

Biochemische und molekularbiologische Studien
zur Funktionsanalyse der
UDP-Galaktose: Ceramid Galaktosyltransferase

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Stefan Meinzing

aus Burscheid/Rheinland

2004

Berichtersteller:

**Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel
Prof. Dr. U. Flügge**

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2005

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel danke ich für die interessante Themenstellung, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. U. Flügge danke ich für die Übernahme des Coreferats.

Bedanken möchte ich mich bei

Frau Britta Jenke, Frau Barbara Blöck, Frau Erika Binczek, Frau Claudia Tapprogge und Frau Brigitte Handwerk für die immer vorhandene Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung,

Frau Dipl. Chem. Christine Kiss, Frau Dipl. Biol. Ina Hammels, Herrn Dipl. Biol. Robert Günter und Herrn Dipl. Biol. Nikolay Kolev für die nette Arbeitsatmosphäre, Unterstützung und Hilfe,

Herrn Dr. Markus Zumbansen, Herrn Dr. Lennart von Hoch und Herrn Dr. Dirk Kasel. für die Hilfe und Diskussionen, sowie für manchen Abend.

Mein besonderer Dank gilt:

meinen Eltern, meiner Familie und natürlich meinem Krümel

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Glykosphingolipide.....</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Stoffwechsel der Glykosphingolipide</i>	<i>1</i>
1.2.1	Biosynthese.....	1
1.2.2	Katabolismus	3
1.3	<i>Struktur und Funktionen der Galaktocerebroside und Sulfatide.....</i>	<i>3</i>
1.4	<i>UDP-Galaktose: Ceramid Galaktosyltransferase (CGT)</i>	<i>6</i>
1.5	<i>CGT-defiziente Mauslinie (konventionelle Genablation)</i>	<i>9</i>
1.6	<i>Transgene Mausmodelle</i>	<i>11</i>
1.7	<i>Gene Targeting.....</i>	<i>12</i>
1.8	<i>Konditionierte Genausschaltung.....</i>	<i>15</i>
1.9	<i>Das Cre/loxP System</i>	<i>15</i>
1.10	<i>Das TetR System.....</i>	<i>16</i>
2	AUFGABENSTELLUNG.....	18
3	ERGEBNISSE.....	19
3.1	<i>Erzeugung der konditionierten cgt defizienten Mauslinie.....</i>	<i>19</i>
3.1.1	CGTloxP3 targeting Konstrukt.....	19
3.1.2	Überprüfung des targeting Vektors.....	21
3.1.3	Herstellung und Analyse rekombinanter ES-Zell Klone	22
3.1.4	Transiente Cre Expression.....	24
3.1.5	Charakterisierung der homolog rekombinierten ES-Zell Klone.	28
3.1.6	Blastozysteninjektion und Rückkreuzungsexperimente	29
3.2	<i>Erstellung einer induzierbaren, myelinspezifischen Cre</i>	
	<i>Exprimierenden Mauslinie</i>	<i>34</i>
3.2.1	Klonierungsstrategie	35
3.2.2	Charakterisierung von pinduzCREantisense	36
3.2.3	Transfektion von Olineu Zellen.....	39
3.2.4	Vorkerninjektion und Etablierung der Mauslinie.....	40
3.2.5	Genotypisierung der transgenen Mäuse	40
3.2.6	Kreuzung mit der ROSA26βgeo Mauslinie	41

3.2.7	Analyse der induzCRE/ROSA26betageo Mäuse.....	42
3.2.7.1	β-Galaktosidase Färbung und Fluoreszenzanalyse	42
3.2.7.2	RT-PCR Analyse	44
3.3	<i>Analyse des putativen Promoterbereiches der murinen CGT</i>	46
3.3.2	Klonierungsstrategien.....	46
3.3.2	EGFP Fluoreszenzanalyse	48
3.3.2	CAT-Assay Analyse	50
3.4	<i>Antikörpersynthese</i>	52
3.4.1	Klonierungsstrategie und Charakterisierung des Expressionsvektors	52
3.4.2	Proteinexpression, Aufreinigung und Charakterisierung	54
3.5	<i>Analyse der funktionellen Expression von CGT Mutanten in HEK293 Zellen</i>	58
3.5.1	CGT Aktivitätsbestimmung der Glykosylierungsmutanten.....	61
3.5.2	Bestimmung der in vivo Halbwertzeiten	63
3.5.3	Aktivität und subzelluläre Lokalisation der trunkierten Mutanten	65
3.5.4	Lipidanalyse der trunkierten Mutanten	68
4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	72
5	DISKUSSION UND AUSBLICK.....	74
5.1	<i>Gene targeting</i>	74
5.2	<i>Transiente Cre-Expression</i>	74
5.3	<i>Injektion, Rückkreuzung und ES-Zell Analyse</i>	75
5.4	<i>Erstellung einer induzierbaren, myelinspezifischen Cre Exprimierenden Mauslinie</i>	77
5.5	<i>Analyse des putativen Promoterbereiches der murinen CGT</i>	80
5.6	<i>Analyse der funktionelle Expression von CGT Mutanten in HEK293 Zellen</i>	81
6	MATERIAL UND METHODEN	84
6.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	84
6.1.1	DNA Präparationen	84
6.1.2	Gewinnung von genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien	84
6.1.3	Gewinnung von genomischer DNA aus ES-Zellen.....	85

6.1.4	Restriktionsanalysen.....	85
6.1.4.1	Genomische DNA.....	85
6.1.4.2	Plasmid-DNA.....	85
6.1.5	Linearisierung der replacement-Vektoren.....	86
6.1.6	Elektrophorese und Hybridisierungsanalyse von Nukleinsäuren	86
6.1.7	Radioaktive DNA - Markierung.....	87
6.1.8	Ligation.....	87
6.1.9	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen.....	88
6.1.10	Sequenzierungen.....	88
6.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	88
6.1.12	RNA Präparation.....	89
6.1.13	Reverse-Transkription.....	89
6.1.14	Quantitative RT-PCR.....	89
6.2	<i>Immunologische Methoden.....</i>	90
6.2.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	90
6.2.2	Western Blot.....	90
6.3	<i>Prüfung des Differenzierungszustandes von ES-Zellen.....</i>	91
6.3.1	Alkalische Phosphatase Färbung.....	91
6.3.2	EKMA7 Antikörperfärbung.....	92
6.3.3	Immunfärbungen an Gefrier- und Paraffinschnitten.....	92
6.3.3.1	Paraffinschnitte.....	92
6.3.3.2	Kryoschnitte.....	93
6.3.4	Immunfärbungen an Zellen.....	94
6.3.5	EGFP Fluoreszenz Analyse.....	94
6.4	<i>Biochemische Methoden.....</i>	95
6.4.1	Lipidanalyse.....	95
6.4.1.1	Lipidextraktion aus Zellen.....	95
6.4.1.2	Lipidextraktion von Organen.....	95
6.4.1.3	Darstellung der alkali-stabilen Lipide.....	95
6.4.1.4	Präparationen für die Gaschromatographie.....	96
6.4.1.5	Dünnschichtchromatographie.....	96
6.4.1.6	Gaschromatographie.....	97
6.4.2	CGT Enzymtest.....	97
6.4.3	NPT Enzymtest.....	98
6.4.4	Myelinpräparationen.....	99
6.4.5	Quantifizierung von Proteinen.....	99

6.4.6	X-Gal Färbung von Gewebeschnitten	100
6.5	Methoden zur Erzeugung eines polyklonalen Antikörpers	100
6.5.1	Proteinexpression und Affinitätsreinigung im pET-System.....	100
6.5.2	Immunisierung von Kaninchen.....	101
6.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	102
6.5.4	CuCl ₂ Färbung von Gelen.....	102
6.5.5	Elektroelution von Proteinen	102
6.5.6	Ponceau S Färbung	103
6.6	Zellbiologische Methoden	103
6.6.1	Kultur von Olineu Zellen.....	103
6.6.2	Kultur von HEK Zellen	104
6.6.3	Kultur von embryonalen Stammzellen.....	104
6.6.4	Selektion potentiell positiver ES-Zell-Klone	105
6.6.5	Isolation selektionierter ES-Zell-Klone	105
6.6.6	Kryokonservierung von ES-Zellen	106
6.6.7	Auftauen und Expansion positiver Zellklone	106
6.6.8	Transiente Cre-Expression	106
6.6.9	Karyotypbestimmung	107
6.7	Methoden zur in vivo Mutagenese.....	108
6.7.1	Mäusezucht	108
6.7.2	Blastozysteninjektion	108
6.7.3	Mikroinjektion.....	109
6.7.4	Herstellung von Haltekapillaren	109
6.7.5	Vasektomierte Männchen.....	110
6.8	Computergestützte Sequenz-Auswertungen.....	110
6.9	Material	111
7	ANHANG	115
7.1	Oligonukleotide.....	115
7.2	Abkürzungen:.....	117
7.3	Sequenzen:.....	119
7.3.1	CGT Expresionsvektoren	119
7.3.1.1	C-term:.....	119
7.3.1.2	N-term:.....	119
7.3.2	3kbcgt5'utrI Sequenz.....	121

8	LITERATUR.....	123
----------	-----------------------	------------

KURZZUSAMMENFASSUNG

ABSTRACT

ERKLÄRUNG

LEBENS LAUF

1 Einleitung

1.1 Glykosphingolipide

In der Lipiddoppelschicht der Myelinmembran sind Glykosphingolipide in hoher Konzentration, asymmetrisch, vorwiegend auf der extrazellulären Seite angeordnet (siehe Abb.1)(Hucho 1982, Stoffel und Bosio 1997). Ihnen wird eine Funktion als Rezeptoren für Neurotoxine, in der Zellerkennung und der Entwicklung des Nervensystems zugeschrieben (Hucho 1982). Weiterhin wird über Einflüsse auf die transmembranale Signaltransduktion berichtet (Benjamins und Dyer 1990, Boggs und Wang 2001, Hakomori 1990).

