten einen pathologisch unauffälligen Aufbau des Cerebellums und des cerebralen Cortex, der durch histologische Analysen bestätigt wurde. Wie in Abbildung 4.29 A gezeigt, wurden die Molekularschicht des Cortex, in der eine Expression von HDGF beschrieben ist,³⁰ sowie die weiteren Schichten des Cortex durch den Verlust von HDGF nicht in ihrem strukturellen Aufbau beeinträchtigt. Trotz vollständiger Deletion von HDGF (Abb. 4.29 B) zeigten HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäuse einen vergleichbaren Aufbau der verschiedenen Zellschichten des Kleinhirns (Abb. 4.29 C).

4.5.4. Der Verlust von HDGF wird nicht durch ein Paralog kompensiert

Wie in Kapitel 1.2.1 dargestellt wurde, besteht die HDGF-Proteinfamilie neben HDGF aus fünf weiteren Mitgliedern, sogenannten Paralogen. Die adaptierte Expression eines Paraloges wird als möglicher Kompensationsmechanismus für den Verlust eines Gens beschrieben.¹⁶⁸ Hinsichtlich der bislang beschriebenen Expressionsmuster der einzelnen Mitglieder kommt diesbezüglich eine Regulation der Expressionshöhe von HRP-2, HRP-3 oder LEDGF im Gehirn HDGF-defizienter Mäuse in Frage. Daher wurde aus dem Gehirn neugeborener Mäuse Gesamt-RNA isoliert und die relative Expression von HDGF, HRP-2, HRP-3 und LEDGF anschließend durch quantitative RT-PCR bestimmt. Zur Normierung wurde die Expressionshöhe des *Housekeeping*-Gens *eEF2* verwendet.

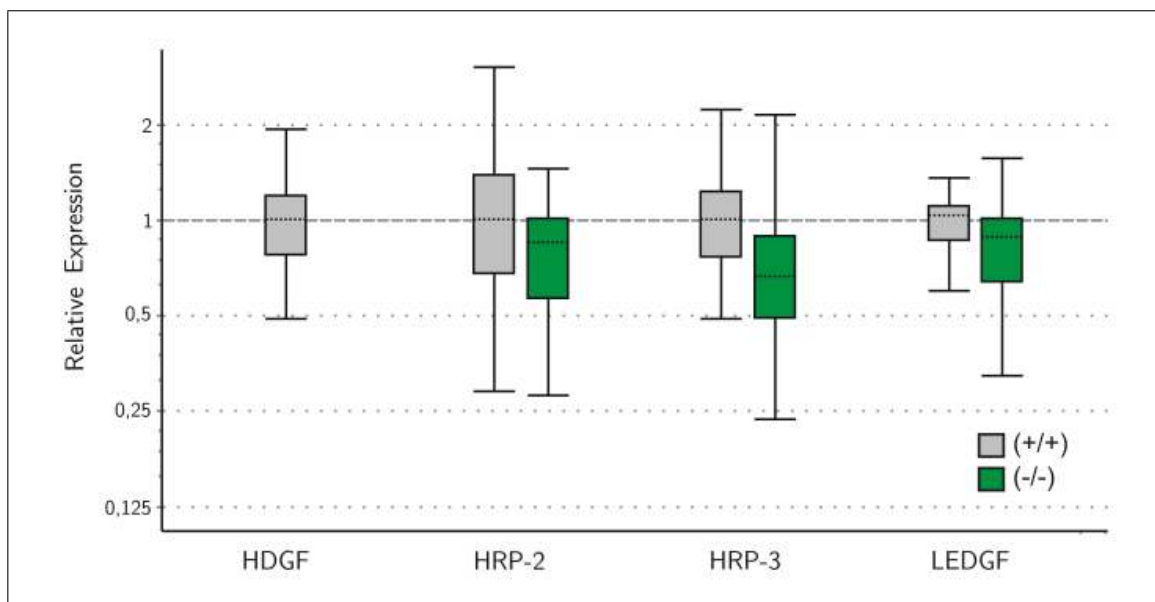


Abb. 4.30.: *Quantitative RT-PCR-Analyse von cDNA aus neonatalen Gehirnen.* Jeweils 1 µg Gesamt-RNA aus dem Gehirn neonataler Mäuse wurde in cDNA umgeschrieben und auf die Expression von HDGF und den HDGF-verwandten Proteinen HRP-2, HRP-3 und LEDGF durch quantitative RT-PCR untersucht (Expressionsnormierung durch eEF2). Die HDGF-Defizienz führt zu keiner signifikanten Änderung der Expression der untersuchten Gene. Der Box-Whisker-Plot zeigt die relative Expression in drei Gehirnen je Genotyp. +/+ = HDGF^{+/+}; -/- = HDGF^{EGFP/EGFP}

Das Ergebnis der quantitativen Real-Time-PCR-Analyse zeigte eine deutliche Variabilität in den relativen Expressionen der untersuchten Gene (Abb. 4.30), jedoch konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der relativen Expression von HRP-2, HRP-3 und LEDGF in Wildtyp- und HDGF^{EGFP/EGFP}-Gehirnen festgestellt werden.

4.5.5. Verhaltenstests mit adulten Mäusen

Da HDGF sowohl in kortikalen, hippocampalen und cerebellaren Strukturen des Gehirns exprimiert wird, wurden Verhaltenstests durchgeführt um mögliche neurologische Auswirkungen in Folge der HDGF-Defizienz festzustellen. Dabei können durch Rotarodversuche Defizite der Balancefähigkeit, sowie der Bewegungskoordination ermittelt werden. Dazu wird innerhalb einer Minute bei einer konstanten Geschwindigkeit von 12 rpm die Häufigkeit gemessen, mit der ein Tier von einer Walze (Rotarod) fällt. Mäuse, die direkt von der Walze fallen, werden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Der Rotarod-Test wurde mit 6 Monate alten, männlichen Mäusen durchgeführt. Die HDGF-EGFP-Knock-in Tiere fielen ebenso oft von der Walze ($4,9 \pm 0,6$) wie die Kontrolltiere ($4,0 \pm 0,9$). Des Weiteren konnte kein signifikanter Unterschied in der Zeit bis zum ersten Fallen der Mäuse festgestellt werden (Tab. 4.1).

Tab. 4.1.: Rotarod-Test

	HDGF ^{+/+}	HDGF ^{EGFP/EGFP}
Kumulative Fälle/min	$4,0 \pm 0,9$	$4,9 \pm 0,6$
Zeit bis zum ersten Fall (sec)	$21,9 \pm 6,4$	$16,9 \pm 2,7$

Als zweiter Verhaltenstest wurde der Open-Field-Test durchgeführt. Hierzu wird eine Maus für fünf Minuten in eine ihr unbekannte Box gesetzt und das Bewegungsmuster beobachtet. Daraus können beschreibende Parameter für die Aktivität und das Explorationsverhalten der Mäuse abgeleitet werden.¹⁶⁹ Beim Open-Field-Test wurden männliche Tiere im Alter von sechs Monaten untersucht. Dabei zeigten HDGF-EGFP-Knock-in-Tiere verglichen mit Wildtyp-Kontrolltieren keine signifikanten ($p > 0,05$) Auffälligkeiten im Hinblick auf die zurückgelegte Strecke, die durchschnittliche Geschwindigkeit und die sogenannte *ambulatory activity*, die Zeit in Bewegung (Tab. 4.2).

Tab. 4.2.: Open-Field-Test

	HDGF ^{+/+}	HDGF ^{EGFP/EGFP}
Zurückgelegte Strecke (cm)	1025 ± 145	1105 ± 91
durchschnittliche Geschwindigkeit (mm/sec)	$27,8 \pm 1,8$	$25,7 \pm 0,7$
Rearing Aktivität (sec)	19 ± 5	9 ± 5
Ambulatory Aktivität (sec)	34 ± 5	41 ± 4

Allerdings war zwischen den Genotypen ein signifikanter Unterschied ($p = 0,03$) hinsichtlich der *rearing activity* zu verzeichnen, der Zeit, in der die Mäuse aufgerichtet sind (Tab. 4.2). Wurden jedoch die ambulatory und rearing activity gemeinsam als Summenparameter „Explorationsfreude“¹⁶⁹ betrachtet, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und HDGF-defizienten Mäusen.

4.5.6. Oraler Glukosetoleranztest

Wie in Kap. 1.2.2 beschrieben weist HDGF eine Sequenzhomologie zum HMG-1 Protein auf. Da bei HMG-1-defizienten Mäusen Störungen im Glukosestoffwechsel beobachtet wurden,¹⁷⁰ wurde ein möglicher Einfluss von HDGF auf die insulinabhängige Aufnahme von Glukose aus dem Blut untersucht. Für den Glukosetoleranztest wurden die Mäuse zunächst über Nacht ohne Nahrung bei freiem Zugang zu Wasser gehalten. Am nächsten Tag wurde den Mäusen jeweils 2 mg Glukose pro g Körpergewicht intraperitoneal injiziert und zu den Zeitpunkten $t = 0, 25, 45, 70, 105, 145$ und 165 min aus der Schwanzspitze ein Tropfen Blut entnommen. Der Blutglukosespiegel wurde mit einem Ascensia Elite Blutzuckermessgerät analysiert. Wie in Abbildung 4.31 gezeigt war die Glukosekonzentration nach zwei Stunden wieder auf ein normales Niveau abgesunken. Dabei konnte kein Unterschied der insulinabhängigen Glukoseaufnahme aus dem Blut von Wildtyp- und HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen beobachtet werden. Die Kapazität des Glukosestoffwechsels wird demnach durch eine HDGF-Defizienz nicht gestört.

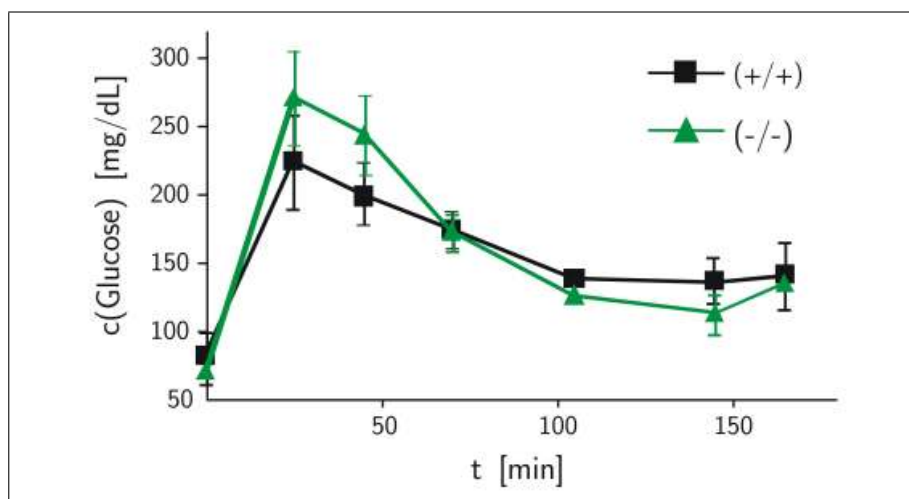


Abb. 4.31.: *Oraler Glukosetoleranztest.* Wildtyp- ($n = 5$) und HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen ($n = 5$) wurde nach Nahrungskarenz jeweils 2 mg Glukose pro g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 25, 45, 70, 105, 145$ und 165 min wurde der Blutglukosespiegel gemessen. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der absoluten Glukosekonzentrationen; die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben.

4.6. Untersuchungen an HDGF-defizienten Fibroblasten

Um mögliche Effekte der HDGF-Defizienz auf Proliferation, Zellzyklus und Apoptose zu analysieren, wurde ein geeignetes, primäres Zellkulturmodell generiert und charakterisiert. Für *in vitro*-Untersuchungen bieten sich hierzu Fibroblasten als ein experimentell leicht zugängliches Zellsystem an. Daher wurden aus E 14,5 Embryonen von HDGF^{EGFP/EGFP}- und HDGF^{+/+}-Mäusen sowohl embryonale Fibroblasten (MEF), als auch primäre, dermale Fibroblasten gewonnen. Im Rahmen der Zellkultur zeigte sich, dass primäre, dermale Fibroblasten als sehr homogene Zellkulturen gewonnen werden können. Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse stammen daher aus Versuchen mit primären, dermalen Fibroblasten, die teilweise durch Untersuchungen mit MEF-Zellen bestätigt wurden.

4.6.1. Charakterisierung primärer, dermaler Fibroblasten

Vor der Verwendung primärer, dermaler Fibroblasten für die Untersuchung HDGF-vermittelter Proliferation, induzierter Apoptose und zellulärem Stress wurden die präparierten Zellen auf ihre Tauglichkeit als Zellsystem analysiert. Zu Beginn wurde dazu untersucht, ob HDGF in dermalen Fibroblasten exprimiert wird. Die Expression von HDGF konnte sowohl durch eine Western-Blot-Analyse (Daten nicht gezeigt), als auch durch eine immunocytochemische Untersuchung mit anti-HDGF-Antikörpern gezeigt werden (Abb. 4.32 A).

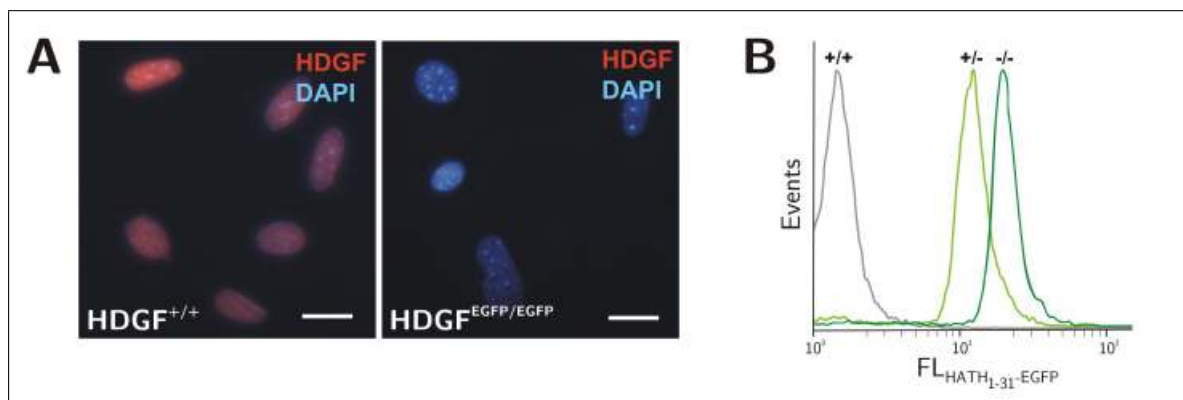


Abb. 4.32.: Charakterisierung primärer, dermaler Fibroblasten. (A) Die immunocytochemische Untersuchung primärer, dermaler Fibroblasten mit anti-HDGF-Antikörpern (rot) und Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau) bestätigt die nukleäre Expression von HDGF in Wildtyp-Fibroblasten. Kein Signal konnte in Fibroblasten aus HDGF-defizienten Tieren detektiert werden (Maßstab: 25 μ m). (B) Die Charakterisierung primärer, dermaler Fibroblasten durch FACS-Analyse verifiziert die Expression des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins in heterozygoten und homozygoten HDGF-EGFP-Knock-in-Fibroblasten. FL_{HATH₁₋₃₁-EGFP} = relative Fluoreszenzintensität des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins, +/+ = HDGF^{+/+}, +/- = HDGF^{+/EGFP}, -/- = HDGF^{EGFP/EGFP}

HDGF wurde dabei als nukleäres Protein in Wildtyp-Fibroblasten detektiert, wohingegen keine Anfärbung in HDGF^{EGFP/EGFP}-Fibroblasten erfolgte. Sowohl die direkte fluoreszenzmikroskopische Visualisierung des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins, als auch der indirekte Nachweis mithilfe eines spezifischen GFP-Antikörpers waren nicht erfolgreich. Allerdings konnte das HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsprotein durch eine FACS-Analyse sowohl in heterozygoten, als auch in homozygoten HDGF-EGFP-Knock-in-Fibroblasten anhand seiner EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 4.32 B).

4.6.2. Der Einfluss von endogenem HDGF auf die Proliferation von Fibroblasten

In zahlreichen Studien wurde eine verminderte Proliferationsrate nach Suppression der endogenen HDGF-Expression durch Antisense-Oligonukleotid- oder siRNA-Transfektion beschrieben. Um zu klären inwieweit ein kompletter Verlust endogenen HDGFs die Proliferation beeinflusst, wurden die Wachstumseigenschaften dermalen Fibroblasten nach Expansion über einen Zeitraum von sieben Tagen durch Trypanblau-Exklusions-Zellzählung quantitativ bestimmt. In Übereinstimmung zur normalen Entwicklung und nicht retardiertem Wachstum von HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen war ebenfalls in den Wachstumsraten der HDGF-defizienten Fibroblasten kein Unterschied im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten zu erkennen (Abb. 4.33). Der Verlust von endogenem HDGF scheint demnach keinen Einfluss auf die Proliferationskapazität der Fibroblasten zu haben.

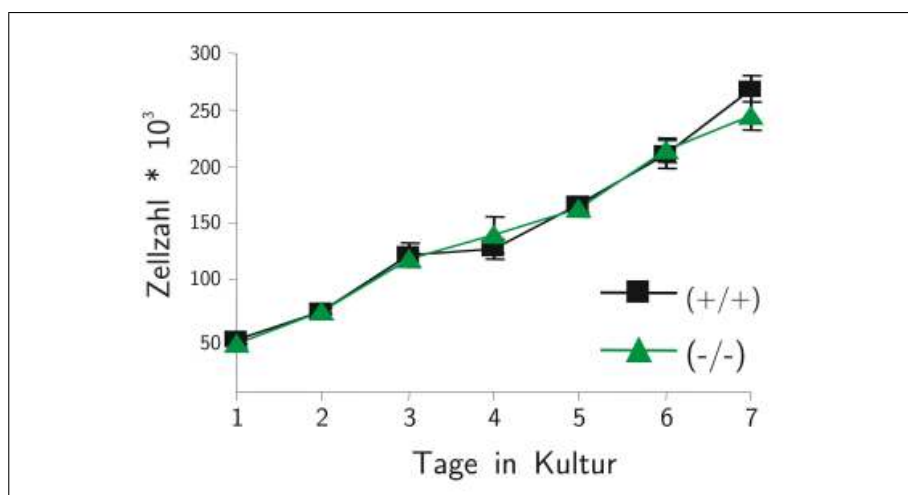


Abb. 4.33.: Bestimmung der Wachstumseigenschaften mit Trypanblau-Exklusion. Das Wachstum primärer, dermalen Fibroblasten über einen Zeitraum von einer Woche wurde durch Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau untersucht. Sowohl Wildtyp-, als auch HDGF^{EGFP/EGFP}-Fibroblasten zeigten identische Wachstumskurven. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. ($n = 3$)

Die Untersuchung der *de novo* DNA-Synthese während der Zellproliferation durch die Bestimmung der Einbaurrate von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin bestätigte das Ergebnis der Trypanblau-Exklusions-Zellzahlbestimmung. Die DNA-Syntheserate war in HDGF^{EGFP/EGFP}-Fibroblasten unverändert (Abb. 4.34). Der Zusatz von rekombinantem HDGF zum Nährmedium als exogener Proliferationsstimulus führte in Konzentrationen von 1 und 10 ng/mL zu einer signifikanten Steigerung der DNA-Syntheserate. Die konzentrationsabhängige Erhöhung der DNA-Synthese durch exogen appliziertes HDGF war identisch in HDGF^{EGFP/EGFP}- und Wildtyp-Fibroblasten (Abb. 4.34).