1.2 Stoffwechsel der Glykosphingolipide

1.2.1 Biosynthese

Die Synthese der Glykosphingolipide beginnt mit der Übertragung eines Palmitatrestes von PalmitoylCoA auf Serin durch die L-Serin-Palmityltransferase. Das daraus resultierende 3-Ketosphinganin wird durch die 3-Ketosphinganin-Reduktase zu Sphinganin reduziert. Die AcylCoA-Transferase verknüpft eine aktivierte Fettsäure über eine Amidbindung mit dem Sphinganin und bildet so Dihydroceramid. Durch die Aktivität der Dihydroceramid-Desaturase wird dieses zu Ceramid umgesetzt. Ausgehend von Ceramid entstehen durch die Addition von Monoglykosideinheiten Gluko- und Galaktocerebroside, wobei letztere durch die Übertragung einer Sulfatgruppe von 3-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf den Zucker katalysiert durch eine entsprechende Sulfotransferase zu Sulfatiden umgesetzt werden können. Die Kohlenhydrate werden, mit Ausnahme von N-Acetylneuraminsäure, Mannose und Fucose, durch Uridintriphosphat (UTP) aktiviert und zu Uridindiphosphat-(UDP)-Zuckern umgesetzt. Während N-Acetylneuraminsäure als Cytidinmonophosphatderivat aktiviert wird, geschieht dies bei Mannose und Fucose über Guanidindiphosphat .

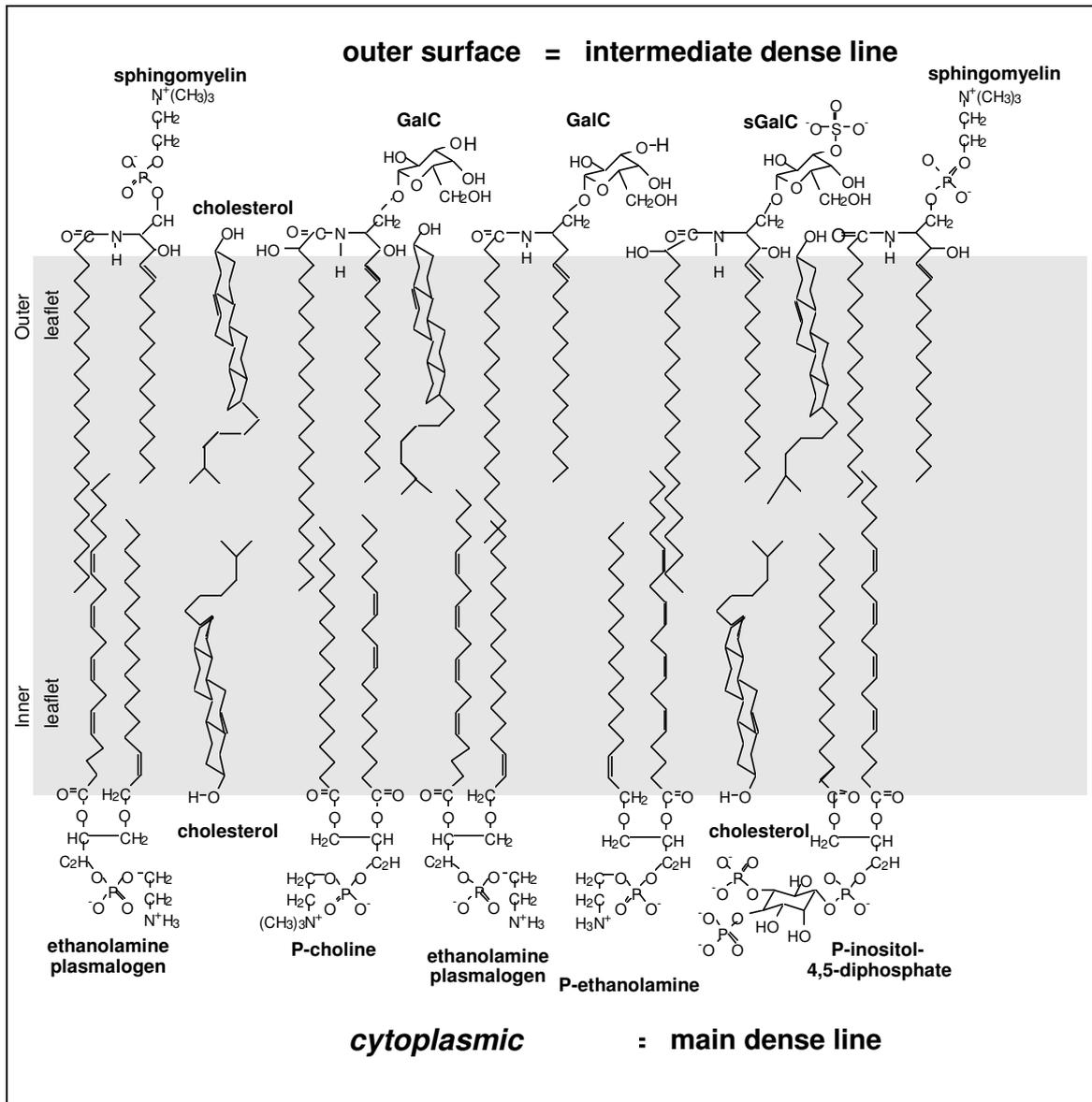


Abb.1: Asymmetrische Verteilung der Lipide in der Myelinmembran (nach Stoffel 1997); Sphingolipide liegen in der äußeren Membranschicht, Phospholipide in der inneren, Cholesterin kommt in beiden Membranschichten vor (Stoffel und Bosio 1997)

Durch die Addition weiterer Kohlenhydrateinheiten auf Laktosylceramid können komplexere Glykosphingolipide, die Globoside und Ganglioside entstehen. Während Globoside neutrale Ceramidoligosaccharide darstellen, enthalten Ganglioside mindestens einen Sialinsäurerest in ihrer Oligosaccharidkopfgruppe und sind negativ geladen. Ganglioside wurden erstmals 1935 in Hirngewebe entdeckt (Klenk 1935), wo sie in besonders großen Mengen vorkommen. Die Synthese der Ganglioside findet, ausgehend vom Laktosylceramid, an der luminalen Oberfläche der Golgi-Membran statt.

1.2.2 Katabolismus

Der Abbau der Sphingoglykolipide geschieht in Lysosomen, in denen durch eine Reihe von Glykosidasen die einzelnen Saccharide abgespaltet werden. Das daraus entstehende Ceramid wird schließlich durch Ceramidasen zu Sphingosin und einer freien Fettsäure gespalten. Sphingoglykolipide mit kurzen Oligosaccharidkopfgruppen werden unter Mitwirkung eines Sphingolipid-Aktivator Proteins (SAP) abgebaut (van Echten und Sandhoff 1989, van Echten und Sandhoff 1993). Fehlen diese oder sind inaktiv, so sind die entsprechenden Lysosomen stabiler gegen den Abbau, was als ein Hinweis auf eine eventuelle Schutzfunktion der Sphingoglykolipide für Plasmamembranen gewertet wird (Sandhoff und Klein 1994).

Der genetische Defekt oder das Fehlen einzelner lysosomaler Enzyme führt zu einer Reihe von Sphingolipidspeicherkrankheiten, wie z.B. die Tay-Sachs-, Niemann-Pick- und die Krabbe-Krankheit (Sandhoff 1977). Meist führen diese Erkrankungen zu umfangreichen Lipidablagerungen in den Lysosomen, die begleitet von geistiger Retardierung zum Tod des Erkrankten innerhalb des ersten Lebensjahrzehnts führen. Die Therapiemöglichkeiten sind stark limitiert und nur in seltenen Fällen für Patienten der adulten Form der Gaucher Krankheit durch Supplementation mit einer modifizierten Glukocerebrosidase belegt, wo sie nur die nicht neurologischen Symptome lindern (Kolter und Sandhoff 1998, Watts 2003). Vielversprechende Ansätze für die Therapie der neurologischen Symptome liegen für die Zukunft z.B. in der somatischen Gentherapie durch viralen Transfer (Gieselmann, et al. 2003) und der Kontrolle der Sphingolipid-synthese (Butters, et al. 2003, Platt, et al. 2003).

1.3 Struktur und Funktionen der Galaktocerebroside und Sulfatide

Galaktocerebroside (GalC) und Sulfatide (sGalC) werden als myelinspezifische Glykosphingolipide während der Entwicklung im Hirn nachgewiesen (Monge, et al. 1988) und sind somit bei der Betrachtung dieses Membransystems von großem Interesse. Geringe Mengen wurden auch im Axolemma (DeVries und Norton 1974), sowie in anderen Geweben, wie Milz, Niere (Costantino-Ceccarini und Morell 1973), Dickdarmepithel (Yahi, et al. 1992) und Muttermilch (Newburg und

Chaturvedi 1992) nachgewiesen. sGalC werden durch eine Cerebrosid Sulfotransferase gebildet und wurden in Zellen der Langerhansschen Inseln und Glomeruli gefunden (Buschard, et al. 1994). Die von der gleichen Sulfotransferase gebildeten Seminolipide (HSO_3 -3-Monogalaktosylalkylacyl-Glycerole) haben eine essentielle Funktion in der Spermatogenese, wie UDP-Galaktose: Ceramid Galaktosyltransferase (CGT)- und Sulfotransferase defiziente Mäuse gezeigt haben (Fujimoto, et al. 2000, Honke, et al. 2002). Zudem wird über eine Beteiligung von GalC in Epithelzellen an der HIV-1 Infektion berichtet (Yahi, et al. 1994). Im Laufe der Evolution traten mit zunehmender Komplexität des ZNS neben die Glukocerebroside die Galaktocerebroside (Stoffel und Bosio 1997). Die hohen Cerebrosid-Konzentrationen in der Myelinmembran lassen eine oder mehrere wichtige Funktionen vermuten. Daher beziehen sich die meisten Untersuchungen zur Funktion der Galaktocerebroside auf dieses Membransystem. GalC und sGalC der Myelinmembran sind mit normalen und hydroxylierten, langkettigen Fettsäuren acyliert. Sie sind durch ihre Kettenlänge (18-26 Kohlenstoffatome) und einen hohen Sättigungsgrad gekennzeichnet (Bosio 1997, DeVries und Norton 1974, JS und Rouser 1964). Unter ihnen sind Nervon- und Oxynervonsäure besonders typisch für Sphingolipide (Bosio 1997). Die im Lumen des ER gebildeten GalC können auf die zytosolische Seite „flippen“, wohingegen komplexe Glykosphingolipide und Sphingomyelin, die im Golgi-Apparat gebildet werden, dies nicht vermögen (Burger, et al. 1996, van Meer und Lisman 2002). Sowohl der hydrophobe, als auch der polare Anteil der Cerebroside tragen entscheidend zu den Eigenschaften, wie Fluidität und Polarität der Membranoberfläche bei. Die Phasenübergangstemperatur von fest nach flüssig liegt weit über der Körpertemperatur, so dass Glykolipide bei 37°C in einem parakristallinen Zustand vorliegen. In wässrigen Dispersionen von NFA(*non-hydroxylated fatty acids*)- und HFA(*α -hydroxy fatty acids*)-GalC wurden Phasenübergangstemperaturen von 80°C bzw. 72°C mittels FTIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*) ermittelt, die einen Übergang von einer lamellarkristallinen zu einer flüssig-kristallinen Phase indizieren (Bou Khalil, et al. 2001). Man nimmt an, dass die Glykolipide in der „flüssigen“ Membran zusammen mit Membran-Proteinen „feste“ Inseln bilden, die Funktionen im „sorting“ von Membranproteinen und in der Organisation der Signaltransduktion haben (Bosio 1997, Stoffel und Bosio 1997, van Meer und Lisman 2002).

Die hohen Phasenumwandlungstemperaturen von NFA- und HFA-GalC Gemischen aus Rinderhirn (Bou Khalil, et al. 2001, Haas und Shipley 1995) lassen sich zu einem großen Teil durch die parallele Anordnung der Galaktosylgruppe zur Membranebene erklären, die die Ausbildung von bis zu acht intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen des Galaktosemoleküls und den Amidgruppen der Ceramide, sowie der Hydroxylgruppe der Fettsäuren ermöglicht (Pascher, et al. 1992). Diese Annahme wird durch Kernspin-Resonanz-Untersuchungen unterstützt (Skarjune und Oldfield 1979a, Skarjune und Oldfield 1979b, Skarjune und Oldfield 1982). Sie zeigen, dass in GalC die Acylgruppen nur eine geringe Mobilität besitzen.

Ausgehend von der Beobachtung, dass GalC als erster Marker bei der Differenzierung von Oligodendrozyten an der Zelloberfläche auftaucht (Raff, et al. 1978), werden sie als Differenzierungsmarker von Oligodendrozytenvorläuferzellen genutzt. Sulfatide sind das Epitop für den Oligodendrozytenmarker O4 (Sommer und Schachner 1981). Ihnen wird eine Aufgabe in der Entwicklung dieser Zellen zugeschrieben. Einen Hinweis auf eine Beteiligung der GalC an einer möglichen Signaltransduktion gaben Experimente, in denen die Differenzierung der Oligodendrozyten und die Entwicklung der Myelinmembran durch AntiGalC-Antikörper unterdrückt wurden (Bansal und Pfeiffer 1989). Auch ein durch Anti-GalC-Antikörper verursachter Ca^{2+} -Einstrom, gekoppelt mit einer Reorganisation des Cytoskeletts wurde als weiterer Hinweis darauf gewertet (Benjamins und Dyer 1990, Dyer 1993, Dyer und Benjamins 1991).

Dem Schlüsselenzym für die GalC und sGalC Synthese, der UDP-Galaktose: Ceramid Galaktosyltransferase (CGT), kommt für alle diese strukturellen und funktionellen Eigenschaften somit eine herausragende Bedeutung zu.

1.4 UDP-Galaktose: Ceramid Galaktosyltransferase (CGT)

Die UDP-Galaktose: Ceramid Galaktosyltransferase (CGT; EC 2.4.1.45) ist das Schlüsselenzym der GalC- und sGalC-Synthese in Oligodendrozyten und Schwann'schen Zellen, also den myelinbildenden Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems (Bosio 1997, Stoffel und Bosio 1997). Sie katalysiert den Transfer von Galaktose auf die C₁-Hydroxylgruppe des Ceramids (Abb.2). Weiterhin ist sie an der Synthese der Galaktosyldiacylglyceride beteiligt (Bosio 1997, van der Bijl, et al. 1996).

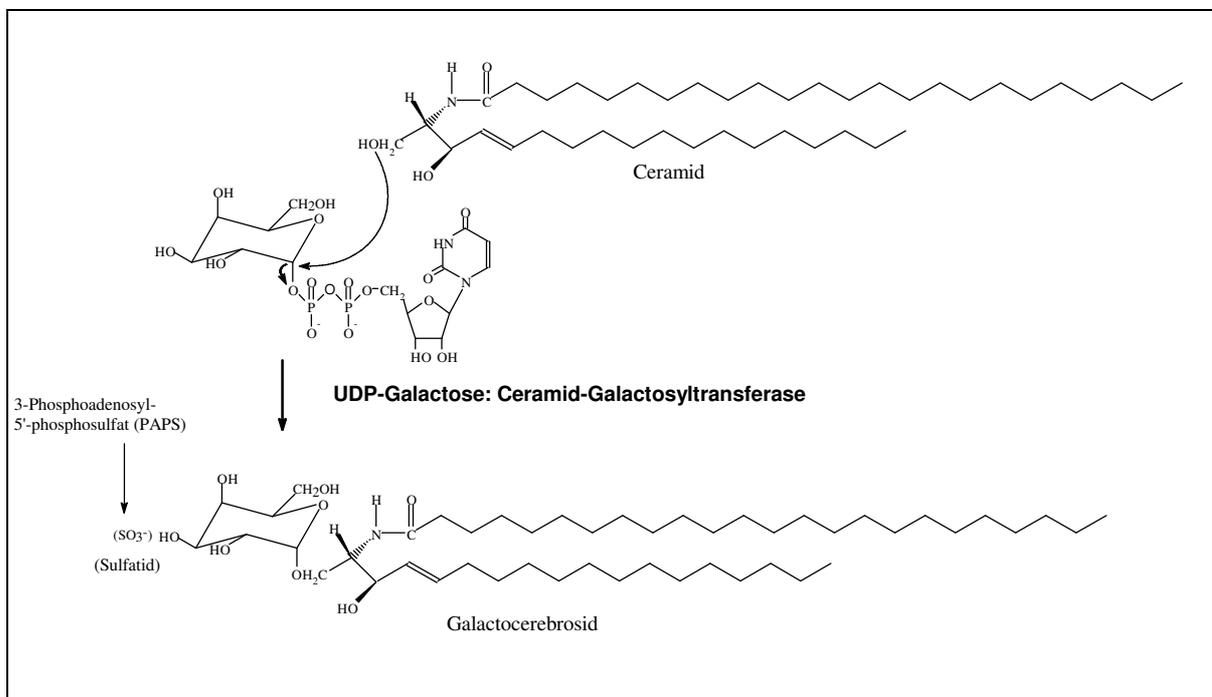


Abb.2: Synthese der Galactocerebroside und Sulfatide (aus Bosio 1997(Bosio 1997))

Der erste Nachweis der enzymatischen Aktivität wurde von Morell und Radin 1969 erstmals in Mikrosomen aus Maushirn geführt (Morell und Radin 1969). Enzymreinigungversuche führten zur Isolierung eines 53kDa Proteins, das als CGT beschrieben wurde (Neskovic, et al. 1981, Neskovic, et al. 1986, Neskovic, et al. 1973, Neskovic, et al. 1974, Neskovic, et al. 1976). Schulte und Stoffel konnten 1993 nachweisen, dass das gereinigte Protein β -Tubulin war und isolierten ihrerseits die CGT erstmals aus Rattenhirn. Nachfolgend wurde die rattenspezifische cDNA (*rattus norvegicus* L.) des Enzyms kloniert (Schulte und Stoffel 1993).

Das Gen des nativen, 64kDa großen, mannosereichen Glykoproteins besteht aus 5 Exonen, von 77bp (ExonIII) bis 822bp (ExonI). Die Organisation und Sequenz des Gens sind im Vergleich von Maus, Ratte und Mensch hochkonserviert (Bosio, et al. 1996a, Bosio, et al. 1996c).