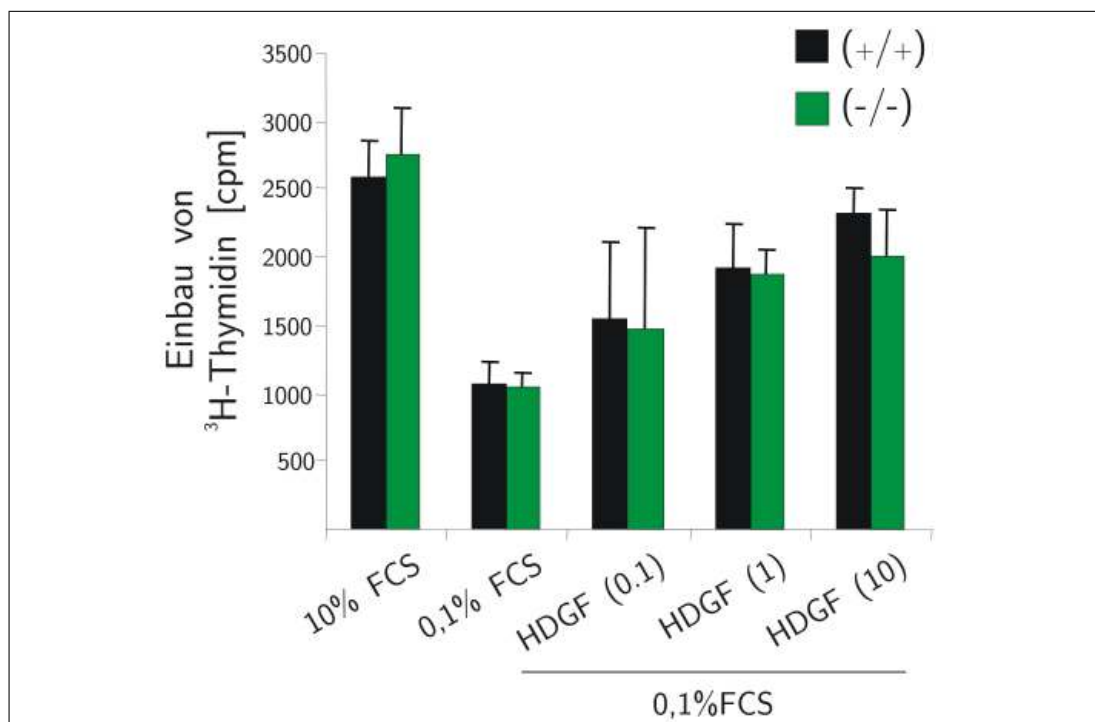


Abb. 4.34.: Proliferationsstimulation mit exogenem HDGF. Verschiedene Konzentrationen an rekombinantem HDGF (0,1, 1 und 10 ng/mL) wurden als Proliferationsstimulus dem Medium primärer, dermaler Fibroblasten zugefügt. Die Proliferation wurde anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin bestimmt; 10% beziehungsweise 0,1% FCS dienen als Positiv- beziehungsweise Negativkontrolle. Die Abwesenheit von endogenem HDGF hatte keinen Einfluss auf den die DNA-Synthese steigernden Effekt exogen applizierten HDGFs. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben ($n = 6$).

Die Depletion von HDGF schien somit keine Wirkung auf die Regulation des Zellzyklus zu haben, was durch Durchflusszytometrie der primären, dermalen Fibroblasten verifiziert werden konnte. Dabei zeigt sich, dass die Verteilung der Zellzyklusphasen in dermalen Fibroblasten nicht durch die HDGF-Defizienz verändert wird (Abb. 4.35). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den bereits gezeigten Daten zur *de novo* DNA-Synthese, die durch den Verlust von HDGF ebenfalls nicht beeinflusst wurde.

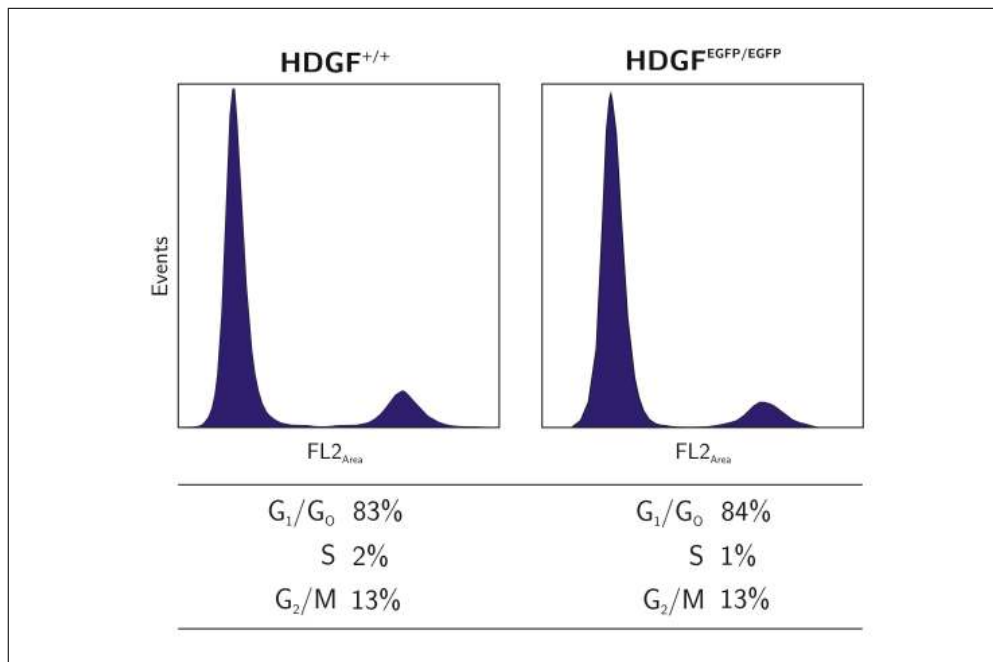


Abb. 4.35.: Zellzyklusanalyse. Fixierte und mit Propidiumjodid gefärbte primäre dermale Fibroblasten wurden zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung an einem FACSCalibur vermessen. Die Zellzyklusphasen von HDGF^{EGFP/EGFP}-Fibroblasten wurden durch den Verlust von HDGF nicht verändert. Die Werte sind als Mittelwerte angegeben ($n = 3$). FL2_{Area} = relative Fluoreszenzintensität

4.6.3. Apoptose in HDGF-defizienten Fibroblasten

Frühere Versuche an verschiedenen Zelllinien legen die Vermutung nahe, dass eine verminderte Expression von HDGF durch Antisense-Oligonukleotid- oder RNA-Interferenzbasierte Ansätze zu einer Apoptoseinduktion führt. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die siRNA-vermittelte Reduktion der HDGF-Expression eine TNF α /CHX-induzierte Apoptose verhindert. Um zu überprüfen welchen Effekt das Ausschalten von HDGF auf die Apoptose in einer primären Zelllinie hat, wurden primäre, dermale Fibroblasten mit TNF α und weiteren Stimuli inkubiert und die Apoptoseinduktion untersucht. Zunächst wurden für die Analyse Fibroblasten von Wildtyp- und HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen mit steigenden Konzentrationen an TNF α (1, 10 und 25 ng/mL) in Gegenwart von 10 μ g/mL CHX über einen Zeitraum von 8 h zur Apoptoseinduktion über den extrinsischen Signalweg inkubiert. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde wie in Kap. 3.8.4 dargestellt bestimmt. Die Inkubation mit TNF α -Konzentrationen von 10 und 25 ng/mL führte zu einer deutlichen Steigerung der Caspase 3/7-Aktivität. Jedoch war zwischen beiden untersuchten Genotypen kein signifikanter Unterschied bei diesen Inkubationsbedingungen zu erkennen (Abb. 4.36 A).

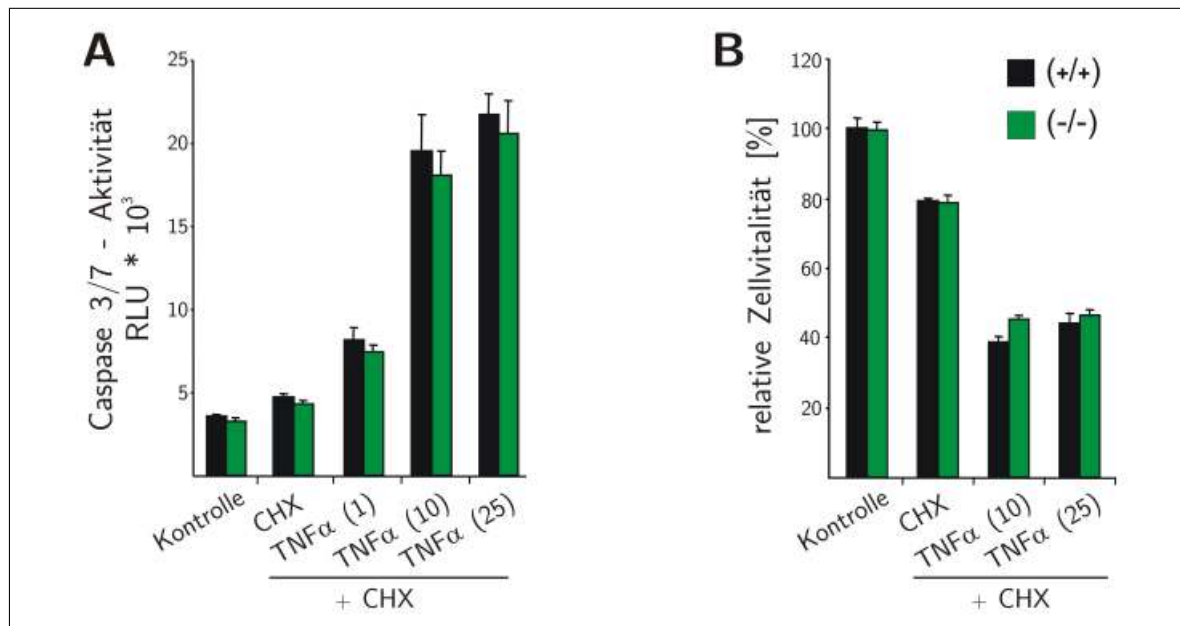


Abb. 4.36.: Apoptoseinduktion durch TNF α /CHX. (A) Apoptose wurde innerhalb von 6 h durch verschiedene Konzentrationen an TNF α (1, 10 und 25 ng/mL) in der Gegenwart von 10 μ g/mL CHX induziert. Die Caspase 3/7-Aktivität zeigte keine erkennbare Beeinflussung durch HDGF. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben ($n = 3$). (B) Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde in primären, dermalen Fibroblasten die Apoptose innerhalb von 8 h mit verschiedenen Konzentrationen an TNF α (1, 10 und 25 ng/mL) in Gegenwart von 10 μ g/mL CHX induziert. Nach 24 h wurde die Zellvitalität mit Hilfe des Alarmabluete-Tests bestimmt. Übereinstimmend mit der Aktivierung von Caspase 3/7 konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp- und HDGF-EGFP-Knock-in-Fibroblasten festgestellt werden. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben ($n = 3$). RLU = relative Lumineszenz

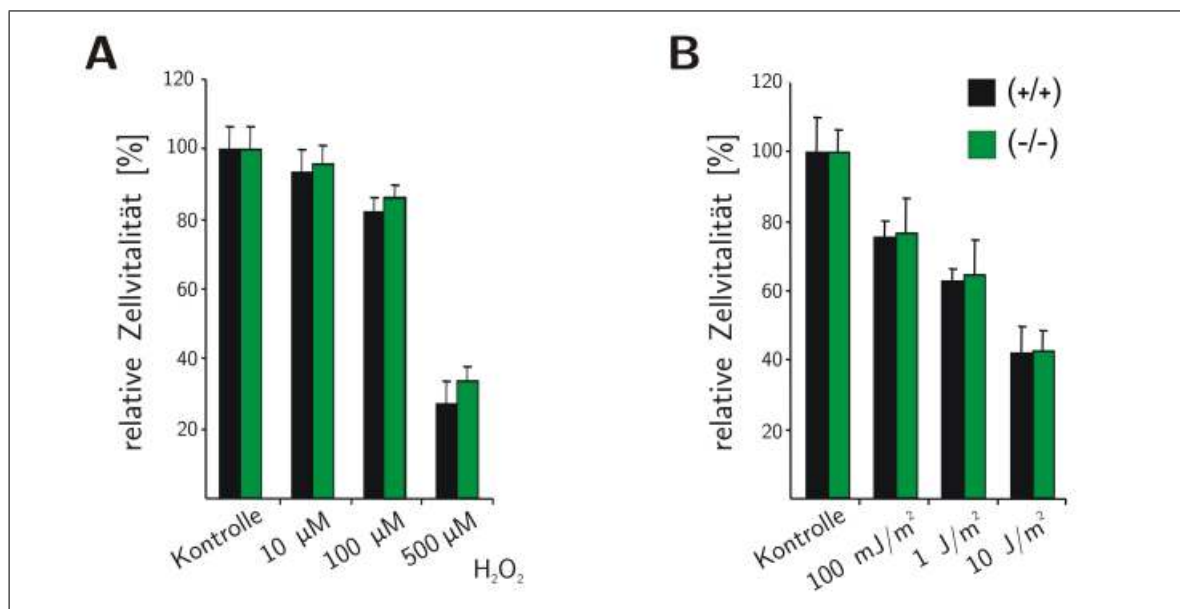


Abb. 4.37.: Stimulation mit H₂O₂ und UV_C-Bestrahlung. Die Apoptoseinduktion durch H₂O₂ (10, 100, 500 μ M) und UV_C-Strahlung (0,1, 1 und 10 J/m²) resultierte in keinem signifikanten Unterschied der Zellvitalität von Wildtyp- und HDGF-defizienten-Fibroblasten. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben ($n = 20$). +/+ = HDGF^{+/+}, -/- = HDGF^{EGFP/EGFP}

Fibroblasten, die mit identischen Konzentrationen inkubiert wurden, zeigten unter Einfluss von TNF α /CHX nach 24 h ebenfalls eine verringerte Vitalität. Wie in Abb. 4.36 B dargestellt, unterscheidet sich die Zellvitalität der HDGF-defizienten Fibroblasten nicht von den Wildtyp-Kontrollen.

Zur gezielten Aktivierung intrinsischer Signalwege zur Apoptoseinduktion wurden dermale Fibroblasten mit steigenden Konzentrationen an H₂O₂ (10–500 μ M) beziehungsweise mit UV_C-Strahlung (0,1–10 J/m²) stimuliert. Ab einer Konzentration von 100 μ M H₂O₂ konnte eine Reduktion der Zellvitalität beobachtet werden. Auch eine Energiedosis von 100 mJ/m² war für die Reduktion der Zellvitalität ausreichend, die bei steigender Energiedosis noch ausgeprägter abnahm. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der bisherigen Untersuchungen zur Apoptoseinduktion war bei beiden Stimuli kein Unterschied zwischen Wildtyp- und HDGF^{EGFP/EGFP}-Fibroblasten erkennbar (Abb. 4.37). Zusammenfassend lassen die gezeigten Ergebnisse darauf schließen, dass HDGF sowohl für den extrinsischen als auch für den intrinsischen Signalweg des programmierten Zelltodes in primären, dermalen Fibroblasten entbehrlich ist.

5. Diskussion

5.1. Gezielte Deletion des murinen HDGF-Gens

Die genomische Struktur des *Hepatoma-derived Growth Factor* (HDGF) ist durch hoch konservierte Bereiche gekennzeichnet. Das Protein weist ein ausgesprochen ubiquitäres Expressionsmuster auf^{17,29} und übt unterschiedliche Effekte während der Zellproliferation und der Apoptose aus. Eine Beteiligung an der Entwicklung verschiedener Organe wird vermutet. Trotz seiner vielfältigen Eigenschaften ist die spezifische Funktion von HDGF noch weitgehend unverstanden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Rolle dieses Proteins sowohl *in vivo*, als auch in einem *in vitro*-Zellsystem zu gewinnen. Die vorliegende Dissertation beschreibt zum einen die Herstellung von Austauschvektoren zur Erzeugung einer konventionellen und einer konditionalen HDGF-Reporter-gen-Knock-in-Mausmutante und zum anderen die phänotypische Charakterisierung der konstitutiven HDGF-EGFP-Knock-in-Mauslinie durch *in vivo*-Untersuchungen und *in vitro*-Analysen primärer, dermaler Fibroblasten.

5.2. Targeting-Vektoren für die Inaktivierung von HDGF

Für die Inaktivierung des HDGF-Gens in Mäusen wurden zwei Strategien verfolgt, da zu Beginn dieser Arbeit nicht abzusehen war, ob homozygot HDGF-defiziente Mäuse lebensfähig sind. Dabei sollte die konventionelle Knock-in-Strategie die Erfassung der zeitlichen und örtlichen Expression von HDGF ermöglichen. Für den Fall eines embryonal-letalen Phänotyps der konventionellen HDGF-Reporter-gen-Knock-in-Maus wurde parallel ein konditionaler Reporter-gen-Knock-in-Ansatz verfolgt.

5.2.1. Herstellung von 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in'

Zur Generierung einer transgenen Mauslinie mit konstitutiver HDGF-Defizienz wurde der Austauschvektor 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in' kloniert (Kap. 4.1.1). Die erfolgreiche homologe Rekombination sollte zur Deletion des genomischen Bereichs zwischen Exon 2

und Exon 6 des HDGF-Gens führen. Gleichzeitig sollte die Insertion der kodierenden Sequenz des verstärkt grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) hinter der Splice-Akzeptor-Sequenz von Exon 2 in das Leseraster des HDGF-Gens die Expression eines HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins unter der Kontrolle des endogenen HDGF-Promotors bewirken (siehe Abb. 4.11). Der Austauschvektor wurde in drei Klonierungsschritten fertiggestellt. Nach einer umfassenden Restriktionsanalyse (Abb. 4.4) wurde der linearisierte Vektor durch Elektroporation in HM-1 ES-Zellen transfiziert.

5.2.2. Klonierung von 'pRG2-floxHDGF:mRFP-Knock-in'

Parallel hierzu wurde ein konditionaler Targeting-Vektor für das murine HDGF-Gen hergestellt (Kap. 4.1.2). Der Austauschvektor war hierbei so konzipiert, dass nach homologer Rekombination die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion des genomischen Bereichs von Exon 2 bis 6 zur Expression eines nachgeschalteten, monomeren, rot fluoreszierenden Reporterproteins (mRFP) führen sollte. Der Austauschvektor wurde in acht Teilschritten hergestellt. Die funktionale Expression von HDGF wurde dabei durch die Insertion einer *loxP*-Sequenz vor Exon 2 nicht beeinträchtigt (siehe Abb. 4.10 B). Ebenso konnte die erfolgreiche Expression des HATH₁₋₃₁-mRFP-Fusionsproteins nach Cre-Rekombinase-vermittelter Deletion des von *loxP*-Sequenzen flankierten Bereichs nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.10 C). Wie sich im Laufe der Arbeiten herausstellte, zeigten die auf dem 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in'-Konstrukt basierenden, transgenen Mäuse keinen embryonal-fetalen Phänotyp, weshalb auf die weiteren Schritte zur Herstellung einer konditionalen Mauslinie verzichtet wurde.

5.3. Generierung eines HDGF-defizienten Mausmodells

Die stabile Transfektion von ES-Zellen mit dem linearisierten Austauschvektor 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in' resultierte in drei homolog rekombinierten ES-Zellklonen von insgesamt 144 analysierten Zellklonen. Sowohl die PCR-Untersuchung, als auch die Southern-Blot-Analyse bestätigten die erfolgreiche Rekombination des Targeting-Vektors (siehe Abb. 4.12) bei einer homologen Rekombinationsfrequenz von 2,1%. Wie bereits in Kap. 1.3.1 dargestellt, ist die Frequenz homologer Rekombinationsergebnisse abhängig von der Zielregion und der Länge der Homologiebereiche des Targeting-Vektors.^{105,106} Die mit dem Targeting-Vektor 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in' erzielte Rekombinationsfrequenz von $2,1 \times 10^{-2}$ stimmt mit üblichen, homologen Rekombinationsraten von 10^{-1} bis 10^{-3} überein.^{107,108,171}

Die HATH₁₋₃₁-EGFP-mRNA wurde von positiv identifizierten ES-Zellklonen exprimiert und Sequenzanalysen bestätigten den korrekten Splice-Vorgang. Die Funktionalität des HATH₁₋₃₁-EGFP-Reporterproteins wurde fluorezenzmikroskopisch verifiziert (Abb. 4.13). Zwei der drei positiv rekombinierten ES-Zellklone wurden anschließend in C57BL/6-Blastozysten injiziert, aus denen sechs keimbahngängige Chimäre hervorgingen, die als Grundlage für alle weiteren Verpaarungen dienten. Eine Southern-Blot-Untersuchung verifizierte die homologe Rekombination in HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen (Abb. 4.16). Zusätzliche Northern- und Western-Blot-Analysen erbrachten den Beweis, dass weder HDGF-mRNA, noch HDGF selbst im Gehirn HDGF-defizienter Mäuse gebildet wird. Stattdessen wurde durch die Verwendung des Knock-in-Konstruktes das Reporterprotein HATH₁₋₃₁-EGFP anstelle von HDGF in Geweben heterozygoter und homozygoter Knock-in-Mäusen exprimiert (Abb. 4.17 und 4.18).

5.4. Expressionsanalyse des HATH₁₋₃₁-EGFP-Reporterproteins

Die Etablierung einer HDGF-defizienten Mauslinie mittels eines 'EGFP-Knock-in' eröffnete die Möglichkeit einer zeitlichen und örtlichen Untersuchung der Expression von HDGF anhand des HATH₁₋₃₁-Reporterproteins, das unter der Kontrolle des endogenen HDGF-Promotors exprimiert wird. So konnten erste Hinweise auf Regionen in Organen gewonnen werden, die HDGF exprimieren. Nachdem sowohl die Funktionalität des Fusionsproteins, als auch die tatsächliche Expression *in vivo* auf mRNA- und Proteinebene bestätigt war, wurde die Bildung des HATH₁₋₃₁-EGFP-Reporterproteins in HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen durch Epifluoreszenz-Experimente charakterisiert. In Übereinstimmung mit früheren Northern- und Western-Blot-Analysen, die eine Expression von HDGF in einer Vielzahl von Organen beschrieben,^{17,29} konnte das fluoreszierende Reporterprotein in Geweben hetero- und homozygoter HDGF-EGFP-Knock-in-Mäuse nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.19). Auffallend war das ausgeprägte Fluoreszenzsignal in der Milz und den Augen, wobei eine Expression von HDGF im Auge bislang nicht beschrieben wurde. Einzig sogenannte *expressed sequence tag* (EST)-Analysen¹⁷² deuten darauf hin, dass HDGF im Auge exprimiert wird. Mit diesen Hinweisen im Einklang stehend konnte das HATH₁₋₃₁-EGFP-Reporterprotein mittels Epifluoreszenzmikroskopie im Auge adulter HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäuse nachgewiesen werden (Abb. 4.24 A). Nachfolgende immunhistologische Untersuchungen an sagittalen Kryoschnitten bestätigten die Expression von HDGF im Auge und konkretisierten die örtliche Expression auf Bereiche in der Cornea, der Linse, sowie der Retina (Abb. 4.24 C). Zur detaillierten Bestimmung der subzellulären Lokalisation wurden zudem Gefrierschnitte mit anti-HDGF-Antikörpern inkubiert und

an einem Konfokalmikroskop analysiert. HDGF wurde dabei in der Epithelschicht der Cornea sowohl nukleär, als auch zytosolisch exprimiert. Im Gegensatz dazu war HDGF im Linsenepithel streng nukleär lokalisiert. Während HDGF in der Retina in der inneren Körnerzellschicht ausschließlich nukleär vorlag, war in der äußeren Körnerzellschicht eine zytosolische Lokalisation zu beobachten (Abb. 4.25).

Hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von HDGF gibt es unterschiedliche Auffassungen. Während HDGF in früheren Studien im Zytosol nachgewiesen wurde,^{17,18,29} dominiert offensichtlich die nukleäre Lokalisation dieses Proteins.²⁰ Hu *et al.*⁸⁰ konnten darüber hinaus sowohl eine nukleäre, als auch zytosolische Expression von HDGF in Hepatomzellen nachweisen. Weitere Untersuchungen legten jedoch die Vermutung nahe, dass HDGF vorwiegend nukleär lokalisiert ist, zumal die nukleäre Lokalisation Voraussetzung für die mitogene Wirkung von HDGF ist.⁴⁸ Die intrazelluläre Lokalisation kann ferner von einzelnen Zellzyklusphasen, der Zelldifferenzierung, externen Stimuli oder Umgebungsbedingungen, zum Beispiel zellulärem Stress, abhängen. Für LEDGF, ein Mitglied der HDGF-Familie, wurde zum Beispiel eine Beeinflussung der subzellulären Lokalisation durch veränderte Zellkulturbedingungen gezeigt.¹⁷³ Andererseits weist HRP-3, ein weiteres Mitglied der HDGF-Familie, abhängig vom Entwicklungsstadium unterschiedliche Lokalisation auf. Während früher Phasen der Entwicklung befindet sich HRP-3 hauptsächlich im Zytosol und den Neuriten kortikaler Neurone. Mit zunehmender Differenzierung transloziert das Protein kontinuierlich in den Zellkern. In adulten Mäusen ist HRP-3 dann in der Mehrzahl von Neuronen ausschließlich im Nukleus nachzuweisen.³² Ebenso wurden Unterschiede in der zytosolischen und nukleären Expression für HMG-1 und HMG-2 in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe beschrieben.¹⁷⁴ Eine von Oliver & Al-Awqati¹⁸ postulierte Modulation der intrazellulären Lokalisation durch posttranslationale Modifikation konnte bis jetzt nicht belegt werden. Die Steuerung des nukleären Transportes durch direkte Phosphorylierung und einer damit einhergehenden Maskierung der NLS-Sequenzen wurde für Transkriptionsfaktoren beschrieben.¹⁷⁵ HDGF besitzt zwei NLS-Sequenzen, wovon sich eine in der konservierten HATH-Region (*NLS1*: Lys⁷⁵-Lys⁸⁰), die andere im C-terminalen Bereich (*NLS2*: Lys¹⁵⁵-Lys¹⁷⁰) befindet.¹⁷ Untersuchungen des Phosphoproteoms von Makrophagen nach Stimulation mit Interferon- γ belegen eine Phosphorylierung von Ser¹⁶⁵ in der *NLS2* von HDGF.¹⁷⁶ Kishima *et al.*⁴⁸ konnten bereits durch Mutationsexperimente der *NLS1*- und *NLS2*-Sequenz zeigen, dass die *NLS2* für eine Translokation von HDGF in den Nukleus essentiell ist. Eine Modulation des zytoplasmatisch-nukleären Transportes von HDGF durch Maskierung der *NLS2* infolge einer Phosphorylierung von Ser¹⁶⁵ ist daher denkbar. Neben einer direkten Phosphorylierung wurde kürzlich auch eine nukleäre Exportsequenz (*NES*) identifiziert, die im untersuchten Fall den nukleären Transport von FGF-1 modulieren kann.^{177,178} Die Überprüfung der Aminosäuresequenz des murinen HDGF-Proteins mit Hilfe von

NetNES1,1^{179,180} deutet ebenfalls auf das Vorliegen eines putativen NES-Motivs im Sequenzbereich der Aminosäuren –Leu¹⁸⁵GluGlyGluArgProLeuPro¹⁹²– hin. Erste vielversprechende Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe deuten auf eine Interaktion von HDGF mit *Nucleolin* hin, die für die Steuerung des Transports zwischen Nukleus und Zytosol bedeutend sein könnte. *Nucleolin* ist ein üblicherweise im Nukleolus lokalisiertes Phosphoprotein, das den nukleo-zytoplasmatischen Transport von Proteinen, zum Beispiel *Stat1*, vermitteln kann.^{181,182}

Die unterschiedliche Lokalisation von HDGF in benachbarten Zellschichten der Retina stellt einen interessanten Befund dar und deutet auf verschiedene, jedoch bislang unbekannt Funktionen von HDGF in diesen Zellen hin. Neben einer markanten Expression des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins im Auge, konnte ein prominentes Fluoreszenzsignal in Milz und Thymus detektiert werden. Wenn auch die Expression von HDGF in der Milz durch Western- und Northern-Blot-Analysen bereits beschrieben wurde,^{21,29} ist eine nähere Charakterisierung bisher nicht erfolgt. Eigene Daten aus Epifluoreszenzuntersuchungen wurden durch eine Western-Blot-Analyse von Organen des lymphatischen Systems bestätigt. In den untersuchten Geweben der Milz, des Thymus und des Knochenmarks konnte HDGF als dominantes Polypeptid von 38 kDa nachgewiesen werden. Auffallend war die zusätzliche Detektion eines 40 kDa großen Proteins in Milz und Thymus, das möglicherweise auf posttranslationalen Modifikationen beruht oder eine bisher nicht näher bestimmte Splice-Variante von HDGF darstellt (siehe Abb. 4.20). Die genauere Analyse von Dickschnitten der Milz am Epifluoreszenzmikroskop konkretisierte die Expression des Reporterproteins in distinkten Arealen. Die Untersuchung von Kryoschnitten der Milz adulter Wildtyp- und HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäuse verifizierte die Bildung von HDGF in umgrenzten Regionen der Milz, die unter anderem der weißen Pulpa zuzuordnen sind. Überdies konnte HDGF weniger ausgeprägt in Strukturen der roten Pulpa und der Kapsel nachgewiesen werden. Während HDGF in der Milzkapsel ausschließlich nukleär exprimiert wird, zeigte sich in Arealen der weißen Pulpa eine ausgesprochen diffuse Verteilung (Abb. 4.21 B). Die weiße Pulpa besteht aus Lymphfollikeln, die vorallem B-Lymphozyten beinhalten. Zudem gehören zur weißen Pulpa die um die sie versorgenden Gefäße angeordneten, periarteriellen, lymphatischen Scheiden (PALS), die T-Lymphozyten enthalten. Um zu klären, ob HDGF tatsächlich in Lymphozyten exprimiert wird, wurden periphere Lymphozyten aus Schwanzvenenblut mit spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenantigene der Lymphozyten in einer FACS-Analyse untersucht. Dabei konnte durch die Co-Expression des HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsproteins und der untersuchten Oberflächenmarker zum ersten Mal gezeigt werden, dass HDGF in CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten exprimiert wird (Abb. 4.22). Es ist aufgrund dieser immunhistologischen Beobachtungen davon auszugehen, dass HDGF ebenfalls in B-Lymphozyten exprimiert wird. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen waren die relativen

Anteile an CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten der peripheren CD3⁺ T-Lymphozyten in den untersuchten HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen leicht, aber signifikant verändert (siehe Abb. 4.23). Folglich war auch das CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis in HDGF-defizienten Tieren ($2,9 \pm 0,1$) im Vergleich zu Kontrolltieren ($2,3 \pm 0,2$) geringfügig, jedoch signifikant erhöht. Hinsichtlich dieses geringen Unterschiedes ist anzumerken, dass es sich bei den Kontrolltieren nicht um Geschwistertiere handelte. Die untersuchten Gruppen beider Genotypen stammten aus jeweils homozygoten Verpaarungen und waren zwar innerhalb der Untersuchungsgruppen betrachtet Geschwistertiere, aber im Vergleich der Gruppen nicht identisch im Hinblick auf ihr Alter und ihren genetischen Hintergrund. Die geringen Unterschiede sind daher durch die veränderten CD4⁺- und CD8⁺- Subpopulationen erklärbar, die mit Blick auf das Alter und den genetischen Hintergrund einer deutlichen Variabilität unterliegen können.^{183,184} Erwartungsgemäß zeigten HDGF-Nullmutanten keine immunologischen Auffälligkeiten. Kudlich *et al.* beschrieben eine gesteigerte Expression von HDGF nach Inkubation von Kolonkarzinomzellen mit proinflammatorischen Stimuli.⁸⁹ Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe deuten auf eine Erhöhung der HDGF-Expression nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation hin. Microarray-Analysen unterstrichen hierbei die verstärkte Expression von HDGF nach Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten.¹⁸⁵

5.5. Auswirkungen der HDGF-Defizienz auf Organentwicklung und Wachstum

Die Fragestellung dieser Dissertation beinhaltete unter anderem die Untersuchung möglicher Auswirkungen der HDGF-Defizienz auf die Organentwicklung und das Wachstum transgener Mäuse. Viele Proteine, darunter auch Wachstumsfaktoren, werden während der Embryogenese in hohem Maße und ubiquitär exprimiert, während die Expression im späteren Verlauf, das heißt in neonatalen oder adulten Geweben, ein niedrigeres Niveau und oft eine distinkte Verteilung annimmt. Dabei gibt es zwischen den Wachstums- und Differenzierungsprozessen während der Embryogenese eine direkte Verbindung zu vielen pathologischen Vorgängen im adulten Organismus, zum Beispiel zum Verhalten von Tumorzellen oder regenerativen Prozessen wie der Wundheilung.¹⁸⁶

HDGF wurde in zahlreichen Studien als ein wachstumregulierendes Protein beschrieben. Aus diesen Beobachtungen wurde eine putative Funktion des HDGF während der Entwicklung von Niere, Leber, Lunge, Gehirns, des kardio-vaskulären Systems und des Intestinaltraktes abgeleitet. Während HDGF in frühen Stadien der Embryonalentwicklung in der Niere weitläufig, besonders an Zentren aktiver Morphogenese, exprimiert wird, ist HDGF im adulten Organ ausschließlich in Tubuluszellen erkennbar.¹⁸ Daneben wurde HDGF

im Zellkern vaskulärer, glatter Muskelzellen und Endothelzellen der Rattenaorta nachgewiesen. Da die Expression hierbei ausschließlich auf das fetale Stadium beschränkt war, wird eine regulatorische Funktion von HDGF auf das Wachstum vaskulärer, glatter Muskelzellen während der Entwicklung angenommen.⁴⁷ Darüber hinaus unterstützten die Expressionsdaten von HDGF während früher Phasen der embryonalen Herzentwicklung die mögliche Rolle dieses Wachstumsfaktors während der kardio-vaskulären Entwicklung und Differenzierung.⁶¹ Die abnehmende Bildung von HDGF in Hepatozyten im Zuge voranschreitender Differenzierung deutet ebenfalls auf eine Bedeutung von HDGF in der Steuerung der Hepatozytenproliferation während der Leberentwicklung hin.^{51,65} HDGF wird während der Embryogenese des Darms stark exprimiert, um nach der Differenzierung des Darmepithels stark abzufallen.^{63,64} Unsere Arbeitsgruppe konnte neben der zellulären Lokalisation von HDGF im Cerebrum und im Cerebellum auch eine erhöhte Expression von HDGF während der Embryonalentwicklung des murinen Gehirns ab Embryonaltag E 15 zeigen.²⁹ HDGF entfaltet seine proliferative Wirkung sowohl in Zellen, die das Protein selbst überexprimieren, als auch als exogen applizierter Stimulus in Form eines rekombinanten Proteins. Die dabei benutzten Signaltransduktionswege sind unabhängig voneinander und unterschiedliche Bereiche von HDGF scheinen für diese Wirkungen verantwortlich zu sein.⁴³

Trotz dieses ausgeprägten Expressionsmusters während der Embryonalentwicklung wurden HDGF-defiziente Mäuse entsprechend den Mendelschen Regeln geboren (siehe Kap. 4.5.1), was das Vorliegen eines embryonal-letalen Phänotyps ausschließt. Ebenso unterschieden sich neonatale HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäuse nicht von Wildtyp-Geschwistertieren und zeigen darüber hinaus über einen Beobachtungszeitraum von zwei Jahren keine Auffälligkeiten verglichen mit Kontrolltieren. Zudem waren sowohl weibliche, als auch männliche Knock-in-Mäuse fertil. Die übereinstimmende Gewichtszunahme von Wildtyp- und HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen in den ersten postnatalen Tagen bestätigen die Vermutung, dass die HDGF-Defizienz keine Auswirkung auf das Wachstum von Mäusen hat. Die detaillierte histologische Gewebeanalyse von Embryonen der Entwicklungsstufe E 16,5 und von adulten Mäusen konkretisierte diese ersten Beobachtungen und ließ keine offensichtlichen Unterschiede im zellulären Aufbau, noch Hinweise auf pathologische Veränderungen der HDGF-exprimierenden Organe erkennen (Abb. 4.27). Obwohl HDGF als Wachstumsfaktor mit neurotrophen Eigenschaften beschrieben wird,⁷³ der in distinkten Arealen des Gehirns exprimiert wird,^{29,30,73} wurde die zelluläre Architektur von anatomischen Strukturen des Cerebrums und Cerebellums durch den vollständigen Verlust von HDGF nicht beeinflusst (Abb. 4.29). Die HDGF-Defizienz scheint somit keine neurologisch-pathologischen Effekte hervorzurufen. Diese Hypothese wird von Beobachtungen bei der Durchführung des Rotarod-Tests gestützt, die bei adulten HDGF-EGFP-Knock-in-Mäusen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp ergaben (siehe Tab. 4.1).