Die 1623bp des offenen Leserasters kodieren für 541 Aminosäuren, mit einer Masse von etwa 61kDa. Die ersten 20 AS stellen eine N-terminale Signalsequenz dar, die posttranslational bei der Translokation des Proteins in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) abgespalten wird (von Heijne 1986). Das prozessierte Protein besitzt drei putative N-Glykosylierungsstellen (Asn78, Asn333, Asn442). C-terminal liegen weiterhin eine 21 AS lange Transmembrandomäne (AS 456-476) und ein KKVK-Retentionssignal für das ER. Die CGT ist subzellulär im ER lokalisiert, wobei der N-Terminus und die Glykosylierungsstellen, somit auch das aktive Zentrum luminal, und das C-terminale Ende cytosolisch liegen (Abb.3). Frühere Berichte über eine Lokalisation der CGT in Golgi-Membranen (Paulson und Colley 1989, Siegrist, et al. 1979) sind wahrscheinlich auf die Aktivität der UDP-Glukose: Ceramid-Glukosyltransferase zurückzuführen (Sprong, et al. 1998).

Untersuchungen zur Chromosomenlokalisierung ergaben bei der Maus Chromosom 3 Bande E3-F1(Coetzee, et al. 1996b) und für den Menschen Chromosom 4 Bande q26 (Bosio, et al. 1996a). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde noch keine genetisch bedingte Erkrankung im Zusammenhang mit CGT beschrieben (Bosio, et al. 1996a). Das Protein resultiert aus mRNA Transkripten, über deren Länge unterschiedliche Angaben veröffentlicht wurden. So wurde über transkribierte mRNA von 1,5kb (Maus)(Garbay und Cassagne 1994), 3,2kb (Maus und Ratte)(Garbay und Cassagne 1994, Schulte und Stoffel 1993) und 4,6kb (Ratte)(Stahl, et al. 1994) berichtet. Die Northern Blot Analyse der Transkripte verschieden alter Tiere zeigte eine entwicklungs- und gewebespezifische Expression der CGT. Sowohl im ZNS (Schulte und Stoffel 1993) als auch im PNS[(Garbay und Cassagne 1994, Schaeren-Wiemers, et al. 1995, Stahl, et al. 1994) wurde eine deutliche Expression, außerhalb des ZNS und PNS nur in der Niere und im Hoden eine schwache Expression nachgewiesen (Stahl, et al. 1994).

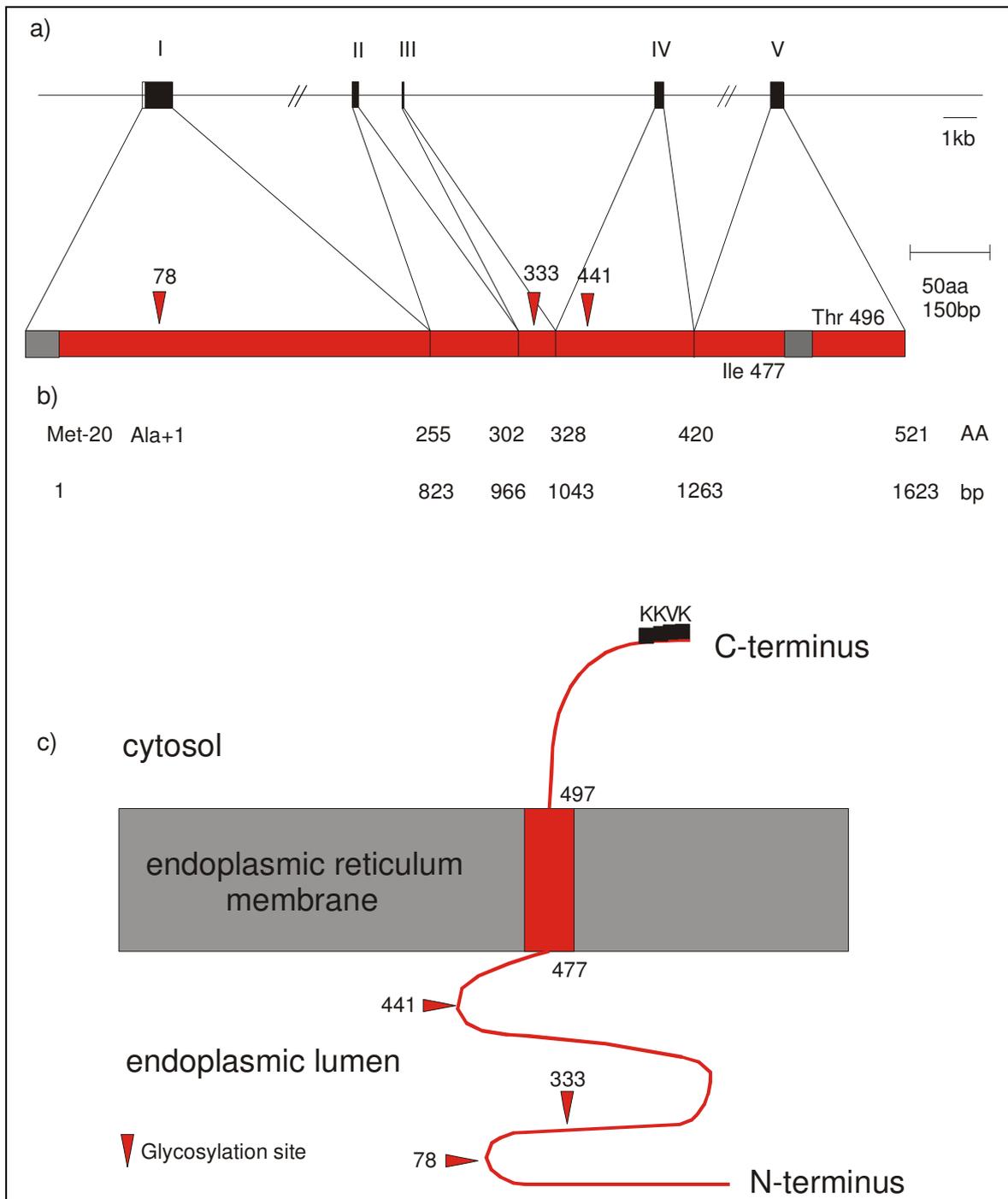


Abb.3: Vermutliche schematische Struktur des CGT-Gens, der Proteinstruktur und der Membrantopologie

(a) Organisation des CGT-Gens; (b) Schematische Übersicht über das Protein mit Signal-Sequenz, Glykosylierungsstellen, transmembran-Domäne und dem ER-Retentionssignal; (c) Vorgeschlagene Topologie der CGT in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (nach Stoffel 1997 (Stoffel und Bosio 1997))

Postnatal verläuft die CGT-Expression bis p5 auf niedrigem Niveau und steigt bis zu einem Maximum zwischen p15 und p25 in der Myelinisierungsphase steil an. Sie korreliert deshalb mit den Expressionsmustern myelinspezifischer Proteine wie MBP und PLP (Koul und Jungalwala 1986, Koul, et al. 1988, Schulte und Stoffel 1993).

Die CGT zeigt *in vitro* im enzymatischen Assay eine ausgeprägte Substratspezifität für mit hydroxylierten Fettsäuren substituierte Ceramide gegenüber solchen mit nicht-hydroxylierten Fettsäuren (Koul, et al. 1988, Morell und Radin 1969, van der Bijl, et al. 1996).

1.5 CGT-defiziente Mauslinie (konventionelle Genablation)

Zur Funktionsanalyse der GalC und sGalC wurde 1996 in zwei Arbeitsgruppen mittels *gene targeting* ein CGT-defizientes Mausmodell geschaffen (Bosio, et al. 1996b, Coetzee, et al. 1996a). In den homozygoten Tieren fehlen die erwähnten Lipidklassen vollständig in der Myelinmembran.

Der Phänotyp der CGT defizienten Tiere äußert sich in vermindertem Wachstum, Ataxie bis hin zu Lähmungen der Extremitäten und Körpertremor. Erkennbar werden die Symptome nach Coetzee et al. (Coetzee, et al. 1996a) ab p12-14, nach Bosio et al. (Bosio, et al. 1996b) nach p10-12. Die Tiere zeigen spezifische Auffälligkeiten in verschiedenen verhaltensbiologischen Untersuchungen. Sie versagen im *horizontal wire* Test und zeigen im *open field* Test geringe Motoraktivität (Bosio 1997). Gegen Ende der Myelinisierungsphase (p25-30) sterben die meisten homozygoten Tiere an Erschöpfung (aufgrund des Tremors). Cgt^{-/-}-Mäuse erreichen maximal ein Alter von 90 Tagen und sind nicht fertil, da die Spermatogenese im Pachytän Stadium stoppt und die spermatogenen Zellen degenerieren (Fujimoto, et al. 2000, Honke, et al. 2002). Heterozygote Tiere sind symptomlos und vom Wildtyp nicht zu unterscheiden (Bosio 1997, Bosio, et al. 1996b).

Trotz einer vollständig ausgebildeten Myelinmembran besitzen die Axone CGT defizienter Tiere verminderte Signal-Leitungsgeschwindigkeiten, die mit 4-8 m/s annähernd das Niveau unmyelinisierter Axone (2,8 m/s) erreichen. Die Signalleitung verläuft hier vermutlich kontinuierlich und nicht mehr saltatorisch. Im

Gegensatz zum PNS zeigen sich im ZNS homozygoter Mäuse morphologische Störungen an einigen Oligodendrozytenfortsätzen. So fehlt dem inneren „loop“ der Myelinmembranen trotz normaler Kompaktierung der Kontakt zum Axon, andere Axone sind von zwei Myelinmembranen ummantelt (Bosio 1997). Die Störungen in den seitlichen Schleifen der Paranodien und die oben angeführten Unregelmäßigkeiten führten zu der Schlußfolgerung, dass GalC und sGalC eine Rolle im Zellkontakt zwischen Axon und den Gliazellen spielen (Bosio, et al. 1998a). Diese Interpretation wurde durch Untersuchungen von Marcus et al. (Marcus, et al. 2000) untermauert, da entwicklungspezifische Unterschiede in Hirnen CGT defizienter Mäuse nachgewiesen wurden. In weitergehenden Untersuchungen wurde für den inkorrekten glia-axonalen Kontakt gezeigt, dass die Mislokalisierung von Proteinen aus der *Caspr* (*Cell recognition proteins of the contactin-associated protein*) Familie in inter- und paranodalen Bereichen der Axone vermutlich dafür verantwortlich ist (Honke, et al. 2002, Jenkins und Bennett 2002, Poliak, et al. 2001). Diese bilden Heterodimere mit Contactin und kolokalisieren an den Paranodien mit NF155, einer glialen Isoform von Neurofascin (Lazzarini 2004).