Obwohl HDGF im Cerebellum von HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen komplett deletiert ist, waren keine verminderten Balance-Fähigkeiten erkennbar. Ein weiterer Verhaltenstest, der Open-Field-Test, gab Aufschluss über die generelle motorische Aktivität, darunter das Explorationsverhalten der Mäuse. Bei diesem Test, der ebenfalls mit jungen Tieren durchgeführt wurde, waren marginale Anzeichen von Unterschieden zwischen Wildtyp und HDGF-defizienten Mäusen zu erkennen. Bewegungen, die mit dem Aufrichten auf die Hinterbeine korreliert sind (*rearing activity*), schienen signifikant weniger ausgeführt zu werden, wohingegen die Gesamtbewegungszeit keine statistisch aussagekräftigen Unterschiede zeigte (siehe Tab. 4.2).

Neben dem in der vorliegenden Arbeit etablierten Mausmodell wurde bereits für ein weiteres Mitglied der HDGF-Proteinfamilie eine transgene Mauslinie hergestellt, in der LEDGF durch das *Genetrap*-Verfahren ausgeschaltet wurde.¹⁶⁷ Während die Mehrzahl der LEDGF-Knock-out-Mäuse kurz nach der Geburt starben, zeigten die überlebenden Mäuse eine Reihe phänotypischer Abweichungen, darunter verminderte Fertilität und eine erhöhte Neigung zu Blepharitis. Im Gegensatz zu den Erwartungen an dieses Mausmodell war die Entwicklung des Linsenepithels nicht gestört. Jedoch wurden bei neugeborenen und adulten LEDGF-defizienten Tieren Veränderungen des Skelettaufbaus beobachtet. Kritisch anzumerken ist, dass das infolge des Genetraps gebildete LEDGF- β -geo-Fusionsprotein die DNA-bindende Domäne, die PWWP- sowie die AT-hook-Domänen enthält, während der hoch konservierte C-Terminus fehlt. Ob das dabei gebildete Fusionsprotein die Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors erfüllt, wurde nicht näher untersucht. In Analogie zu den Untersuchungen der LEDGF-Genetrap-Maus wurden Knochen- und Knorpelkomponenten des Skeletts neugeborener und zehn Tage alter Mäuse angefärbt. Im Gegensatz zu den Befunden der LEDGF-defizienten Maus scheint HDGF keinen Einfluss auf die Bildung des Skelettsystems zu haben (siehe Abb. 4.28).

EST-Analysen¹⁸⁷ deuten auf eine nicht unerhebliche Expression von HDGF im Pankreas hin. Da HMG-1-defiziente Mäuse Störungen im Glukosestoffwechsel aufweisen¹⁷⁰ und HDGF dem HMG-1-Protein sequenziell ähnlich ist, wurden die Auswirkungen der HDGF-Defizienz auf die insulinabhängige Aufnahme von Glukose aus dem Blut in einem Glukosetoleranztest untersucht. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Blutglukose-Konzentrationen nach intraperitonealer Applikation von D-Glukose zwischen HDGF-Nullmutanten und Wildtyp-Kontrollen beobachtet werden (Abb. 4.31). Gestützt wird dieses Ergebnis durch den unauffälligen histologischen Befund des Pankreas in HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen. Trotz seiner Expression im Pankreas scheint HDGF demnach keine Funktion im insulinabhängigen Glukosestoffwechsel zu spielen.

Seit Etablierung der ersten Knock-out-Mauslinie,¹⁸⁸ die einen bedeutenden Durchbruch in der Mausgenetik darstellt, erlaubt die Anwendung der *Gene Targeting*-Technik die gezielte Deletion eines Gens im Mausgenom und damit die Untersuchung der Auswirkungen der genomischen Modifikation auf die Entwicklung, Morphologie und Physiologie. Schätzungsweise 10-15% der Null-Mutanten zeigen jedoch keinen offensichtlich wahrnehmbaren Phänotyp.¹⁶⁸ In der Literatur werden drei Erklärungen für den Fall diskutiert, dass die gezielte Inaktivierung eines Gens nicht zu einem erkennbaren atypischen Phänotyp führt: (i) ein Phänotyp ist zwar unter den bisherigen Testbedingungen vorhanden, wurde aber noch nicht identifiziert, (ii) der Phänotyp wird nur unter Bedingungen ausgeprägt, die bisher noch nicht untersucht wurden, oder (iii) es ist kein Phänotyp vorhanden.¹⁶⁸

Der *Fibroblast growth factor* (FGF)-1 zeigt im Hinblick auf seine mitogenen Eigenschaften¹⁸⁹ und verstärkte Expression während der Embryonalentwicklung¹⁹⁰ und Tumorigenese¹⁹¹ weitreichende Ähnlichkeiten zu HDGF. Erstaunlicherweise zeigen FGF-1-Nullmutanten ebenfalls keine Auffälligkeiten im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren. Während FGF-2-Knock-out-Mäuse veränderte Gehirnstrukturen in Cortexbereichen aufweisen, werden die einzelnen Schichten des Großhirns durch den Verlust von FGF-1 nicht beeinflusst. Mäuse, denen der Wachstumsfaktor FGF-1 fehlte, waren fertil und entwickelten sich identisch zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren.¹⁹² Obwohl für FGF-1 eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen auf Basis zahlreicher *in vitro*-Zellkulturstudien und transgener Modelle *in vivo* angenommen wurde, deuteten die Befunde der FGF-1-Knock-out-Maus auf scheinbar untergeordnete Funktionen im normalen physiologischen Umfeld hin. Ungeachtet dessen schlossen die Autoren einen Phänotyp unter spezifischen Bedingungen nicht aus.

In den vergangenen Jahren wurden viele Proteine durch Klonierungsarbeiten und mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert und näher charakterisiert. Für viele der neu entdeckten Proteine stellt sich die Frage, welche spezifische Funktion sie im Organismus ausüben. Auf der Basis immunhistochemischer Untersuchungen wird oft versucht, die Funktion anhand ihrer zeitlichen und örtlichen Expression zu beschreiben. Die Annahme, dass ein Protein eine wichtige Rolle an Orten ausgeprägter Expression ausübt, wird dabei als allgemein gültig zu Grunde gelegt. Allerdings zeigt eine Vielzahl von Knock-out-Mausmodellen, darunter als prominentes Beispiel die *Tenascin*-defiziente-Maus,¹⁹³ dass die alleinige Expression eines Gens nicht *per se* mit einer zentralen Funktion einhergeht.¹⁹⁴

Tenascin, ein Protein der Extrazellulärmatrix, wird in einem ungewöhnlich differenzierten Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung gebildet, was zu der Hypothese führte, dass Tenascin essentielle Funktionen während der Embryogenese ausübt. Überraschenderweise zeigten Null-Mutanten keinen augenscheinlichen Phänotyp, was zu Zweifeln an der Theorie einer wichtigen Rolle von Tenascin für die normale Entwicklung

der Maus führte und die Expression von Tenascin gar als überflüssig darstellte.¹⁹³ Sollten bestimmte Proteine tatsächlich überflüssig exprimiert werden und gar keine spezifische Funktion ausüben, muss die Interpretation von Expressionsdaten grundlegend überdacht werden. Die Grundannahme bei der Auswertung von Immunlokalisationsdaten, dass ein Gen nur dann exprimiert wird, wenn es benötigt wird, ist konsequenterweise nicht zielführend.¹⁹⁴

Anhand der dargestellten Befunde konnte in dieser Arbeit erstmals an einem Tiermodell gezeigt werden, dass die Inaktivierung des HDGF-Gens unter physiologischen Bedingungen keinen Einfluss auf die Organentwicklung und das Wachstum hat. Überraschenderweise steht dieses Ergebnis in Gegensatz zu der in vielen Veröffentlichungen postulierten Rolle von HDGF während der Entwicklung und Differenzierung verschiedener Organe. Wie bereits an den Beispielen der FGF-1- und Tenascin-Knock-out-Maus aufgezeigt, verleitet die alleinige Betrachtung von Expressionsdaten schnell zu dem Schluss, ein Protein spiele eine wichtige Rolle im das Protein exprimierenden Gewebe. Auch die bislang postulierte Funktion von HDGF während der Embryonalentwicklung basiert lediglich auf der Interpretation von Expressionsdaten, während spezifische Aufgaben von HDGF noch unverstanden sind. Die vorgestellten Ergebnisse demonstrieren jedoch, dass HDGF für die normale Entwicklung und das Wachstum der Maus entbehrlich ist.

5.6. Untersuchungen an HDGF-defizienten Fibroblasten

5.6.1. Charakterisierung primärer, dermaler Fibroblasten

Die bislang gezeigten Beobachtungen auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene ließen keinen Einfluss der HDGF-Defizienz erkennen. Nachfolgende Untersuchungen an einem *in vitro*-Zellkulturmodell sollten darüber Aufschluss geben, ob das Fehlen von intrazellulärem HDGF eine Auswirkung auf die Proliferationskapazität und die Verteilung der Zellzyklusphasen hat und inwieweit vermeintlich apoptosemodulierende Eigenschaften beeinflusst werden. Hierzu wurden primäre, dermale Fibroblasten als leicht zugängliches und kultivierbares Zellkultursystem aus neonataler Haut von Wildtyp- und HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäusen isoliert. Sowohl immunocytochemische, als auch Western-Blot-Analysen bestätigten die Expression von HDGF in Wildtyp-Fibroblasten, während das HATH₁₋₃₁-EGFP-Fusionsprotein erfolgreich durch FACS-Analyse detektiert werden konnte (Abb. 4.32).

5.6.2. Endogenes HDGF ist für die Proliferation entbehrlich

Auswirkungen auf die Proliferation von Zellen durch Modulation der intrazellulären HDGF-Expression wurde vielfach beschrieben. Obwohl in zahlreichen Studien gezeigt wurde, dass eine Herabregulation von endogenem HDGF durch RNAi- oder Antisense-Oligonukleotid-basierte Ansätze in unterschiedlichen Zelltypen sowohl eine verminderte Proliferationskapazität, als auch eine geringere Zellvitalität zur Folge hat,^{48,51,56–59} war das Wachstum primärer, dermaler Fibroblasten trotz kompletten Verlusts von intrazellulärem HDGF nicht beeinträchtigt (Abb. 4.33). Das Fehlen von HDGF scheint ebenfalls keinen Einfluss auf die *de novo* DNA-Synthese zu nehmen (Abb. 4.34). Im Gegensatz zur Vermutung, dass der mitogene Effekt von exogen appliziertem HDGF nach Inhibition von endogenem HDGF verstärkt wird,^{51,52} reagierten HDGF-defiziente Fibroblasten mit gleichsam dosisabhängig gesteigerten DNA-Syntheseraten (Abb. 4.34). Im Einklang mit diesen Ergebnissen war kein Unterschied in den einzelnen Zellzyklusphasen der untersuchten Fibroblasten beider Genotypen erkennbar (Abb. 4.35). Obwohl Everett *et al.* eine Beteiligung von HDGF an der Kontrolle der Zellzyklusphasen annahmen,⁵⁵ konnten Zhang *et al.* übereinstimmend mit den oben gezeigten Beobachtungen keine Auswirkungen einer verminderten Expression von endogenem HDGF auf die Phasen des Zellzyklus feststellen.¹⁹⁵

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die bisher publizierten Daten aus *in vitro* Experimenten mit transformierten Zelllinien nicht kongruent mit den vorgestellten Untersuchungsergebnissen an einem primären HDGF-defizienten Zellkultursystem sind. Möglicherweise spielen dafür adaptive Vorgänge eine Rolle. Die Herabregulation von endogenem HDGF in einer entarteten Zelllinie, die HDGF exprimiert und dadurch HDGF in die biochemischen oder metabolischen Signalwege integriert ist, reagiert offenbar anders als eine Zelllinie, der HDGF *per se* fehlt. HDGF kann unter physiologischen Bedingungen zwar in normalen Zellen nachgewiesen werden, jedoch findet man eine ausgeprägte Expression vor allem in Tumorzellen.^{82,195} HDGF scheint im Kontext der Entartung einer Zelle eine bedeutende Funktion wahrzunehmen. Diese veränderte Rolle kann mit der bislang wenig bekannten Einbindung von HDGF in biochemische Signalwege zusammenhängen, die durch den Transformationsprozess der Zelle in den Vordergrund treten. Pan *et al.* konnten in diesem Zusammenhang durch Untersuchungen des Proteoms deutliche Unterschiede der Expressionsmuster zwischen primären Zellen und etablierten Zelllinien feststellen.¹⁹⁶

Ob die erhöhte Expression von HDGF in entarteten Zelllinien und verschiedenen Formen von Krebs ursächlich an der Entstehung und Progression von Tumoren beteiligt ist oder aber als Epiphänomen anzusehen ist, konnte bis heute nicht zweifelsfrei geklärt werden. Neuere Untersuchungen beschreiben HDGF als ein onkofetales Protein.⁹⁰ Diese Klasse

von Proteinen ist durch eine erhöhte Expression während der Fetalentwicklung und in Tumorgewebe charakterisiert, wohingegen in ausdifferenziertem Gewebe kaum eine Expression nachzuweisen ist.¹⁹⁷

5.6.3. Fehlendes HDGF hat keine Auswirkung auf die Apoptose

Machuy *et al.* beschrieben erstmals eine modulierende Funktion von HDGF auf Apoptose-signalwege.⁷¹ Neuere Studien zeigten sowohl einen pro-, als auch antiapoptotischen Einfluss von HDGF,^{56,57,59,198} ohne jedoch den genauen molekularen Mechanismus aufklären zu können. Diese Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass HDGF eine überlebenssteigernde Wirkung hat, und konsequenterweise als *survival factor* betrachtet werden kann.

Aus diesem Grund sollten die Effekte Apoptose-induzierender Stimuli an HDGF-defizienten Fibroblasten untersucht werden. Zur Aktivierung des extrinsischen Signalweges wurden Fibroblasten beider Genotypen mit TNF α und CHX inkubiert. Die Effektorcaspasen 3 und 7 wurden zwar in Abhängigkeit steigender TNF α -Konzentrationen verstärkt aktiviert, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und HDGF^{EGFP/EGFP}-Fibroblasten beobachtet werden (Abb. 4.36 A). Die Bestimmung der Zellvitalität nach TNF α /CHX-Stimulation bestätigte diese Beobachtungen. Demzufolge hat die HDGF-Defizienz keinen Einfluss auf die jeweils induzierte Apoptoserate. Da HDGF neben extrinsischen Apoptosesignalwegen auch die intrinsischen Signalkaskaden zu stimulieren vermag,⁵⁶ wurde der programmierte Zelltod zusätzlich in primären, dermalen Fibroblasten sowohl mit H₂O₂, als auch mit UV_C-Strahlung induziert. Übereinstimmend mit den bisher gezeigten Ergebnissen konnte zwar mit beiden Stimuli Apoptose induziert werden, jedoch zeigte die Zellvitalität von Wildtyp- und HDGF-defizienten Fibroblasten keine statistisch auffälligen Unterschiede (Abb. 4.37).

Unerwarteterweise scheint das Fehlen von HDGF keine modulierende Wirkung auf extrinsische oder intrinsische Apoptosesignalwege auszuüben, obwohl entsprechend den Literaturbefunden von einem deutlichen Einfluss ausgegangen werden sollte. Da eine RNAi-induzierte Herabregulation des HDGF-Gens in HeLa-Zellen (einer humanen Cervix-Karzinomzelllinie) die Freisetzung von Smac/Diablo und Cytochrom c aus den Mitochondrien nach TNF α /CHX-Stimulation unterband, wurde bislang angenommen, dass HDGF mit der Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren interagiert.⁷¹ Die *in vitro*-Reduktion von HDGF in humanen hepatozellulären beziehungsweise Colon-Karzinom-Zelllinien durch Antisense-Oligonukleotide oder RNAi induziert Apoptose sowohl durch den *Bad*-vermittelten intrinsischen Apoptoseweg,^{56,59} als auch durch den *Fas*-vermittelten

extrinsischen Signalweg.⁵⁷ Die bisherigen Literaturdaten basieren demnach auf Ergebnissen von Untersuchungen an unterschiedlich transformierten und immortalisierten Zelllinien.

Im Gegensatz dazu wurde für die Untersuchungen in dieser Arbeit ein primäres Zellkulturmodell verwendet. Bisher bekannt ist, dass neben apoptoseinduzierenden Stimuli auch das verwendete Zellsystem einen Einfluss auf die jeweils aktivierten Apoptosesignalwege hat.¹⁹⁹ Vielmehr scheint aber auch hier die erhöhte Expression von HDGF in transformierten Zellen mit einer veränderten Rolle in biochemischen Signalwegen in Zusammenhang zu stehen.⁵⁹ konnten beispielsweise zeigen, dass die Herabregulation von HDGF zu einer verminderten Expression von *Survivin* führt. Dieses Protein mit antiapoptischen Eigenschaften gehört zur Familie der *Inhibitors of apoptosis* (IAP)-Proteine²⁰⁰ und wird wie HDGF als onkofetales Protein klassifiziert. *Survivin* wird während der Fetalentwicklung und in einer Vielzahl von humanen Karzinomarten hoch exprimiert, während es in ausdifferenzierten adulten Geweben kaum nachweisbar ist.²⁰⁰

Die vermeintliche Modulation von Apoptosesignalwegen durch HDGF könnte auch als Epiphänomen der bisherigen Ergebnisse an transformierten Zelllinien angesehen werden. In diesen ist HDGF hoch exprimiert und scheint zudem in biochemische Signalwege eingebunden zu sein. Doch trotz der hohen Expression von HDGF während der Embryonalentwicklung in unterschiedlichen Organen und der Tatsache, dass funktionierende Apoptosesignalwege als essentiell für die Entwicklung eines Organismus angesehen werden,²⁰¹ zeigen HDGF-defiziente Tiere keine Auffälligkeiten bei makro- und mikroskopischer Betrachtung unterschiedlicher Gewebe. Die Ergebnisse dieser Dissertation an HDGF-defizienten Mäusen und Fibroblasten demonstrieren, dass die bislang ungeklärten Funktionen von HDGF an Apoptosevorgängen in den Hintergrund treten oder durch bislang unbekannte Proteine oder Signalwege kompensiert werden und somit phänotypisch nicht in Erscheinung treten.

5.7. HDGF – ein redundantes oder überflüssiges Protein?

5.7.1. Mechanismen biologischer Robustheit

In den letzten beiden Jahrzehnten wurde mehrere Tausend Knock-out-Mauslinien generiert. Die Knock-out-Strategie war dabei maßgeblich an der Aufklärung und dem Verständnis der Funktion von vielen Genen beteiligt. Theoretisch gesehen sollte sich die Funktion eines Proteins nach seiner genetischen Inaktivierung im Phänotyp ausprägen. Unerwartet war jedoch das Auftreten defizienter Mäuse ohne erkennbaren Phänotyp, zumal nach

Darwin's Paradigma alle Gene einen Selektionsvorteil mit sich bringen sollten.²⁰² Die Inaktivierung von vermeintlich wichtigen Genen der Maus führte in zahlreichen Fällen lediglich zu einem minimalen oder fehlenden Phänotyp. Stattdessen wurden in einigen dieser Knock-out-Mauslinien ein Phänotyp in unerwarteten Organen nachgewiesen. Kein Effekt der Defizienz war hingegen in Organen mit der höchsten Expression des Proteins zu verzeichnen, obwohl man hier die bedeutendste Funktion angenommen hatte.¹⁹⁴ So reagierte die Melanocortin-5-Rezeptor (MC5R) Knock-out-Maus zu Beginn in einer Reihe von Untersuchungen zur Phänotypisierung unauffällig, man beobachtete jedoch bei Knock-out-Tieren in einem Schwimmtest zur Bestimmung einer stressinduzierten Analgesie eine verzögerte Felltrocknung. Die verminderte Fähigkeit zur Wasserabstoßung ließ sich letztendlich durch verminderte Sebumkomponenten erklären und eine Regulation der Funktion exokriner Drüsen durch das MC5R-Gen vermuten.²⁰³

Häufig wurden derartige Beobachtungen mit einer sogenannten Redundanz von Proteinen erklärt, bei der der Verlust einer spezifischen Funktion durch ein artverwandtes Protein kompensiert wird. Die korrespondierende, genetische Redundanz basiert dabei auf dem Vorhandensein mehrerer Gene im Genom eines Organismus, sogenannten Paralogen, die für Proteine kodieren, die zumindest zu einem geringen Anteil ähnliche Funktionen ausüben können. Wird ein individuelles Gen beispielsweise durch ein gerichtetes *Gene Targeting*-Experiment inaktiviert, kann die phänotypische Auswirkung infolge einer Gegenregulation durch ein Paralog entweder minimal oder nicht vorhanden sein.²⁰⁴ Bei der Betrachtung größerer Gen-Familien, von denen jeweils alle Mitglieder erfolgreich in Mausmodellen inaktiviert wurden, zeigte mindestens eine defiziente Mutante keinen detektierbaren Phänotyp, zum Beispiel der *Phosphomannomutase 1* (Pmm1)-Knock-out der beiden Phosphomannomutase-Genfamilien²⁰⁵ oder der *Calpain 5* (Capn5)-Knock-out der sechs Knock-out-Modelle der Calpain-Genfamilie.²⁰⁶ Gleichwohl kann der Begriff „redundant“ in diesem Zusammenhang auch zutreffend im Sinne von „überflüssig“ gedeutet werden. Allerdings stellt sich dabei die Frage, wieso Proteine, die einem ausgeprägten Expressionsmuster folgend, in verschiedenen Zellen oder Organen exprimiert werden, keine spezifische Funktion erfüllen sollten.¹⁹⁴

Wie bereits dargestellt, führte die Inaktivierung von Genen in zahlreichen Beispielen zu offensichtlich gesunden und normal entwickelten Mäusen, obgleich signifikante Effekte auf den Phänotyp der bis dahin angenommenen Genfunktionen und Expressionsmuster angenommen wurden. Eine derartige Einschränkung der Ausprägung und Variabilität eines Phänotyps nach genetischen Modifikationen oder veränderten Umwelteinflüssen wird als phänotypische Robustheit (*phenotypic robustness*) bezeichnet. Resultieren genetische Veränderungen nicht in einer Variabilität des Phänotyps spricht man von genetischer Robustheit (*genetic robustness*). Hinsichtlich des evolutionären Ursprungs werden adaptive und intrinsische Robustheit unterschieden. Obgleich die Bedeutung von Robust-

heit für einen Organismus bei der Bewältigung von Umwelteinflüssen oder genetischen Veränderungen umgehend deutlich wird, sind die dafür grundlegenden Mechanismen weitgehend unverstanden. Aktuell werden in diesem Zusammenhang zwei Möglichkeiten diskutiert, die nicht unerwähnt bleiben sollen: (i) genetische Pufferung (*genetic buffering*), Organismen verfügen über alternative Signalwege für einen bestimmten Prozess und (ii) funktionelle Komplementierung (*functional complementation*), zu einem bestimmten Ausmaß sind die Funktionen von Genen redundant.²⁰⁷

5.7.2. Paraloge Redundanz von Genen

Das Genom der Maus enthält zahlreiche Genfamilien, die aus mehreren Genen ähnlicher Struktur und physiologischer Funktion zusammengesetzt sind. Es wird vermutet, dass circa 50% der murinen Gene strukturell verwandte Vertreter, das heißt Paraloge oder Pseudogene, im Genom aufweisen,²⁰⁸ die aus Genduplikationen hervorgegangen sind. Dabei wird angenommen, dass diese Gene direkt nach ihrer Duplikation komplett redundant waren und ihre spezifischen Funktionen komplett oder zumindest partiell ersetzen konnten. Im Laufe der Evolution führten gehäufte Mutationen zu einem Verlust der Genfunktion in einer Kopie oder zu einer funktionellen Divergenz in beiden Kopien.²⁰⁷ Diese sogenannte paraloge Redundanz von Genen wird oft als begründender Mechanismus eines fehlenden Phänotyps in defizienten Mauslinien angeführt. Jedoch müssen bestimmte Kriterien für eine redundante Kompensation einer Geninaktivierung erfüllt sein. Einerseits ist eine überlappende Expression, sei sie physiologisch oder durch den Verlust einer Genfunktion induziert, der betrachteten Gene Voraussetzung. Andererseits muss eine ähnliche Funktion der exprimierten Proteine gegeben sein. Klassisches Beispiel einer paralogen Redundanz stellen die Gene *MyoD* und *Myf5* dar, die in die Entwicklung der Skelettmuskulatur eingebunden sind. Während die Inaktivierung eines der beiden Gene keine Auswirkungen auf die Entwicklung der Maus hat,²⁰⁹ zeichnen sich *MyoD-Myf5*-Doppel-Knock-out-Mäuse durch ein vollständiges Fehlen von Skelettmuskulatur aus.²¹⁰

Auch für den offensichtlich fehlenden Phänotyp der HDGF-defizienten Mäuse kommt eine paraloge Redundanz als mögliche Erklärung in Betracht. Zum einen besitzt HDGF innerhalb der HDGF-Genfamilie strukturell verwandte Mitglieder und zum anderen existiert für HDGF ein Pseudogen. Während das murine HDGF-Gen auf Chromosom 3 lokalisiert ist, wurde ein dazu verwandtes Pseudogen (Gm8792²¹¹) auf Chromosom X nachgewiesen. Sein genomischer Aufbau deutet allerdings nicht auf die Expression eines funktionalen Proteins hin, das den Verlust von HDGF kompensieren würde. Für eine paraloge Gegenregulation nach Verlust des murinen HDGF-Gens kommen daher aus der HDGF-Genfamilie die HDGF-verwandten Proteine HRP-1, HRP-2, HRP-3 und

LEDGF in Frage. Da die Bildung von HRP-1 ausschließlich in den Testes beschrieben ist,²² wurde der Fokus auf die Untersuchung der Expression von HRP-2, HRP-3 und LEDGF im Gehirn gerichtet.^{21,29,212} Mit Hilfe einer quantitativen Realtime-PCR-Analyse wurden die relative Expression dieser HDGF-verwandten Proteine im neonatalen Gehirn bestimmt (Abb. 4.30). Dabei konnte keine signifikante Veränderung der Expressionshöhe von HRP-2, HRP-3 und LEDGF im Gehirn neonataler HDGF^{EGFP/EGFP}-Mäuse beobachtet werden. Eine Gegenregulation durch diese Proteine scheint im Gehirn zu diesem Zeitpunkt nicht stattzufinden. Trotz überlappender Expression der betrachteten Proteine im Gehirn ist ihre spezifische Funktion noch weitgehend unverstanden, jedoch bedingt eine ähnliche Funktion die Möglichkeit der paralogen Redundanz. Obwohl keine Hochregulation der HDGF-verwandten Proteine beobachtet wurde, kann eine Kompensation des Verlusts von HDGF durch diese Proteine nicht ausgeschlossen werden. Ungeachtet dessen können aber auch andere, bislang nicht näher untersuchte Mechanismen die Inaktivierung von HDGF ausgleichen.

5.7.3. Genetische Redundanz durch biologische Netzwerke

Neben der paralogen Redundanz von Genen stellen alternative metabolische Signalwege und regulatorische Netzwerke einen weiteren Mechanismus der Kompensation eines Genverlustes, beispielsweise durch gerichtete Inaktivierung mittels *Gene Targeting*, dar.²⁰⁷ In komplexen biologischen Netzwerken wird die Robustheit gegenüber genetischen Mutationen durch die Interaktion von Genen mit verschiedenen biochemischen Funktionen in sogenannten redundanten Netzwerken erhöht. In einem solchen metabolischen Netzwerk verbinden unterschiedliche Metaboliten Enzyme mit distinkten biochemischen Funktionen und schaffen so einen Vernetzungsgrad, der wenig anfällig gegenüber einer Schädigung ist.²¹³

Biochemische oder metabolische Netzwerke stellen demnach eine wichtige Kontrollstufe des physiologischen Gleichgewichts dar und spiegeln eindrucksvoll die Komplexität der genetischen Robustheit wieder. Zum Grundverständnis der genetischen Redundanz muss biologische Robustheit weniger als ein lineares Ursache-Wirkungs-Prinzip gesehen werden. Vielmehr sind biologische Systeme als redundante, skalenfreie oder skaleninvariante (*scale-free*) Netzwerke konzipiert.²¹⁴ Es handelt sich dabei um komplexe Netzwerke, deren Verlinkungsgrad einer Potenzierungsgesetzmäßigkeit (*power law*) unterliegt. Derartige Systeme verfügen über viele Knotenpunkte mit wenigen Verbindungen und einige Knoten mit einer hohen Anzahl von Verbindungen (Abb. 5.1 A). In einem skaleninvarianten genetischen Netzwerk agiert ein Gen nicht allein, sondern mit einer hohen Pufferkapazität durch genetische Redundanz (Abb. 5.1 B).

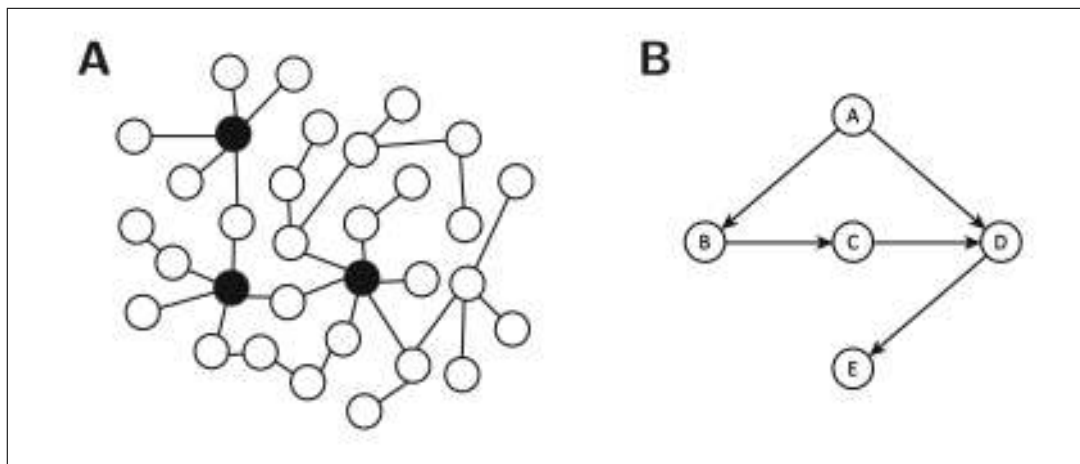


Abb. 5.1.: Genetische Redundanz durch skaleninvariante Netzwerke. (A) Schematische Darstellung eines skalenfreien Netzwerkes. Einige Knotenpunkte sind mit vielen anderen Knoten des Netzwerkes verbunden (grau, sogenannte „Hubs“), während andere Knotenpunkte vergleichsweise wenige Verbindungen aufweisen (weiß, sogenannte „non-Hubs“). (B) In einem einfachen nicht-linearen biologischen System mit fünf Knotenpunkten A bis E wird durch A die Wirkung B hervorgerufen. Unabhängig von B und C resultiert A auch in D. Wird die Verbindung von A zu D, zum Beispiel durch eine Mutation, unterbrochen, ist eine Aktivierung von D immer noch über B und C möglich. Die Robustheit dieses kleinen Netzwerkes wird demnach durch die Redundanz von B und C hervorgerufen. (Darstellung modifiziert nach Borger, 2008)²⁰²

Betrachtet man beispielsweise das Netzwerk potentieller Protein-Protein-Interaktionen (PPI) einer Zelle, so erkennt man einige Proteine, die mit vielen anderen Proteinen des Netzwerkes verbunden sind (sogenannte „Hubs“), während andere Proteine vergleichsweise wenige Verbindungen aufweisen (sogenannte „non-Hubs“).²¹⁵ Proteine, die zahlreiche Verbindungen aufweisen, vermitteln Interaktionen zwischen vielen wenig vernetzten Proteinen. Untersuchungen von Protein-Netzwerken in Hefen deuteten auf eine essentielle Überlebensfunktion von Hub-Proteinen hin. Dieses Phänomen wurde als „*central-lethality rule*“ bezeichnet.²¹⁶ Neben PPI-Netzwerken belegen auch transkriptionelle Netzwerke diese Regel. Transkriptionsfaktoren, die auf viele Zielgene wirken, tendieren ebenfalls dazu, eine unerlässliche Funktion auszuüben.²¹⁷ Zusammenfassend belegen die Studien, dass Gene, die einen Netzwerk-Hub belegen oder Interaktionen mit verschiedenen Regulatorklassen ausüben, in verstärktem Maße eine essentielle Rolle einnehmen und somit weniger zur genetischen Robustheit beitragen.

Komplexe Netzwerke stellen in einem Organismus die Funktionalität essentieller Signalwege auch bei Inaktivierung einzelner Knotenpunkte, zum Beispiel durch Mutation oder nach komplettem Verlust, sicher. Die Robustheit eines biologischen Systems wird so durch redundante Gen- beziehungsweise Proteinfunktionen gewährleistet. Eine Zelle reagiert konsequenterweise in biochemischen Prozessen nicht mit „An“ oder „Aus“, sondern versucht die Funktionalität sicherzustellen.²⁰² Darüber hinaus zeigen Untersuchungen an

Hefezellen, dass zentrale metabolische Signalwege über mehr Alternativen verfügen als andere, weniger bedeutsame Signalkaskaden. Anders als zunächst angenommen, verfügt ein Organismus häufig über parallele Signalwege, die einen Regulator mit einem regulierten Molekül verbinden.²¹⁸ Die bisher bekannten Signalwege, die an der Regulation der Leberentwicklung beteiligt sind, demonstrieren das koordinierte Zusammenspiel einer Vielzahl paralleler Prozesse (Abb. 5.2).

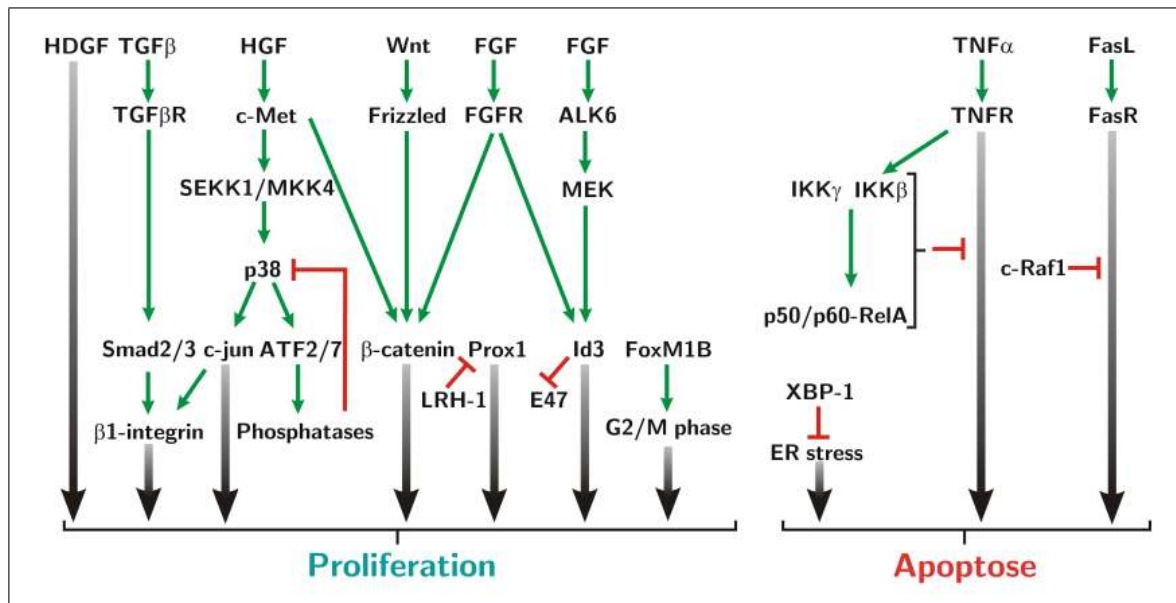


Abb. 5.2.: Regulation des Leberentwicklung. Dargestellt sind bislang bekannte Signalmoleküle und aktivierte Signalwege, die sowohl Proliferation, als auch Apoptose in Hepatoblasten kontrollieren. Die physiologische Entwicklung der Leber ist als ein komplexes Netzwerk aufzufassen und von der Koordination vieler biologischer Prozesse abhängig. (Darstellung modifiziert nach Lemaigre, 2009)²¹⁹

Die Inaktivierung von HDGF hat, wie in dieser Arbeit gezeigt, keine Auswirkungen auf die normale Differenzierung von Hepatoblasten und auf das Wachstum der Leber. Die Funktion von HDGF scheint demnach im Netzwerk paralleler Prozesse der Leber entbehrlich zu sein. Dies lässt im Kontext der Betrachtung biologischer Systeme auf Grundlage des Zusammenspiels redundanter Netzwerke darauf schließen, dass HDGF unter anderem während der Lebergenese, kein „Hub“-Protein darstellt, das von essentieller Funktionalität ist. Das Fehlen von HDGF wird durch parallele, redundante Signalwege kompensiert. Über die genauen Signalwege, in die HDGF eingebunden ist, ist bislang wenig bekannt. Ebenso gibt es aktuell nur wenig aussagekräftige Literaturdaten zu möglichen Interaktionspartnern. Mit Hilfe eines Hochdurchsatz-Lumineszenz-Ansatzes (*luminescence-based mammalian interactome mapping*) wurde SMAD4 als möglicher Interaktionspartner von HDGF identifiziert.²²⁰ Vielversprechende Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe belegen *Nucleolin* als mögliches Protein, das mit HDGF zu interagieren scheint.