Auch die Lipidzusammensetzung der Niere von $cgt^{-/-}$ Mäusen ist im Gegensatz zu wt Tieren verändert und enthält kompensatorisch mehr polare Sulfoglykolipide, wie Lactosylceramid-II-sulfat (SM3) und Gangliotetraosylceramid-II,IV-bis-sulfat (SB1a). Dies führt dazu, dass die Funktion der Niere in $cgt^{-/-}$ Tieren zumindest teilweise aufrecht erhalten werden kann (Tadano-Aritomi, et al. 2000).

Die Auswirkungen der Genausschaltung zeigen sich auf molekularer Ebene in den betroffenen Tieren aufgrund der Gewebespezifität der CGT hauptsächlich in der Myelinmembran im ZNS und PNS. Während sich die Phospholipidzusammensetzung von CGT-defizienten Tieren nicht von der der Wildtyp-Tiere unterscheidet, treten statt der normalerweise vorhandenen Galaktocerebroside Glukocerebroside (GlcC) auf. Auch die Sulfatide sind durch sulfatierte Glukocerebroside (sGlcC) im PNS ersetzt (Bosio, et al. 1996b, Coetzee, et al. 1996a). Weiterhin fehlen im Myelin von $cgt^{-/-}$ -Mäusen Galaktodiacylglyceride, was als ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der CGT an der Galaktodiacylglyceridsynthese gedeutet wird (siehe 1.3.).

Die Gründe für die gestörte saltatorische Erregungsleitung liegen im Gegensatz zu anderen Mausmodellen (*shiverer/jimpy* (Matthieu, et al. 1981, Nave und Milner

1989)) nicht in der Dysmyelinisierung, sondern in einer Hypomyelinisierung und der veränderten molekularen Zusammensetzung der Myelinmembran (Bosio, et al. 1998b). Die Fluidität und Isolierungseigenschaften der Membran sind herabgesetzt, da zwar Glukocerebroside gebildet werden, diese das Fehlen der Galaktocerebroside aber nicht kompensieren können. Messungen mit der Langmuir-Waage ergaben, dass die einzelnen Lipidmoleküle im monomolekularen Film der Myelinlipide der *cgt*^{-/-}-Mäuse im Gegensatz zu denen von Wildtypmäusen einen erhöhten Flächenbedarf aufweisen (Bosio 1997). Hieraus lässt sich die beobachtete Ionenpermeabilität der Myelinmembran in *cgt*^{-/-} Mäusen ableiten. Die Kurzlebigkeit der homozygoten *cgt*^{-/-} Mäuse, die durch konventionelle Genausschaltung gewonnen wurden, schließt Untersuchungen zur Bedeutung der GalC und sGalC für den Erhalt und die Stabilität der Myelinmembran aus. Diese Fragestellung soll mit Hilfe einer konditionierten Genablation beantwortet werden. Dabei wird ein zell- und entwicklungspezifisches Ausschalten der CGT angestrebt. Besonders das Ausschalten des Gens am Ende der Myelinisierungsphase und im adulten Tier sind von Interesse. Veränderte neurologische Symptome könnten zur Aufklärung der Funktion der CGT in der differenzierten Myelinmembran führen. Entwicklungsspezifische Faktoren können dabei ausgeschlossen werden.

1.6 Transgene Mausmodelle

Für das Verständnis der Funktion eines Genes *in vivo* ist die Inaktivierung oder Veränderung eines Genes durch Mutationen und die Analyse der Auswirkungen auf den Organismus ein wichtiger und vielversprechender Ansatz. Verschiedene Mausmodelle ermöglichen dabei die Analyse korrespondierender menschlicher Krankheitsbilder (Raeber, et al. 1998) ebenso wie Ansätze zur Diagnose und Therapie. So z.B. für die Tay-Sachs- und die Niemann-Pick-Erkrankung (Otterbach und Stoffel 1995, Yamanaka, et al. 1994) .

Das Transgen kann durch Lipofektion (Dalby, et al. 2004, Ma, et al. 2004) , retrovirale Vektoren (Blesch 2004), Mikroinjektion in den männlichen Vorkern befruchteter Eizellen (Hogan, et al. 1986, Wall 2001), oder Elektroporation (Golzio, et al. 2004) in das Genom der ausgewählten Spezies eingeführt werden. Alle

Transfektionstechniken führen zu Genadditionen an verschiedenen, nicht vorhersehbaren Stellen des Genoms mit einer undefinierten Anzahl von Kopien. Dies kann zu ungewollter Beeinflussung von Expression oder Regulation verschiedener Gene führen. Durch homologe Rekombination (*gene targeting*) wird eine endogene Gensequenz durch das entsprechende Transgen ersetzt, wodurch eine gezielte Manipulation des Genoms ermöglicht wird (Capecchi 1989, Capecchi 1994, DePamphilis, et al. 1988, van der Putten, et al. 1985).

1.7 Gene Targeting

Die Technik des *gene targeting* erlaubt eine gezielte Veränderung des Säuger-genoms, indem durch homologe Rekombination klonierte bzw. Fremd-DNA in die Sequenz des interessierenden Gens eingefügt wird (Rajewsky, et al. 1996). Durch die Verwendung von embryonalen, pluripotenten Stammzellen (ES-Zellen) für die Transfektion ist es möglich, das veränderte Gen in die Keimbahn eines lebenden Organismus einzuschleusen und damit eine stabile Linie mit den entsprechenden Veränderungen zu etablieren. Die Pluripotenz der ES-Zellen wird durch Kultur auf embryonalen Fibroblasten unter Zugabe von verschiedenen Supplementen, wie z.B. dem Cytokin LIF (*Leukaemia inhibitory factor*)(Smith, et al. 1988) und FCS (*fetal calf serum*) gewährleistet (Capecchi 1989, Capecchi 1994). Da der Mechanismus des Erhalts der Pluripotenz nicht vollständig verstanden und eine Propagation der Zellen unter herkömmlichen Bedingungen nicht unbegrenzt möglich ist, wird in jüngerer Zeit versucht, FCS durch definierte Mischungen von verschiedenen Supplementen, z.B. KSR (Invitrogen), zu ersetzen und durch Zugabe von ACTH (*Adrenocorticotropic Hormone*), PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) und BNP (*brain natriuretic peptide*) die Differenzierung der ES Zellen im Zusammenspiel mit LIF zu verhindern (Amit, et al. 2004, Ogawa, et al. 2004).

Die Elektroporation zur Induktion einer homologen Rekombination ist eine geeignete Methode, mit einer Effizienz von $1/10^4$ bis $1/10^5$ Zellen ein „*gene replacement*“ durchzuführen (Golzio, et al. 2004, Robbins 1993, Robertson 1991). Aufgrund des relativ seltenen Eintritts der homologen Rekombination im Gegensatz zu heterologer, oder nicht erfolgter Rekombination, werden die Zellen

nach der Elektroporation selektioniert und damit angereichert (Capecchi 1989, Robbins 1993). Der *targeting*-Vektor beinhaltet klassischerweise das Gen der Neomycin-Phosphotransferase (*Neo*) als positiven Marker. Dieser verleiht Zellen, die die Fremd-DNA homolog oder heterolog integriert haben, eine Resistenz gegenüber einem Neomycin-Analogen, wie z.B. G418. G418 hemmt die Proteinbiosynthese von Zellen, die nicht Träger des Resistenzgenes sind. Durch eine Platzierung innerhalb der homologen Sequenz des Vektors wird der Einbau des *Neo*-Gens während der Rekombination gesichert.

Für die negative Selektion wird häufig das Thymidin-Kinase Gen des *Herpes-Simplex-Virus* (HSV-TK-Gen) verwendet, das meist distal zu den homologen Bereichen im *targeting*-Vektor eingebaut wird und daher bei der homologen Rekombination eliminiert wird. Im Falle einer heterologen Rekombination liegt das HSV-TK-Gen vor und führt in Gegenwart von z.B. Gancyclovir (GanC), einem Nukleotid-Analogen, zum Einbau desselben während der DNA-Replikation. Es kommt zur vorzeitigen Termination der DNA-Synthese aufgrund des fehlenden 3'-OH-Endes und nachfolgend zum Absterben der entsprechenden ES-Zellen (Capecchi 1989, Capecchi 1994, Robbins 1993, Robertson 1991).

Nach einer Wachstumsphase von 10 bis 14 Tagen unter Doppelselektionsbedingungen können die überlebenden Zellen als kleine Kolonien isoliert und durch Techniken wie *Southern Blot* Hybridisierungsanalyse oder Polymerase Kettenreaktion (*PCR*) auf den korrekten Einbau der DNA hin analysiert werden.