Zusammenfassend betrachtet ist somit eine der großen Herausforderungen bei der Aufklärung spezifischer Proteinfunktionen durch *in vivo*-Studien mit Knock-out-Mäusen die Tatsache, dass vermeintlich defekte oder inaktivierte biologische Prozesse gewöhnlicherweise komplex sind: oft sind mehrere biochemische Signalwege als auch verschiedene Zelltypen involviert.

5.8. Ausblick

Die bisher durchgeführten Untersuchungen an HDGF-defizienten Mäusen deuten darauf hin, dass HDGF für die normale Entwicklung der Maus entbehrlich ist. Ebenso demonstrieren die Ergebnisse der Zellkulturuntersuchungen an primären dermalen Fibroblasten keine Beeinflussung apoptose- und proliferationsassoziierter Signalwege durch die Inaktivierung von endogenem HDGF.

Zahlreiche Studien beschreiben eine Überexpression von HDGF in verschiedenen Tumoren. Die Expressionsrate dieses Wachstumsfaktors korreliert mit der Aggressivität der Tumore und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten. Daher erscheint es möglich, dass HDGF bei der Entstehung von Tumoren eine bedeutende Rolle spielt. Zur Überprüfung dieser Hypothese eignen sich einerseits eine chemisch induzierte Kanzerogenese und andererseits die genetisch kodierte Induzierung von Tumoren durch Verpaarung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten HDGF-EGFP-Knock-in Mausmutante mit geeigneten transgenen Mausmodellen, die Onkogene wie c-myc oder k-Ras überexprimieren.

Ein weiterer Versuchsansatz zur Klärung, ob HDGF selbst als Onkogen fungieren kann, besteht in der Herstellung und Analyse transgener Mauslinien, die in bestimmten Zelltypen eine erhöhte HDGF-Expression im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Tieren aufweisen. Die nachfolgende Verpaarung dieser HDGF-transgenen Mauslinien mit HDGF-defizienten Mäusen erlaubt dann eine distinkte Betrachtung der HDGF-Expression bestimmter Zelltypen und die Analyse möglicher Auswirkungen der Bildung dieses Wachstumsfaktors auf Grundlage eines genetischen Hintergrunds, dem HDGF *per se* fehlt.

HDGF wurde eine Funktion als vermeintliches Alarmin zugeschrieben. Gesteigerte Expressionen von HDGF wurden in diesem Zusammenhang bei pathologisch-regenerativen Prozessen, beispielsweise während der Leberregeneration, nachgewiesen. Die gezielte Induktion regenerativer Prozesse in unterschiedlichen Organen HDGF-defizienter Mäuse, zum Beispiel in der Leber durch partielle Hepatektomie oder durch Gabe von Tetrachlormethan, oder in der Haut durch Makroläsionen der Rückenhaut, könnten zu einem besseren Verständnis von HDGF an diesen Vorgängen beitragen.

Weitere Primärkulturen aus HDGF-defizienten Mäusen, beispielsweise primäre Keratinozyten oder Astrozyten, könnten sich für weiterführende Untersuchungen der bisher nicht vollständig aufgeklärten Signaltransduktionswege eignen. Aus den primären Zellkulturen können durch Immortalisierung transformierte Zelllinien hergestellt werden, die dann als Grundlage für weitere Untersuchungen, beispielsweise in Xenograft-Mausmodellen, dienen. Darüber hinaus bieten sich HDGF-defiziente primäre oder transformierte Zelllinien als Werkzeug zur Identifizierung sowohl potentieller Interaktionspartner als auch bislang unbekannter Rezeptoren von HDGF an. Moderne Techniken der Proteom-Analyse können Hinweise auf Veränderungen der Proteinexpression in Zellen geben, denen HDGF fehlt, und damit Rückschlüsse auf die Einbindung von HDGF in Signalwege erlauben.

6. Zusammenfassung

Der *Hepatoma-derived growth factor* (HDGF) bildet zusammen mit den ihm verwandten Proteinen (HRP-1-4 und LEDGF) eine Familie großer, proteinerger Wachstumsfaktoren. Aufgrund seiner ausgeprägten Expression während der Embryogenese verschiedener Organe, darunter Herz, Niere, Leber, Lunge, Darmtrakt und Gehirn, wird eine wichtige Funktion dieses Faktors während der normalen Entwicklung angenommen. Neben seiner initial identifizierten mitogenen Eigenschaften ist HDGF auch an der Modulation von Signalwegen des programmierten Zelltodes beteiligt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine transgene Mauslinie generiert, die defizient für HDGF ist. Mit deren Hilfe wurden die Auswirkungen der Inaktivierung von HDGF auf die normale Entwicklung der Maus charakterisiert und die in zahlreichen Studien beschriebene Bedeutung dieses Faktors auf Proliferation und Apoptose untersucht.

Initial wurden Abschnitte des murinen HDGF-Gens mittels PCR amplifiziert und subkloniert. Unter Verwendung dieser Sequenzabschnitte des HDGF-Gens wurden zwei Austauschvektoren hergestellt, die (i) einen konstitutiven Reporter-gen-Knock-in mit verstärkt grün fluoreszierenden Protein (EGFP) sowie (ii) einen konditionalen Reporter-gen-Knock-in mit monomerem rot fluoreszierenden Protein (mRFP) ermöglichen sollten.

Nach homologer Rekombination des konstitutiven Targeting-Vektors in murinen embryonalen Stammzellen und anschließender Blastozysten-Injektion wurden transgene Mäuse erhalten, in denen der Bereich von Exon 2 bis Exon 6 des HDGF-Gens durch die kodierende Sequenz von EGFP derart ersetzt wurde, dass anstelle von HDGF ein funktionelles Reporterfusionsprotein aus den ersten 31 Aminosäuren des HDGF-Proteins und EGFP (HATH₁₋₃₁-EGFP) unter der Kontrolle des endogenen HDGF-Promotors exprimiert wurde.

Analysen an diesen transgenen Mäusen zeigten, dass neben der Deletion von HDGF die Expression des HATH₁₋₃₁-EGFP-Reporterproteins zur Lokalisation HDGF-exprimierender Organe in der Maus genutzt werden konnte. Durch direkten Nachweis des Reporterproteins HATH₁₋₃₁-EGFP und nachfolgende immunhistochemische Analysen konnte im Auge eine Expression von HDGF in der Cornea, dem Linsenepithel und sowohl in der

inneren als auch der äußeren Körnerzellschicht der Retina identifiziert werden. Interessanterweise war HDGF in den beiden Körnerzellschichten in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert. Neben dem Auge zeigten distinkte Areale der Milz eine Expression von HATH₁₋₃₁-EGFP. Diese Bereiche konnten der weissen Pulpa zugeordnet werden. Ausgehend von diesen neuen Erkenntnissen konnte HATH₁₋₃₁-EGFP in peripheren CD3⁺, CD4⁺- und CD8⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Unterschiede im CD4/CD8-Ratio, und daraus resultierende Auswirkungen der HDGF-Defizienz auf das Immunsystem, wurden nicht beobachtet. Detaillierte histologische Untersuchungen gaben entgegen den Ergebnissen verschiedener Studien keine Hinweise auf eine essentielle Rolle von HDGF während der Entwicklung verschiedener Organe. Darüber hinaus wurden in Verhaltenstests keine neurologischen Auffälligkeiten festgestellt. Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnte erstmals mit Hilfe eines HDGF-defizienten Mausmodells gezeigt werden, dass die Entwicklung der defizienten Tiere ohne die Ausprägung eines offensichtlichen Phänotyps verläuft und HDGF für das normale Wachstum der Maus entbehrlich ist.

In Zellkulturversuchen konnte schließlich an primären dermalen Fibroblasten der Beweis erbracht werden, dass der Verlust von endogenem HDGF keine Auswirkungen auf das Proliferationsvermögen, den Zellzyklus und die Sensitivität gegenüber exogen zugefügtem HDGF hatte. Ebenso reagierten primäre dermale Fibroblasten, denen HDGF *per se* fehlt, nicht empfindlicher gegenüber Apoptose induzierenden Stimuli oder oxidativem Stress.

Literaturverzeichnis

1. Cross, M.; Dexter, T. M. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell* 1991, 64, 271–80.
2. Aaronson, S. A.; Falco, J. P.; Taylor, W. G.; Cech, A. C.; Marchese, C.; Finch, P. W.; Rubin, J.; Weissman, B. E.; Di Fiore, P. P. Pathways in which growth factors and oncogenes interact in epithelial cell mitogenic signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 1989, 567, 122–9.
3. Aaronson, S. A.; Rubin, J. S.; Finch, P. W.; Wong, J.; Marchese, C.; Falco, J.; Taylor, W. G.; Kraus, M. H. Growth factor-regulated pathways in epithelial cell proliferation. *Am Rev Respir Dis* 1990, 142, S7–10.
4. Aaronson, S. A. Growth factors and cancer. *Science* 1991, 254, 1146–53.
5. Bradshaw, R. A.; Fujii, R.; Hondermarck, H.; Raffioni, S.; Wu, Y.; Yarski, M. Polypeptide growth factors: structure, function and mechanism of action. *Pure Appl Chem* 1994, 66, 9–14.
6. Deuel, T. F. Polypeptide growth factors: roles in normal and abnormal cell growth. *Annu Rev Cell Biol* 1987, 3, 443–92.
7. Kumar, R.; Mendelsohn, J. Polypeptide growth factors in the regulation of human tumor cell proliferation. *Curr Opin Oncol* 1991, 3, 70–4.
8. Goustin, A. S.; Leof, E. B.; Shipley, G. D.; Moses, H. L. Growth factors and cancer. *Cancer Res* 1986, 46, 1015–29.
9. McKay, I.; Leigh, I. *Growth factors and receptors: a practical approach*. Oxford University Press, 1993.
10. Sporn, M. B.; Todaro, G. J. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 1980, 303, 878–80.
11. Klagsbrun, M.; Baird, A. A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* 1991, 67, 229–31.

12. Yayon, A.; Klagsbrun, M.; Esko, J. D.; Leder, P.; Ornitz, D. M. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* **1991**, *64*, 841–8.
13. Massagué, J. Transforming growth factor- α . A model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem* **1990**, *265*, 21393–6.
14. Ryo, I.; Eisuke, M. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev* **2000**, *11*, 335–44.
15. Bosenberg, M. W.; Massagué, J. Juxtacrine cell signaling molecules. *Curr Opin Cell Biol* **1993**, *5*, 832–8.
16. Logan, A. Intracrine regulation at the nucleus—a further mechanism of growth factor activity? *J Endocrinol* **1990**, *125*, 339–43.
17. Nakamura, H.; Izumoto, Y.; Kambe, H.; Kuroda, T.; Mori, T.; Kawamura, K.; Yamamoto, H.; Kishimoto, T. Molecular cloning of complementary DNA for a novel human hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobility group-1 protein. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 25143–9.
18. Oliver, J. A.; Al-Awqati, Q. An endothelial growth factor involved in rat renal development. *J Clin Invest* **1998**, *102*, 1208–19.
19. Dietz, F.; Franken, S.; Yoshida, K.; Nakamura, H.; Kappler, J.; Gieselmann, V. The family of hepatoma-derived growth factor proteins: characterization of a new member HRP-4 and classification of its subfamilies. *Biochem J* **2002**, *366*, 491–500.
20. Ikegame, K.; Yamamoto, M.; Kishima, Y.; Enomoto, H.; Yoshida, K.; Suemura, M.; Kishimoto, T.; Nakamura, H. A new member of a hepatoma-derived growth factor gene family can translocate to the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *266*, 81–7.
21. Izumoto, Y.; Kuroda, T.; Harada, H.; Kishimoto, T.; Nakamura, H. Hepatoma-derived growth factor belongs to a gene family in mice showing significant homology in the amino terminus. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, *238*, 26–32.
22. Kuroda, T.; Tanaka, H.; Nakamura, H.; Nishimune, Y.; Kishimoto, T. Hepatoma-derived growth factor-related protein (HRP)-1 gene in spermatogenesis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *262*, 433–7.
23. Ge, H.; Si, Y.; Roeder, R. G. Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *EMBO J* **1998**, *17*, 6723–9.

24. Ge, H.; Si, Y.; Wolffe, A. P. A novel transcriptional coactivator, p52, functionally interacts with the essential splicing factor ASF/SF2. *Mol Cell* **1998**, *2*, 751–9.
25. Singh, D. P.; Kimura, A.; Chylack, L. T.; Shinohara, T. Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75) and p52 are derived from a single gene by alternative splicing. *Gene* **2000**, *242*, 265–73.
26. Vandegraaff, N.; Devroe, E.; Turlure, F.; Silver, P. A.; Engelman, A. Biochemical and genetic analyses of integrase-interacting proteins lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)/p75 and hepatoma-derived growth factor related protein 2 (HRP2) in preintegration complex function and HIV-1 replication. *Virology* **2006**, *346*, 415–26.
27. Vanegas, M.; Llano, M.; Delgado, S.; Thompson, D.; Peretz, M.; Poeschla, E. Identification of the LEDGF/p75 HIV-1 integrase-interaction domain and NLS reveals NLS-independent chromatin tethering. *J Cell Sci* **2005**, *118*, 1733–43.
28. Llano, M.; Saenz, D. T.; Meehan, A.; Wongthida, P.; Peretz, M.; Walker, W. H.; Teo, W.; Poeschla, E. M. An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science* **2006**, *314*, 461–4.
29. Abouzied, M. M.; Baader, S. L.; Dietz, F.; Kappler, J.; Gieselmann, V.; Franken, S. Expression patterns and different subcellular localization of the growth factors HDGF (hepatoma-derived growth factor) and HRP-3 (HDGF-related protein-3) suggest functions in addition to their mitogenic activity. *Biochem J* **2004**, *378*, 169–76.
30. El-Tahir, H. M.; Dietz, F.; Dringen, R.; Schwabe, K.; Strenge, K.; Kelm, S.; Abouzied, M. M.; Gieselmann, V.; Franken, S. Expression of hepatoma-derived growth factor family members in the adult central nervous system. *BMC Neurosci* **2006**, *7*, 6.
31. Abouzied, M. M.; El-Tahir, H. M.; Gieselmann, V.; Franken, S. Hepatoma-derived growth factor-related protein-3: a new neurotrophic and neurite outgrowth-promoting factor for cortical neurons. *J Neurosci Res* **2010**, *88*, 3610–20.
32. El-Tahir, H. M.; Abouzied, M. M.; Gallitzendoerfer, R.; Gieselmann, V.; Franken, S. Hepatoma-derived growth factor-related protein-3 interacts with microtubules and promotes neurite outgrowth in mouse cortical neurons. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 11637–51.
33. Sue, S. C.; Chen, J. Y.; Lee, S. C.; Wu, W. G.; Huang, T. H. Solution structure and heparin interaction of human hepatoma-derived growth factor. *J Mol Biol* **2004**, *343*, 1365–77.

34. Wang, C. H.; Davamani, F.; Sue, S. C.; Lee, S. C.; Wu, P. L.; Tang, F. M.; Shih, C.; Huang, T. H.; Wu, W. G. Cell surface heparan sulfates mediated internalization of PWWP/HATH domain of HDGF via macropinocytosis to fine-tune cell signaling process involved in and its effect on fibroblast cell migration. *Biochem J* 2010, 433, 127–38.
35. Nameki, N.; Tochio, N.; Koshiba, S.; Inoue, M.; Yabuki, T.; Aoki, M.; Seki, E.; Matsuda, T.; Fujikura, Y.; Saito, M.; Ikari, M.; Watanabe, M.; Terada, T.; Shirouzu, M.; Yoshida, M.; Hirota, H.; Tanaka, A.; Hayashizaki, Y.; Guntert, P.; Kigawa, T.; Yokoyama, S. Solution structure of the PWWP domain of the hepatoma-derived growth factor family. *Protein Sci* 2005, 14, 756–64.
36. Lukasik, S. M.; Cierpicki, T.; Borloz, M.; Grembecka, J.; Everett, A.; Bushweller, J. H. High resolution structure of the HDGF PWWP domain: a potential DNA binding domain. *Protein Sci* 2006, 15, 314–23.
37. Stec, I.; Nagl, S. B.; van Ommen, G. J.; den Dunnen, J. T. The PWWP domain: a potential protein-protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation? *FEBS Lett* 2000, 473, 1–5.
38. Qiu, C.; Sawada, K.; Zhang, X.; Cheng, X. The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds. *Nat Struct Biol* 2002, 9, 217–24.
39. Ge, Y. Z.; Pu, M. T.; Gowher, H.; Wu, H. P.; Ding, J. P.; Jeltsch, A.; Xu, G. L. Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J Biol Chem* 2004, 279, 25447–54.
40. Yang, J.; Everett, A. D. Hepatoma-derived growth factor binds DNA through the N-terminal PWWP domain. *BMC Mol Biol* 2007, 8, 101.
41. Yang, J.; Everett, A. D. Hepatoma-derived growth factor represses SET and MYND domain containing 1 gene expression through interaction with C-terminal binding protein. *J Mol Biol* 2009, 386, 938–50.
42. Everett, A. D.; Lobe, D. R.; Matsumura, M. E.; Nakamura, H.; McNamara, C. A. Hepatoma-derived growth factor stimulates smooth muscle cell growth and is expressed in vascular development. *J Clin Invest* 2000, 105, 567–75.
43. Abouzied, M. M.; El-Tahir, H. M.; Prenner, L.; Haberlein, H.; Gieselmann, V.; Franken, S. Hepatoma-derived growth factor. Significance of amino acid residues 81-100 in cell surface interaction and proliferative activity. *J Biol Chem* 2005, 280, 10945–54.