Für die Erstellung chimärer ES-Zell-Embryonen bieten sich die Methoden der Injektion von transfizierten ES-Zellen in Blastozysten (Bradley, et al. 1984) oder die Aggregation solcher ES-Zellen mit Morulae, deren Zona pellucida entfernt wurde (S.A. Wood, et al. 1993, S. A. Wood, et al. 1993) an, wobei die Injektion die häufiger verwendete der beiden Techniken ist.

Auf solche Weise manipulierte Blastozysten werden in die Uteri scheinchwangerer Ersatzmütter reimplantiert. Die verwendeten ES-Zellen stammen aus Mäusen mit zwei intakten, dominanten agouti-Allelen und rufen in den Nachkommen einen braunen Fellfarbton hervor. Die für die Reimplantation verwendeten Blastozysten stammen z.B. aus C57/Bl6 Weibchen, die eine schwarze Fellfarbe besitzen, da ihre agouti-Allele defekt sind.

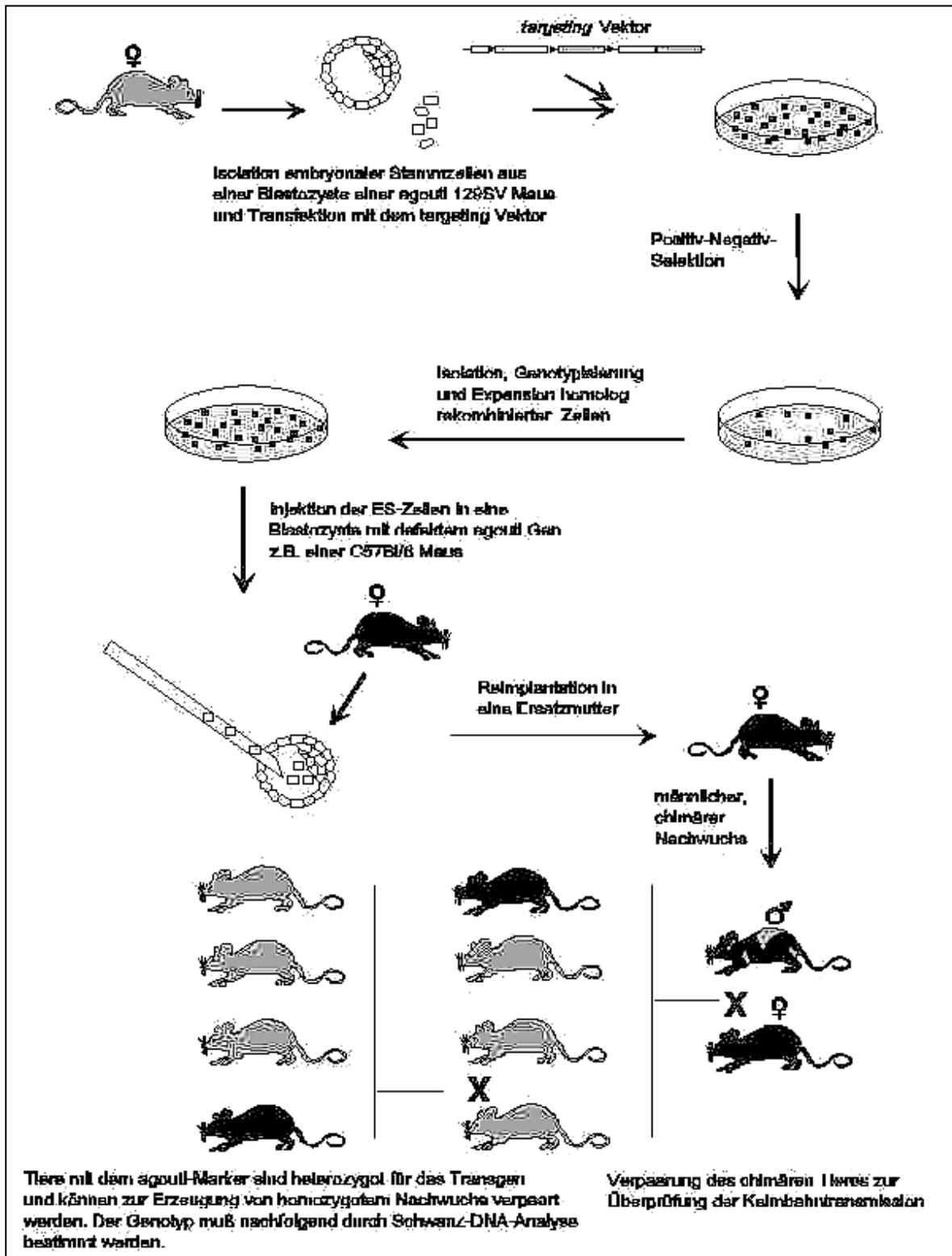


Abb.4: Die Erstellung transgener Mäuse durch homologe Rekombination nach Capecchi 1994 und Robbins 1993 (Capecchi 1994, Robbins 1993)

Aufgrund gescheckter Fellfarbe als chimär zu erkennender Nachwuchs, wird durch Rückkreuzungen mit Mäusen schwarzer Fellfarbe auf das Vorhandensein der eingefügten Manipulation in die Keimbahn analysiert. Die Nachkommen dieser Paarungen mit dem agouti-Fellmarker haben das Transgen mit in ihre Keimbahn integriert und können nach Genotypisierung zur Etablierung einer homozygoten Linie für das Transgen verwendet werden. Der folgende Nachwuchs wird mittels Analyse der genomischen DNA aus Schwanzspitzenbiopsien auf seinen Genotyp untersucht (Abb. 4)(Hogan, et al. 1986).

1.8 Konditionierte Genausschaltung

Ausgehend von der Problematik, dass viele Nullmutationen nicht lebensfähig sind oder aber auch keinen signifikanten Phänotyp aufweisen (Zimmer 1992), wurde ein System geschaffen, das die entwicklungs- und gewebespezifische Aktivierung der gewünschten Manipulation ermöglicht. Hierzu werden zumeist die spezifischen Rekombinasen *Cre* (**causes recombination**) des Phagen P1 und *Flp*, benannt nach dem „flip“ beziehungsweise Invertieren von DNA Sequenzen in *Saccharomyces cerevisiae*, verwendet. Beide Rekombinasen besitzen definierte Zielsequenzen, an denen sie aktiv werden. Während die *Cre* Rekombinase *loxP* (**locus of x over in P1**)-Sequenzen erkennt, sind dies für die *Flp* Rekombinase *FRT* (**FLP recombinase recognition target**) Sequenzen (Dymecki 1996, Kilby, et al. 1993, Sauer und Henderson 1988).

1.9 Das Cre/loxP System

Die *loxP* Sequenzen bestehen aus einer Kernsequenz von 8bp und zwei, sie in entgegengesetzter Orientierung umgebenden, 13bp langen *inverted repeats*. Die *Cre*-Rekombinase, ein 38 kDa Enzym, schneidet innerhalb der Kernsequenzen und führt zu einem reziproken Strangaustausch zwischen zwei *loxP*-Erkennungsregionen (Hoess und Abremski 1985). Somit kann auch in Säugetierzellen (Sauer und Henderson 1989) eine beliebige DNA-Sequenz (Hoess, et al. 1984, Hoess und Abremski 1984) ausgeschnitten werden. Die Funktionalität des *Cre/loxP*-Systems wurde *in vivo* (Araki, et al. 1995, Lasko, et al. 1992, Lewandoski 2001, Orban, et al. 1992, Perea, et al. 2001) und *in vitro* (Sauer

und Henderson 1988) hinreichend überprüft und bestätigt. Das Entfernen der gewünschten Sequenz kann auf ES-Zell-Ebene durch eine transiente *Cre*-Expression oder aber in der Maus durch eine Kreuzung mit einer transgenen Linie, die die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle eines induzierbaren und/oder gewebespezifischen Promoters enthält, durchgeführt werden. In Mäusen, die homozygot für das zu entfernende Segment sind und die *Cre*-Rekombinase enthalten, kann eine Rekombination zeit- und gewebespezifisch induziert werden (Rajewsky, et al. 1996). Das *Cre-loxP*-System erlaubt bei entsprechender Positionierung der *loxP*-Sequenzen die Einführung von Punktmutationen (Torres 1998), Deletionen (Gu, et al. 1994), aber auch Insertionen (Hanks, et al. 1995).

1.10 Das TetR System

Die Kontrolle der Genexpression in Eukaryonten kann mittels eines Tetrazyklin abhängig regulierten Systems erreicht werden. Tetrazyklin kontrollierte *trans-activator* (*tTA*; *tet off*) oder reverse Tetrazyklin kontrollierte *trans-activator* (*rtTA*; *tet on*) Proteine werden durch Bindung von Tetrazyklin und besonders Anhydrotetrazyklin und Doxyzyklin, ihren Effektormolekülen, in passiven, bzw. aktiven Zustand versetzt (siehe Abb.5). Die Transaktivatoren sind Fusionsproteine zwischen dem tet-Repressor und der minimal Transkriptionsaktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus Protein 16 (VP16).

Ein Heptamer von *tet* Operator Sequenzen (*tetO7*) in Kombination mit einem minimal Promoter, wie z.B dem des humanen Cytomegalovirus (hCMV), ermöglichen die Bindung der Transaktivatoren in ihrer aktiven Form und somit die Initiation der Transkription für ein beliebiges Gen. Der Minimalpromoter ohne Transaktivatormolekül ist inaktiv. Somit kann über die Expression der Transaktivatoren unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promoters und die Applikation von Tetrazyklin, oder eines Derivates, eine zeit- bzw. entwicklungs- und gewebespezifische Expression des kontrollierten Gens erreicht werden (Baron und Bujard 2000, Baron, et al. 1997, Gossen und Bujard 1992, Gossen und Bujard 1993, Gossen und Bujard 2002, Gossen, et al. 1995). Ebenso wurden die induzierbare Expression verschiedener Gene über Ecdyson sensitive Promotoren bzw. das System des transkriptionellen Aktivators Gal4 aus

Saccharomyces cerevisiae, der an eine *upstream activator sequence* (UAS) bindet, beschrieben (Lewandoski 2001, No, et al. 1996). Als weniger sinnvoll erwiesen sich z.B. Rapamycin induzierte Heterodimerisierung von FKBP12 und FRAP (*CID chemical inducers of dimerization*) und Östrogen basierte Systeme mit GAL4 DNA bindenden Domänen, die aufgrund der endogenen Funktion ihrer Induktoren Rapamycin bzw. Östrogen zu einer Reihe von Nebeneffekten führen können (Burcin, et al. 1998).

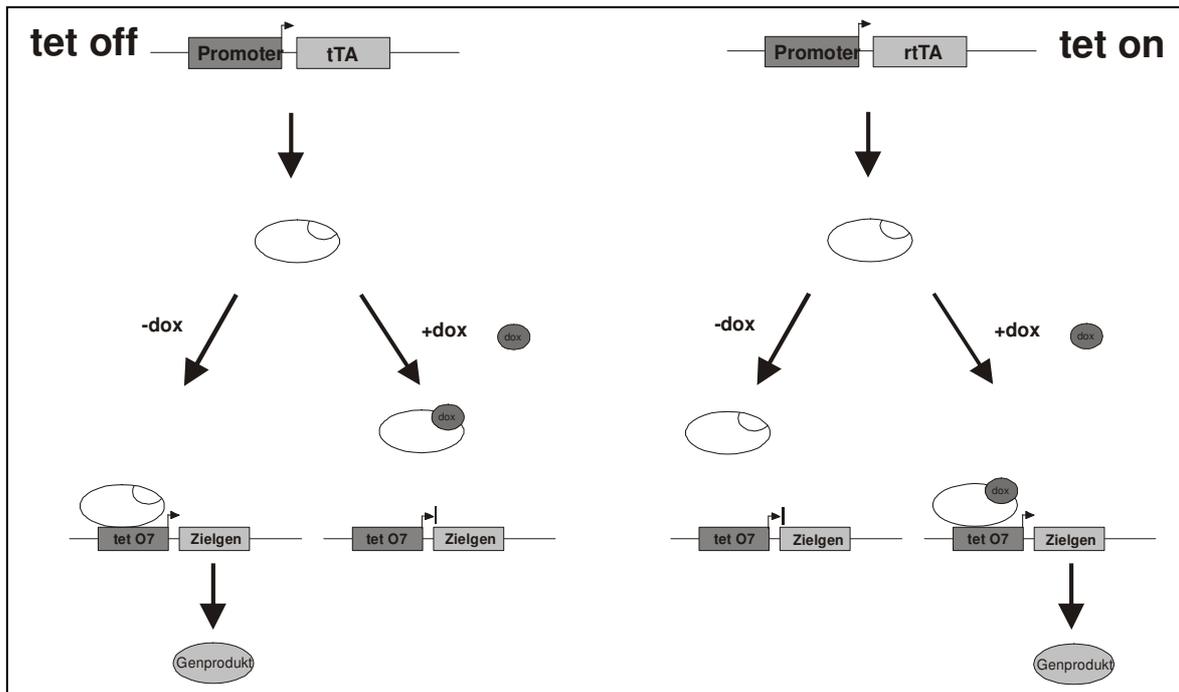


Abb.5: Darstellung der transkriptionellen Regulation durch das „tet off“ und das „tet on“ System. tet O7 bezeichnet einen Promoter, verbunden mit einem Heptamer von tet-Operatoren

2 Aufgabenstellung

Ausgehend von den Ergebnissen, die durch die konventionelle Genausschaltung erlangt wurden, sollte mittels der konditionierten Methode das Problem der Letalität umgangen werden und die Funktion der UDP-Galaktose:Ceramid-Galaktosyltransferase (CGT) in der Myelinogenese und der Aufrechterhaltung der Myelinstruktur weiter untersucht werden. Hierbei ermöglicht das *gene targeting* mit dem *Cre/loxP*- und dem „*tet on*“ System das entwicklungs- und gewebespezifische Ausschalten von CGT.

Ziel dieser Arbeit war es, murine embryonale Stammzellen durch Elektroporation mit einem *replacement*-Vektor zu transfizieren und homolog rekombinierte Stammzellen nach Selektion für Blastozysteninjektionen zur Generierung einer homozygoten Mauslinie einzusetzen. Ebenso sollte ein Konstrukt zur Etablierung einer gewebsspezifisch induzierbaren, Cre-Rekombinase exprimierenden Mauslinie erstellt und für die Injektion in den männlichen Vorkern von murinen Oozyten benutzt werden. Nach Kreuzung dieser beiden Linien sollten die Auswirkungen des entwicklungspezifischen Ausschaltens des Gens in weiteren Experimenten untersucht werden. Im Zusammenhang hiermit sollte der vorliegende 5'-untranslatierte Bereich des murinen Gens auf putative Promoteraktivität hin untersucht und gegebenenfalls benutzt werden.

Für weitergehende immunzytologische Untersuchungen sollte ein polyklonaler, gegen CGT gerichteter Antikörper in Kaninchen erzeugt werden.

An verschiedenen trunkierten und glykosylierungsdefizienten CGT überexprimierenden HEK (*human embryonic kidney*) 293 Zell Mutanten sollten weitere Struktur- und Funktionsanalysen für CGT *in vitro* durchgeführt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Erzeugung der konditionierten cgt defizienten Mauslinie

Die konditionierte Genausschaltung der UDP Galaktose: Ceramid Galaktosyltransferase sollte basierend auf dem Cre/loxP System und der Tetrazyklin induzierbaren Cre Expression durchgeführt werden. Hierzu sind drei Elemente erforderlich, die in das Mausgenom integriert sein müssen:

- das homolog rekombinierte cgt Gen, dessen zu deletierende Sequenzbereiche, wie auch der positive Selektionsmarker jeweils von loxP Sequenzen flankiert sind,
- eine heterolog integrierte Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Minimalpromoters, verbunden mit den Operatoren des Tetrazyklin Promoters,
- ein ebenfalls heterolog integrierter Tetrazyklin induzierbarer Transaktivator, der unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promoters steht, um die Zellspezifität der Expression festzulegen.

3.1.1 CGTloxP3 targeting Konstrukt

Der targeting Vektor (Meinzinger 1998) pmCGTloxP3 wurde mit drei loxP Sequenzen ausgestattet, um die Exzision der neo-box auf ES-Zell Ebene zu ermöglichen. (Abb.6 A)) Dies bietet den Vorteil, unerwünschte Einflüsse in der zu generierenden transgenen Maus durch die integrierte neo-box auszuschließen. Da das erste Intron sich über eine Distanz von mehr als 23 kb erstreckt (Bosio 1997), wurde für die Genablation das erste Exon (822bp), das sowohl das Startcodon als auch den Hauptanteil des gesamten CGT Proteins kodiert, ausgewählt. Durch die Schnittstellen Sall und PvuI gibt es zwei Möglichkeiten, den Vektor für die homologe Rekombination zu linearisieren. Das Konstrukt wurde durch PCR, Southern Blot Analyse und Sequenzierungen überprüft und bestätigt (Meinzinger 1998).