44. Wesche, J.; Malecki, J.; Wiedlocha, A.; Ehsani, M.; Marcinkowska, E.; Nilsen, T.; Olsnes, S. Two nuclear localization signals required for transport from the cytosol to the nucleus of externally added FGF-1 translocated into cells. *Biochemistry* 2005, 44, 6071–80.
45. Sheng, Z.; Lewis, J. A.; Chirico, W. J. Nuclear and nucleolar localization of 18-kDa fibroblast growth factor-2 is controlled by C-terminal signals. *J Biol Chem* 2004, 279, 40153–60.
46. Reiland, J.; Rapraeger, A. C. Heparan sulfate proteoglycan and FGF receptor target basic FGF to different intracellular destinations. *J Cell Sci* 1993, 105, 1085–93.
47. Everett, A. D.; Stoops, T.; McNamara, C. A. Nuclear targeting is required for hepatoma-derived growth factor-stimulated mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001, 276, 37564–8.
48. Kishima, Y.; Yamamoto, H.; Izumoto, Y.; Yoshida, K.; Enomoto, H.; Yamamoto, M.; Kuroda, T.; Ito, H.; Yoshizaki, K.; Nakamura, H. Hepatoma-derived growth factor stimulates cell growth after translocation to the nucleus by nuclear localization signals. *J Biol Chem* 2002, 277, 10315–22.
49. Backhaus, R.; Zehe, C.; Wegehingel, S.; Kehlenbach, A.; Schwappach, B.; Nickel, W. Unconventional protein secretion: membrane translocation of FGF-2 does not require protein unfolding. *J Cell Sci* 2004, 117, 1727–36.
50. Thakar, K.; Krocher, T.; Savant, S.; Gollnast, D.; Kelm, S.; Dietz, F. Secretion of hepatoma-derived growth factor is regulated by N-terminal processing. *Biol Chem* 2010, 391, 1401–10.
51. Enomoto, H.; Yoshida, K.; Kishima, Y.; Kinoshita, T.; Yamamoto, M.; Everett, A. D.; Miyajima, A.; Nakamura, H. Hepatoma-derived growth factor is highly expressed in developing liver and promotes fetal hepatocyte proliferation. *Hepatology* 2002, 36, 1519–27.
52. Mori, M.; Morishita, H.; Nakamura, H.; Matsuoka, H.; Yoshida, K.; Kishima, Y.; Zhou, Z.; Kida, H.; Funakoshi, T.; Goya, S.; Yoshida, M.; Kumagai, T.; Tachibana, I.; Yamamoto, Y.; Kawase, I.; Hayashi, S. Hepatoma-derived growth factor is involved in lung remodeling by stimulating epithelial growth. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, 30, 459–69.
53. Everett, A. D.; Narron, J. V.; Stoops, T.; Nakamura, H.; Tucker, A. Hepatoma-derived growth factor is a pulmonary endothelial cell-expressed angiogenic factor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, 286, L1194–201.

54. Ooi, B.; Mukhopadhyay, A.; Masilamani, J.; Do, D.; Lim, C.; Cao, X.; Lim, I.; Mao, L.; Ren, H.; Nakamura, H.; Phan, T. Hepatoma-derived growth factor and its role in keloid pathogenesis. *J Cell Mol Med* 2010, 14, 1328–1337.
55. Everett, A. D.; Prickett, T. D.; Brautigan, D. L. Hepatoma-derived growth factor is a phosphoprotein that regulates the cell cycle. *Pediatric Res* 2004, 55, 212.
56. Tsang, T. Y.; Tang, W. Y.; Tsang, W. P.; Co, N. N.; Kong, S. K.; Kwok, T. T. Downregulation of hepatoma-derived growth factor activates the Bad-mediated apoptotic pathway in human cancer cells. *Apoptosis* 2008, 13, 1135–47.
57. Tsang, T. Y.; Tang, W. Y.; Tsang, W. P.; Co, N. N.; Kong, S. K.; Kwok, T. T. Mechanistic study on growth suppression and apoptosis induction by targeting hepatoma-derived growth factor in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cell Physiol Biochem* 2009, 24, 253–62.
58. Zhang, J.; Ren, H.; Zhang, L.; Hong, W. K.; Mao, L. Small interfering RNA targeting hepatoma-derived growth factor (HDGF) induces apoptosis in lung cancer cells. *AACR Meeting Abstracts* 2004, 2004, 835.
59. Liao, F.; Dong, W.; Fan, L. Apoptosis of human colorectal carcinoma cells is induced by blocking hepatoma-derived growth factor. *Med Oncol* 2010, 27, 1219–26.
60. Okuda, Y.; Nakamura, H.; Yoshida, K.; Enomoto, H.; Uyama, H.; Hirotsu, T.; Funamoto, M.; Ito, H.; Everett, A. D.; Hada, T.; Kawase, I. Hepatoma-derived growth factor induces tumorigenesis in vivo through both direct angiogenic activity and induction of vascular endothelial growth factor. *Cancer Sci* 2003, 94, 1034–41.
61. Everett, A. D. Identification, cloning, and developmental expression of hepatoma-derived growth factor in the developing rat heart. *Dev Dyn* 2001, 222, 450–8.
62. Cilley, R. E.; Zgleszewski, S. E.; Chinoy, M. R. Fetal lung development: airway pressure enhances the expression of developmental genes. *J Pediatr Surg* 2000, 35, 113–8; discussion 119.
63. Lepourcelet, M.; Tou, L.; Cai, L.; Sawada, J.; Lazar, A. J.; Glickman, J. N.; Williamson, J. A.; Everett, A. D.; Redston, M.; Fox, E. A.; Nakatani, Y.; Shivdasani, R. A. Insights into developmental mechanisms and cancers in the mammalian intestine derived from serial analysis of gene expression and study of the hepatoma-derived growth factor (HDGF). *Development* 2005, 132, 415–27.
64. Attridge, J.; Paxton, J. B.; Everett, A. D.; Gordon, P. V. Hepatoma-derived growth factor (HDGF) may be a regulator of ileal mucosal growth during neonatal development. *Pediatric Res* 2004, 55, 2764.

65. Enomoto, H.; Yoshida, K.; Kishima, Y.; Okuda, Y.; Nakamura, H. Participation of hepatoma-derived growth factor in the regulation of fetal hepatocyte proliferation. *J Gastroenterol* 2002, 37 Suppl 14, 158–61.
66. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007, 35, 495–516.
67. Walczak, H.; Sprick, M. R. Biochemistry and function of the DISC. *Trends Biochem Sci* 2001, 26, 452–3.
68. Chinnaiyan, A. M. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1999, 1, 5–15.
69. Daniel, P. Grundlagen der Apoptose. in Ganten, D.; Ruckpaul, K., (Eds.) *Grundlagen der Molekularen Biomedizin* Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008 3rd ed. 159–203.
70. Gross, A.; McDonnell, J. M.; Korsmeyer, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999, 13, 1899–911.
71. Machuy, N.; Thiede, B.; Rajalingam, K.; Dimmler, C.; Thieck, O.; Meyer, T. F.; Rudel, T. A global approach combining proteome analysis and phenotypic screening with RNA interference yields novel apoptosis regulators. *Mol Cell Proteomics* 2005, 4, 44–55.
72. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007, 81, 1–5.
73. Zhou, Z.; Yamamoto, Y.; Sugai, F.; Yoshida, K.; Kishima, Y.; Sumi, H.; Nakamura, H.; Sakoda, S. Hepatoma-derived growth factor is a neurotrophic factor harbored in the nucleus. *J Biol Chem* 2004, 279, 27320–27326.
74. Marubuchi, S.; Okuda, T.; Tagawa, K.; Enokido, Y.; Horiuchi, D.; Shimokawa, R.; Tamura, T.; Qi, M. L.; Eishi, Y.; Watabe, K.; Shibata, M.; Nakagawa, M.; Okazawa, H. Hepatoma-derived growth factor, a new trophic factor for motor neurons, is up-regulated in the spinal cord of PQBP-1 transgenic mice before onset of degeneration. *J Neurochem* 2006, 99, 70–83.
75. Enomoto, H.; Nakamura, H.; Liu, W.; Yoshida, K.; Okuda, Y.; Imanishi, H.; Saito, M.; Shimomura, S.; Hada, T.; Nishiguchi, S. Hepatoma-derived growth factor is induced in liver regeneration. *Hepatol Res* 2009, 39, 988–97.
76. Nakamura, H.; Yoshida, K.; Ikegame, K.; Kishima, Y.; Uyama, H.; Enomoto, H. Antibodies against hepatoma-derived growth factor and mucosal repair in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 2002, 37 Suppl 14, 8–14.

77. Nahamura, H.; Yoshida, K.; Kishima, Y.; Enomoto, H.; Uyama, H.; Kuroda, T.; Okuda, Y.; Hirotsu, T.; Ito, H.; Kawase, I. Circulating auto-antibody against hepatoma-derived growth factor (HDGF) in patients with ulcerative colitis. *Hepato-gastroenterology* 2004, 51, 470–5.
78. Kao, Y. H.; Chen, C. L.; Jawan, B.; Chung, Y. H.; Sun, C. K.; Kuo, S. M.; Hu, T. H.; Lin, Y. C.; Chan, H. H.; Cheng, K. H.; Wu, D. C.; Goto, S.; Cheng, Y. F.; Chao, D.; Tai, M. H. Upregulation of hepatoma-derived growth factor is involved in murine hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 2009, 52, 96–105.
79. Ren, H.; Tang, X.; Lee, J. J.; Feng, L.; Everett, A. D.; Hong, W. K.; Khuri, F. R.; Mao, L. Expression of hepatoma-derived growth factor is a strong prognostic predictor for patients with early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004, 22, 3230–7.
80. Hu, T. H.; Huang, C. C.; Liu, L. F.; Lin, P. R.; Liu, S. Y.; Chang, H. W.; Changchien, C. S.; Lee, C. M.; Chuang, J. H.; Tai, M. H. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003, 98, 1444–56.
81. Yoshida, K.; Nakamura, H.; Okuda, Y.; Enomoto, H.; Kishima, Y.; Uyama, H.; Ito, H.; Hirasawa, T.; Inagaki, S.; Kawase, I. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003, 18, 1293–301.
82. Bernard, K.; Litman, E.; Fitzpatrick, J. L.; Shellman, Y. G.; Argast, G.; Polvinen, K.; Everett, A. D.; Fukasawa, K.; Norris, D. A.; Ahn, N. G.; Resing, K. A. Functional proteomic analysis of melanoma progression. *Cancer Res* 2003, 63, 6716–25.
83. Yamamoto, S.; Tomita, Y.; Hoshida, Y.; Morii, E.; Yasuda, T.; Doki, Y.; Aozasa, K.; Uyama, H.; Nakamura, H.; Monden, M. Expression level of hepatoma-derived growth factor correlates with tumor recurrence of esophageal carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007, 14, 2141–9.
84. Uyama, H.; Tomita, Y.; Nakamura, H.; Nakamori, S.; Zhang, B.; Hoshida, Y.; Enomoto, H.; Okuda, Y.; Sakon, M.; Aozasa, K.; Kawase, I.; Hayashi, N.; Monden, M. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for patients with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2006, 12, 6043–8.
85. Yamamoto, S.; Tomita, Y.; Hoshida, Y.; Takiguchi, S.; Fujiwara, Y.; Yasuda, T.; Doki, Y.; Yoshida, K.; Aozasa, K.; Nakamura, H.; Monden, M. Expression of hepatoma-derived growth factor is correlated with lymph node metastasis and prognosis of gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006, 12, 117–22.

86. Chang, K. C.; Tai, M. H.; Lin, J. W.; Wang, C. C.; Huang, C. C.; Hung, C. H.; Chen, C. H.; Lu, S. N.; Lee, C. M.; Changchien, C. S.; Hu, T. H. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2007, 121, 1059–65.
87. Yoshida, K.; Tomita, Y.; Okuda, Y.; Yamamoto, S.; Enomoto, H.; Uyama, H.; Ito, H.; Hoshida, Y.; Aozasa, K.; Nagano, H.; Sakon, M.; Kawase, I.; Monden, M.; Nakamura, H. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2006, 13, 159–67.
88. Hu, T. H.; Lin, J. W.; Chen, H. H.; Liu, L. F.; Chuah, S. K.; Tai, M. H. The expression and prognostic role of hepatoma-derived growth factor in colorectal stromal tumors. *Dis Colon Rectum* 2009, 52, 319–26.
89. Kudlich, T.; Melcher, R.; Wilk, M.; Lähres, H.; Scheppach, W. Bedeutung des putativen Oncogens Hepatoma Derived Growth Factor in der kolorektalen Karzinogenese und seine Regulation durch die kurzkettige Fettsäure Butyrat und TNFalpha. *Z Gastroenterol* 2006, 44, 47.
90. Enomoto, H.; Nakamura, H.; Komatsu-Kanatani, N.; Liu, Y.; Yoshida, K.; Okuda, Y.; Yamamoto, T.; Liu, W.; Nishiguchi, S. Partial blockage of hepatocyte maturation in hepatoma-derived growth factor transgenic mice. *World J Hepatol* 2009, 1, 98–102.
91. Ren, H.; Chu, Z.; Mao, L. Antibodies targeting hepatoma-derived growth factor as a novel strategy in treating lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2009, 8, 1106–12.
92. Bradley, A.; Zheng, B.; Liu, P. Thirteen years of manipulating the mouse genome: a personal history. *Int J Dev Biol* 1998, 42, 943–50.
93. Shashikant, C. S.; Ruddle, F. H. Impact of transgenic technologies on functional genomics. *Curr Issues Mol Biol* 2003, 5, 75–98.
94. Roebroek, A. J. M.; Gordts, P. L. S. M.; Reekmans, S. Knock-in approaches. in Hofker, M. H.; Deursen, J., (Eds.) *Methods Mol Biol* 2011 vol. 693 of *Methods in Molecular Biology*TM 257–75.
95. Gordon, J. W.; Ruddle, F. H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 1981, 214, 1244–6.
96. Dobie, K. W.; Lee, M.; Fantes, J. A.; Graham, E.; Clark, A. J.; Springbett, A.; Lathe, R.; McClenaghan, M. Variegated transgene expression in mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93, 6659–64.

97. Nagy, A.; Gersenstein, M.; Vintersten, K. *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2003 3rd ed.
98. Strehle, M.; Britsch, S. Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung in Ganten, D.; Ruckpaul, K., (Eds.) *Grundlagen der Molekularen Biomedizin* Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008 3rd ed. 208–41.
99. Melton, D. W. Gene targeting in the mouse. *Bioessays* 1994, 16, 633–8.
100. Evans, M. J.; Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981, 292, 154–6.
101. Smith, A. G.; Heath, J. K.; Donaldson, D. D.; Wong, G. G.; Moreau, J.; Stahl, M.; Rogers, D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988, 336, 688–90.
102. Smithies, O.; Gregg, R. G.; Boggs, S. S.; Koralewski, M. A.; Kucherlapati, R. S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985, 317, 230–4.
103. Thomas, K. R.; Capecchi, M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987, 51, 503–12.
104. Misra, R. P.; Duncan, S. A. Gene targeting in the mouse: advances in introduction of transgenes into the genome by homologous recombination. *Endocrine* 2002, 19, 229–38.
105. Deng, C.; Capecchi, M. R. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* 1992, 12, 3365–71.
106. Fujitani, Y.; Yamamoto, K.; Kobayashi, I. Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length. *Genetics* 1995, 140, 797–809.
107. Hasty, P.; Rivera-Perez, J.; Bradley, A. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1991, 11, 5586–91.
108. Magin, T. M.; McWhir, J.; Melton, D. W. A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res* 1992, 20, 3795–6.

109. Stacey, A.; Schnieke, A.; McWhir, J.; Cooper, J.; Colman, A.; Melton, D. W. Use of double-replacement gene targeting to replace the murine alpha-lactalbumin gene with its human counterpart in embryonic stem cells and mice. *Mol Cell Biol* **1994**, *14*, 1009–16.
110. Bradley, A.; Evans, M.; Kaufman, M. H.; Robertson, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **1984**, *309*, 255–6.
111. Kuhn, R.; Schwenk, F.; Aguet, M.; Rajewsky, K. Inducible gene targeting in mice. *Science* **1995**, *269*, 1427–9.
112. Lewandoski, M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* **2001**, *2*, 743–55.
113. Logie, C.; Stewart, A. F. Ligand-regulated site-specific recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 5940–44.
114. Hofker, M. H.; Deursen, J.; Saunders, T. L. Reporter molecules in genetically engineered mice. in Walker, J. M., (Ed.) *Methods Mol Biol* **2003** vol. 209 125–43 978-1-59259-340-8.
115. Cui, C.; Wani, M. A.; Wight, D.; Kopchick, J.; Stambrook, P. J. Reporter genes in transgenic mice. *Transgenic Res* **1994**, *3*, 182–94.
116. Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **1992**, *111*, 229–33.
117. Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **1994**, *263*, 802–5.
118. Hadjantonakis, A. K.; Dickinson, M. E.; Fraser, S. E.; Papaioannou, V. E. Technicolour transgenics: imaging tools for functional genomics in the mouse. *Nat Rev Genet* **2003**, *4*, 613–25.
119. Nowotschin, S.; Eakin, G. S.; Hadjantonakis, A.-K. Live-imaging fluorescent proteins in mouse embryos: multi-dimensional, multi-spectral perspectives. *Trends Biotechnol* **2009**, *27*, 266–76.
120. Cubitt, A. B.; Heim, R.; Adams, S. R.; Boyd, A. E.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **1995**, *20*, 448–55.

121. Heim, R.; Tsien, R. Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* 1996, 6, 178–82.
122. Patterson, G.; Day, R. N.; Piston, D. Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci* 2001, 114, 837–8.
123. Matz, M. V.; Lukyanov, K. A.; Lukyanov, S. A. Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *Bioessays* 2002, 24, 953–9.
124. Ikawa, M.; Kominami, K.; Yoshimura, Y.; Tanaka, K.; Nishimune, Y.; Okabe, M. Green fluorescent protein as a marker in transgenic mice. *Dev Growth Differ* 1995, 37, 455–9.
125. Hadjantonakis, A.-K.; Gertsenstein, M.; Ikawa, M.; Okabe, M.; Nagy, A. Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech Dev* 1998, 76, 79–90.
126. Hadjantonakis, A.-K.; Macmaster, S.; Nagy, A. Embryonic stem cells and mice expressing different GFP variants for multiple non-invasive reporter usage within a single animal. *BMC Biotechnol* 2002, 2, 11.
127. Baens, M.; Noels, H.; Broeckx, V.; Hagens, S.; Fevery, S.; Billiau, A. D.; Vankelecom, H.; Marynen, P. The dark side of EGFP: defective polyubiquitination. *PLoS ONE* 2006, 1, e54.
128. Matz, M. V.; Fradkov, A. F.; Labas, Y. A.; Savitsky, A. P.; Zaraisky, A. G.; Markelov, M. L.; Lukyanov, S. A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 1999, 17, 969–73.
129. Campbell, R. E.; Tour, O.; Palmer, A. E.; Steinbach, P. A.; Baird, G. S.; Zacharias, D. A.; Tsien, R. Y. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99, 7877–82.
130. Zhu, H.; Wang, G.; Li, G.; Han, M.; Xu, T.; Zhuang, Y.; Wu, X. Ubiquitous expression of mRFP1 in transgenic mice. *Genesis* 2005, 42, 86–90.
131. Nowotschin, S.; Eakin, G. S.; Hadjantonakis, A.-K. Dual transgene strategy for live visualization of chromatin and plasma membrane dynamics in murine embryonic stem cells and embryonic tissues. *Genesis* 2009, 47, 330–6.
132. Rubart, M. Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ Res* 2004, 95, 1154–66.

133. Huisken, J.; Swoger, J.; Del Bene, F.; Wittbrodt, J.; Stelzer, E. H. K. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* **2004**, *305*, 1007–9.
134. Schermelleh, L.; Heintzmann, R.; Leonhardt, H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* **2011**, *190*, 165–75.
135. Yang, M.; Baranov, E.; Jiang, P.; Sun, F.-X.; Li, X.-M.; Li, L.; Hasegawa, S.; Bouvet, M.; Al-Tuwaijri, M.; Chishima, T.; Shimada, H.; Moossa, A. R.; Penman, S.; Hoffman, R. M. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 1206–11.
136. Taniguchi, M.; Sanbo, M.; Watanabe, S.; Naruse, I.; Mishina, M.; Yagi, T. Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, *pac*: a transient gene- integration marker for ES cells. *Nucleic Acids Res* **1998**, *26*, 679–80.
137. Bullock, W.; Fernandez, J.; Short, J. XL1-Blue - A high-efficiency plasmid transforming *recA* Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **1987**, *5*, 376–9.
138. Gey, G.; Coffman, W.; Kubicek, M. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* **1952**, *12*, 264–5.
139. BioEdit, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
140. pDRAW32, AcaClone Software, <http://www.acaclone.com>.
141. Clustalw, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>.
142. Clonemanager 5, Sci-Ed Software, Cary, NC, USA, <http://www.sci-ed.com>.
143. EntrezGene, NIH, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>.
144. Ensembl Genome Browser, Welcome Trust Sanger Institute, UK, <http://www.ensembl.org/index.html>.
145. Primer3, <http://primer3.sourceforge.net>.
146. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **1989** 2nd ed.
147. Birnboim, H.; Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **1979**, *7*, 1513–23.

148. Laird, P. W.; Zijderveld, A.; Linders, K.; Rudnicki, M. A.; Jaenisch, R.; Berns, A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* **1991**, *19*, 4293.
149. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **1987**, *162*, 156–9.
150. Sanger, F.; Donelson, J. E.; Coulson, A. R.; Kossel, H.; Fischer, D. Determination of a nucleotide sequence in bacteriophage f1 DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* **1974**, *90*, 315–33.
151. Southern, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **1975**, *98*, 503–17.
152. Lehrach, H.; Diamond, D.; Wozney, J. M.; Boedtke, H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **2002**, *16*, 4743–51.
153. Degen, J. Dissertation. *Erzeugung und Charakterisierung von konditionalen Knock-In Reportergeräten-Mäusen des Connexin36*. 2003, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
154. Odermatt, B. Dissertation. *Untersuchungen zur Expression und Funktion von Connexin47 in der Maus*. 2004, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
155. Takashima, A. Establishment of fibroblast cultures. in Bonifacino, J. S., (Ed.) *Current Protocols in Cell Biology* John Wiley & Sons, Inc., **1998** chap. 2.1.
156. Mullis, K. B.; Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. in Wu, R., (Ed.) *Methods Enzymol* **1987** vol. 155 335–50.
157. Morrison, T. B.; Weis, J. J.; Wittwer, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **1998**, *24*, 954–62.
158. Wittwer, C. T.; Herrmann, M. G.; Moss, A. A.; Rasmussen, R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **1997**, *22*, 130–8.
159. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **2001**, *29*, e45.
160. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**, *193*, 265–75.
161. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–5.

162. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76, 4350–4.
163. Nunez, R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol* 2001, 3, 67–70.
164. Dunham, N. W.; Miya, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)* 1957, 46, 208–9.
165. Kuhn, P. L.; Petroulakis, E.; Zazanis, G. A.; McKinnon, R. D. Motor function analysis of myelin mutant mice using a rotarod. *Int J Dev Neurosci* 1995, 13, 715–22.
166. Longo, L.; Bygrave, A.; Grosveld, F. G.; Pandolfi, P. P. The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgenic Res* 1997, 6, 321–8.
167. Sutherland, H. G.; Newton, K.; Brownstein, D. G.; Holmes, M. C.; Kress, C.; Semple, C. A.; Bickmore, W. A. Disruption of *Ledgf/Psip1* results in perinatal mortality and homeotic skeletal transformations. *Mol Cell Biol* 2006, 26, 7201–10.
168. Barbaric, I.; Miller, G.; Dear, T. N. Appearances can be deceiving: phenotypes of knockout mice. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2007, 6, 91–103.
169. Van Meer, P.; Raber, J. Mouse behavioural analysis in systems biology. *Biochem J* 2005, 389, 593–610.
170. Calogero, S.; Grassi, F.; Aguzzi, A.; Voigtlander, T.; Ferrier, P.; Ferrari, S.; Bianchi, M. E. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet* 1999, 22, 276–80.
171. te Riele, H.; Maandag, E. R.; Berns, A. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89, 5128–32.
172. EST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Hs&CID=506748>.
173. Singh, D. P.; Ohguro, N.; Kikuchi, T.; Sueno, T.; Reddy, V. N.; Yuge, K.; Chylack, L. T.; Shinohara, T. Lens epithelium-derived growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 267, 373–81.

174. Mosevitsky, M. I.; Novitskaya, V. A.; Iogannsen, M. G.; Zabezhinsky, M. A. Tissue specificity of nucleo-cytoplasmic distribution of HMG1 and HMG2 proteins and their probable functions. *Eur J Biochem* 1989, 185, 303–10.
175. Vandromme, M.; Gauthier-Rouvière, C.; Lamb, N.; Fernandez, A. Regulation of transcription factor localization: fine-tuning of gene expression. *Trends Biochem Sci* 1996, 21, 59–64.
176. Trost, M.; English, L.; Lemieux, S.; Courcelles, M.; Desjardins, M.; Thibault, P. The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity* 2009, 30, 143–54.
177. Wiedlocha, A.; Nilsen, T.; Wesche, J.; Sorensen, V.; Malecki, J.; Marcinkowska, E.; Olsnes, S. Phosphorylation-regulated nucleocytoplasmic trafficking of internalized fibroblast growth factor-1. *Mol Biol Cell* 2005, 16, 794–810.
178. Nilsen, T.; Rosendal, K. R.; Sorensen, V.; Wesche, J.; Olsnes, S.; Wiedlocha, A. A nuclear export sequence located on a beta-strand in fibroblast growth factor-1. *J Biol Chem* 2007, 282, 26245–56.
179. la Cour, T.; Kiemer, L.; Molgaard, A.; Gupta, R.; Skriver, K.; Brunak, S. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 2004, 17, 527–36.
180. NetNES, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES>.
181. Ginisty, H.; Sicard, H.; Roger, B.; Bouvet, P. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* 1999, 112, 761–72.
182. Jerke, U.; Tkachuk, S.; Kiyan, J.; Stepanova, V.; Kusch, A.; Hinz, M.; Dietz, R.; Haller, H.; Fuhrman, B.; Dumler, I. Stat1 nuclear translocation by nucleolin upon monocyte differentiation. *PLoS ONE* 2009, 4, e8302.
183. Myrick, C.; DiGuisto, R.; DeWolfe, J.; Bowen, E.; Kappler, J.; Marrack, P.; Wakeland, E. K. Linkage analysis of variations in CD4:CD8 T cell subsets between C57BL/6 and DBA/2. *Genes Immun* 2002, 3, 144–50 1466-4879.
184. Petkova, S. B.; Yuan, R.; Tsaih, S.-W.; Schott, W.; Roopenian, D. C.; Paigen, B. Genetic influence on immune phenotype revealed strain-specific variations in peripheral blood lineages. *Physiol Genomics* 2008, 34, 304–14.
185. Hess, K.; Yang, Y.; Golech, S.; Sharov, A.; Becker, K. G.; Weng, N. P. Kinetic assessment of general gene expression changes during human naive CD4+ T cell activation. *Int Immunol* 2004, 16, 1711–21.

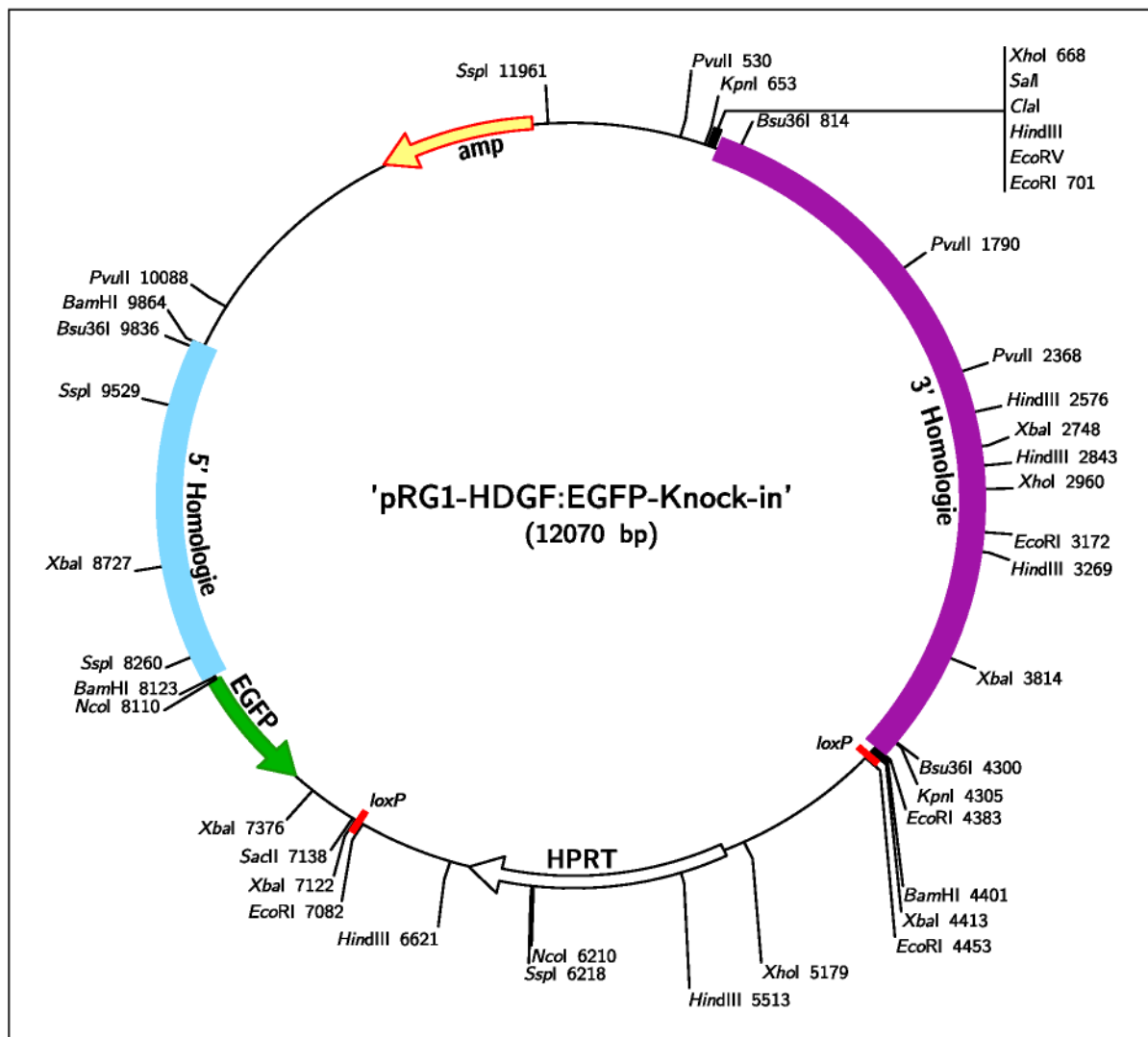
186. Heath, J. K.; Smith, A. G. Growth factors in embryogenesis. *Br Med Bull* 1989, 45, 319–36.
187. EST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Mm.292208>.
188. Thompson, S.; Clarke, A. R.; Pow, A. M.; Hooper, M. L.; Melton, D. W. Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* 1989, 56, 313–21.
189. Tanahashi, T.; Suzuki, M.; Mitsui, Y. FGF-1 is a heparin-independent mitogen for rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 1995, 218, 233–40.
190. Jung, J.; Zheng, M.; Goldfarb, M.; Zaret, K. S. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999, 284, 1998–2003.
191. Jaye, M.; Lyall, R. M.; Mudd, R.; Schlessinger, J.; Sarver, N. Expression of acidic fibroblast growth factor cDNA confers growth advantage and tumorigenesis to Swiss 3T3 cells. *EMBO J* 1988, 7, 963–9.
192. Miller, D. L.; Ortega, S.; Bashayan, O.; Basch, R.; Basilico, C. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 2000, 20, 2260–8.
193. Saga, Y.; Yagi, T.; Ikawa, Y.; Sakakura, T.; Aizawa, S. Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev* 1992, 6, 1821–31.
194. Erickson, H. P. Gene knockouts of c-src, transforming growth factor beta 1, and tenascin suggest superfluous, nonfunctional expression of proteins. *J Cell Biol* 1993, 120, 1079–81.
195. Zhang, J.; Ren, H.; Yuan, P.; Lang, W.; Zhang, L.; Mao, L. Down-regulation of hepatoma-derived growth factor inhibits anchorage-independent growth and invasion of non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2006, 66, 18–23.
196. Pan, C.; Kumar, C.; Bohl, S.; Klingmueller, U.; Mann, M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics* 2009, 8, 443–50.
197. Adinolfi, M.; Lessof, M. H. Cancer, Oncogenes and Oncofetal Antigens. *QJM* 1985, 54, 193–204.
198. Clermont, F.; Gonzalez, N. S.; Communi, D.; Franken, S.; Dumont, J. E.; Robaye, B. HDGF is dephosphorylated during the early steps of endothelial cell apoptosis in a caspase-dependent way. *J Cell Biochem* 2008, 104, 1161–71.

199. Wolbers, F.; Buijtenhuijs, P.; Haanen, C.; Vermes, I. Apoptotic cell death kinetics in vitro depend on the cell types and the inducers used. *Apoptosis* 2004, 9, 385–92.
200. Ambrosini, G.; Adida, C.; Altieri, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997, 3, 917–21.
201. Meier, P.; Finch, A.; Evan, G. Apoptosis in development. *Nature* 2000, 407, 796–801.
202. Borger, P. Evidence for the design of life: part 1—genetic redundancy. *J Creation* 2008, 22, 79–84.
203. Chen, W.; Kelly, M. A.; Opitz-Araya, X.; Thomas, R. E.; Low, M. J.; Cone, R. D. Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell* 1997, 91, 789–98.
204. Pérez-Pérez, J. M.; Candela, H.; Micol, J. L. Understanding synergy in genetic interactions. *Trends Genet* 2009, 25, 368–76.
205. Cromphout, K.; Vleugels, W.; Heykants, L.; Schollen, E.; Keldermans, L.; Sciote, R.; D’Hooge, R.; De Deyn, P. P.; von Figura, K.; Hartmann, D.; Korner, C.; Matthijs, G. The normal phenotype of Pmm1-deficient mice suggests that Pmm1 is not essential for normal mouse development. *Mol Cell Biol* 2006, 26, 5621–35.
206. Franz, T.; Winckler, L.; Boehm, T.; Dear, T. N. Capn5 is expressed in a subset of T cells and is dispensable for development. *Mol Cell Biol* 2004, 24, 1649–54.
207. Gu, Z.; Steinmetz, L. M.; Gu, X.; Scharfe, C.; Davis, R. W.; Li, W.-H. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* 2003, 421, 63–6.
208. Waterston, R. H.; Lindblad-Toh, K.; Birney, E.; Rogers, J.; Abril, J. F.; et. al Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002, 420, 520–62.
209. Rudnicki, M. A.; Braun, T.; Hinuma, S.; Jaenisch, R. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 1992, 71, 383–90.
210. Rudnicki, M. A.; Schnegelsberg, P. N.; Stead, R. H.; Braun, T.; Arnold, H. H.; Jaenisch, R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 1993, 75, 1351–9.
211. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?Term=related_functional_gene_15191\[group\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?Term=related_functional_gene_15191[group]).

212. Chylack, J. L. T.; Fu, L.; Mancini, R.; Martin-Rehrmann, M. D.; Saunders, A. J.; Konopka, G.; Tian, D.; Hedley-Whyte, E. T.; Folkerth, R. D.; Goldstein, L. E. Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75) expression in fetal and adult human brain. *Exp Eye Res* 2004, 79, 941–8.
213. Kitami, T.; Nadeau, J. H. Biochemical networking contributes more to genetic buffering in human and mouse metabolic pathways than does gene duplication. *Nat Genet* 2002, 32, 191–4.
214. Barabási, A.-L.; Albert, R. Emergence of Scaling in Random Networks. *Science* 1999, 286, 509–12.
215. He, X.; Zhang, J. Why do hubs tend to be essential in protein networks? *PLoS Genet* 2006, 2, e88.
216. Jeong, H.; Mason, S. P.; Barabasi, A. L.; Oltvai, Z. N. Lethality and centrality in protein networks. *Nature* 2001, 411, 41–2.
217. Yu, H.; Luscombe, N. M.; Qian, J.; Gerstein, M. Genomic analysis of gene expression relationships in transcriptional regulatory networks. *Trends Genet* 2003, 19, 422–7.
218. Wagner, A.; Wright, J. Alternative routes and mutational robustness in complex regulatory networks. *Biosystems* 2007, 88, 163–72.
219. Lemaigre, F. P. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology* 2009, 137, 62–79.
220. Barrios-Rodiles, M.; Brown, K. R.; Ozdamar, B.; Bose, R.; Liu, Z.; Donovan, R. S.; Shinjo, F.; Liu, Y.; Dembowy, J.; Taylor, I. W.; Luga, V.; Przulj, N.; Robinson, M.; Suzuki, H.; Hayashizaki, Y.; Jurisica, I.; Wrana, J. L. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* 2005, 307, 1621–5.

A. Anhang

Zur Verdeutlichung des in Abbildung 4.4 gezeigten Agarosegels der Überprüfung von 'pRG1-HDGF:EGFP-Knock-in' ist nachfolgend die Vektorkarte des Austauschvektors mit den jeweiligen Schnittstellen der Restriktionsenzyme dargestellt.



Erklärung

Hiermit versichere ich, Rainer Gallitzendörfer, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ferner erkläre ich, die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Bonn, März 2011

Rainer Gallitzendörfer