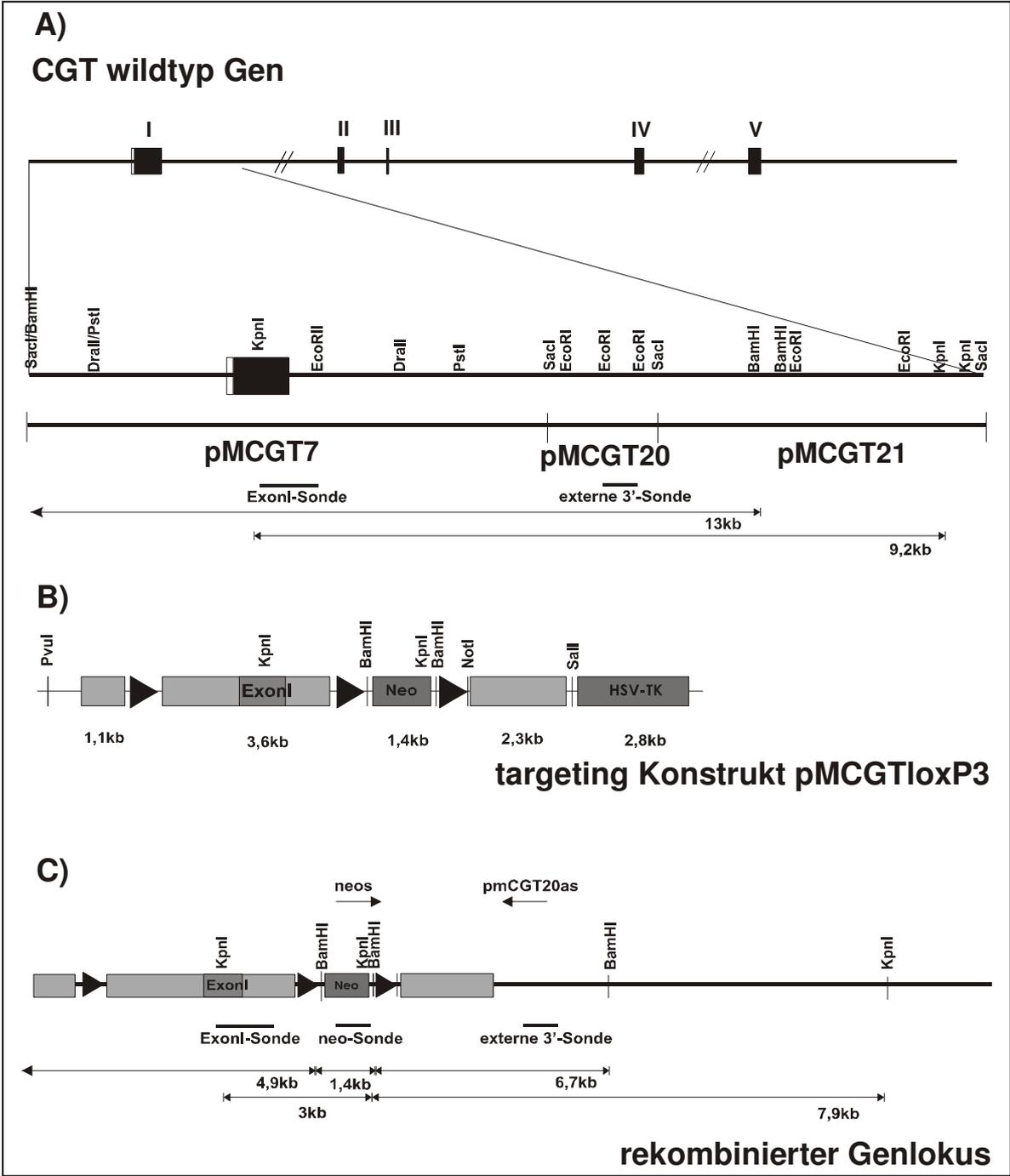


Abb.6: A) Darstellung des Wildtyp-CGT Genorts mit den vorhandenen Subklonen pMCGT7, pMCGT20 und pMCGT21 B) targeting Konstrukt basierend auf pMCGT7 C) homolog rekombiniertes cgt Allel. Die Angaben in kb beziehen sich auf die zu erwartenden Fragmentgrößen nach diversen Restriktionsschnitten. Die Dreiecke zeigen die Orientierung der loxP Erkennungssequenzen an. Neos und pmCGT20as bezeichnen die Lage und Richtung der PCR Primer für den Nachweis der homologen Rekombination. Die Abbildungen sind nicht massstabgetreu. Die Restriktionsschnittstellen sind nicht vollständig angegeben.

3.1.2 Überprüfung des targeting Vektors

Um die Funktionalität der eingefügten loxP Sequenzen im targeting Konstrukt zu überprüfen, wurde der Vektor in vitro in stabil Cre-Rekombinase exprimierenden E.coli Zellen(294-Cre)(Buchholz, et al. 1996) getestet. Hierbei kann man erwarten, dass im Konstrukt aufgrund der dauerhaften Cre Einwirkung der gesamte Bereich zwischen den beiden äußeren loxP Sequenzen deletiert wird und im Southern Blot der aus diesen Zellen gewonnenen DNA weder ein neo- noch ein ExonI-Signal nachzuweisen ist. Bei allen drei Klonen, wie in Abb.7 exemplarisch gezeigt, fand eine Hybridisierung mit der neo- bzw. ExonI- Sonde nur mit der isolierten DNA aus nicht Cre exprimierenden Zellen statt. Das Fehlen der Hybridisierung mit DNA aus den Cre exprimierenden Zellen bestätigt die Erwartung und die Funktionalität zumindest der beiden äußeren loxP Sequenzen. Über die Funktionalität der zwischen ExonI und neo-box gelegenen loxP Sequenz läßt sich mittels dieses Experiments keine Aussage treffen. Alle loxP Sequenzen wurden zusätzlich durch Sequenzierungen überprüft (Meinzinger 1998). Die DNA der so charakterisierten Klone wurde nach Linearisierung und Reinigung für die folgenden Transfektionen eingesetzt.

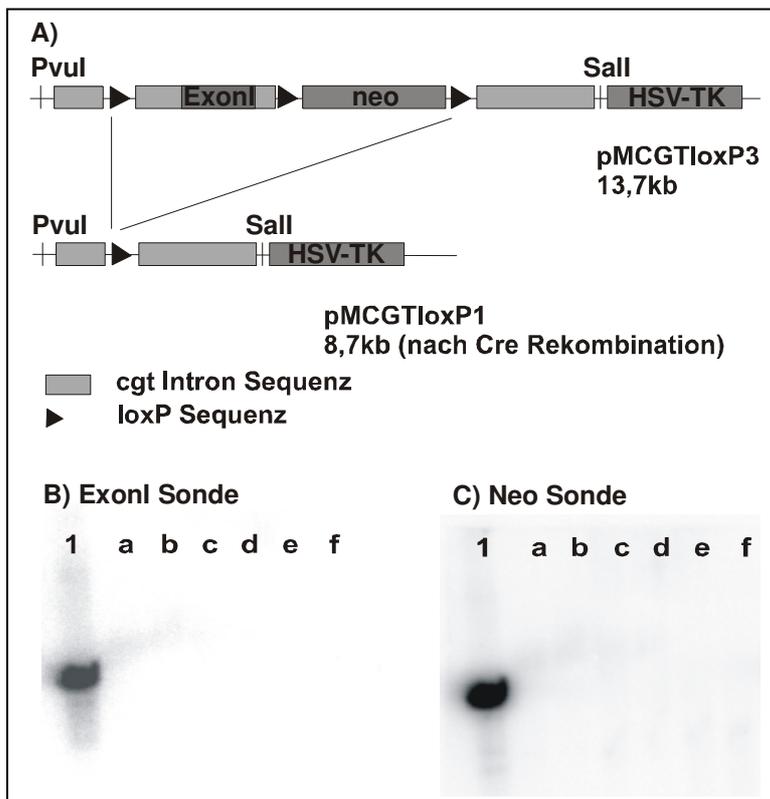


Abb.7: Überprüfung des targeting Konstruktes pMCGTloxP3 am Beispiel des Klons 1. A) Schematische Darstellung der Rekombination B) Southern Blot Analyse mit der ExonI spezifischen Sonde C) Southern Blot Analyse mit der neo-box spezifischen Sonde: 1 bezeichnet das linearisierte Konstrukt mit DNA aus DH5 α Zellen; a-f bezeichnet das linearisierte Konstrukt mit DNA aus 294Cre Zellen

3.1.3 Herstellung und Analyse rekombinanter ES-Zell Klone

Die ES Zelllinien R1 (129/Jx129/SvCP)(Nagy, et al. 1993), CJ7 (129/SvJ)(Voss, et al. 1997), MPI-II(129Sv)(Swiatek und Gridley 1993) und V8.1 (129SvxFVB)(Eggen, et al. 2001) wurden auf Mitose-inaktivierten Fibroblasten, HM1 (129P2/OlaHsd)(Magin, et al. 1992) auf Gelatine beschichteten Kulturplatten unter der Zugabe von LIF kultiviert, um eine vorzeitige Differenzierung zu verhindern. Die Transfektion der Zellen geschah durch Elektroporation. Dabei wurden für ca. 2×10^7 ES Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase 25-40µg des mit Sall oder PvuI linearisierten und gereinigten targeting Konstruktes eingesetzt. Nach 24h wurden diese für 7-10 Tage der positiv-negativ Selektion unterworfen. Durch den Einsatz von transfizierten- und nicht-transfizierten Zellen auf mit G418 kultivierten Kontrollplatten wurde die Anreicherung der positiv-negativ Selektion der restlichen Platten und die Effizienz der G418 Selektion bestimmt. Nach der Selektion wurden die ES-Zell Klone isoliert, expandiert und zur Hälfte kryokonserviert. Die restlichen Zellen wurden auf Gelatine beschichteten Platten kultiviert und für die Präparation genomischer DNA eingesetzt.

Tab. 1: Zusammenfassung der Elektroporationsexperimente für die ES-Zell Linien MPI-II, R1, CJ7, HM1 und V8.1

ES-Zelllinie	Anzahl der Elektroporationen	Anzahl der analysierten Klone	homolog rekombinierte Klone	Linearisierung des Konstrukts
MPI-II	3	106	0	Sall bzw. PvuI
R1	4	348	0	Sall bzw. PvuI
CJ7	37	2391	4	Sall bzw. PvuI
HM1	9	651	0	Sall bzw. PvuI
V8.1	8	368	2	Sall bzw. PvuI
Σ	58	3844	6	

Zum Nachweis der homologen Rekombination wurde die genomische DNA der Klone mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und KpnI geschnitten und mittels Southern Blot analysiert. Die Hybridisierung mit einer externen 1,1kb 3' Sonde nach BamHI Restriktion ein 6,7kb großes und nach KpnI Restriktion ein 7,8kb großes Fragment für ein homologes Rekombinationsereignis (Abb.8). Mit einer 1kb neo-spezifischen Sonde wurde ein 1,4kb (BamHI), bzw. 9,1kb (KpnI) Fragment nachgewiesen. Ebenso wurden die wt Fragmente bei 13kb (BamHI Restriktion) und 9,2kb (KpnI Restriktion) durch die externe Sonde detektiert. Zusätzlich wurde die Rekombination mittels PCR mit den Primern neos(intern) und pMCGT20as(extern) (Abb.6) nachgewiesen, die nur im Fall einer homologen Rekombination zu einem 3,1kb Fragment führt. Sowohl die Sall (Klone 46, 65 31 und 59), als auch die PvuI (Klone 17 und 47) Linearisierung belegten die Generierung der homolog rekombinierten Klone.

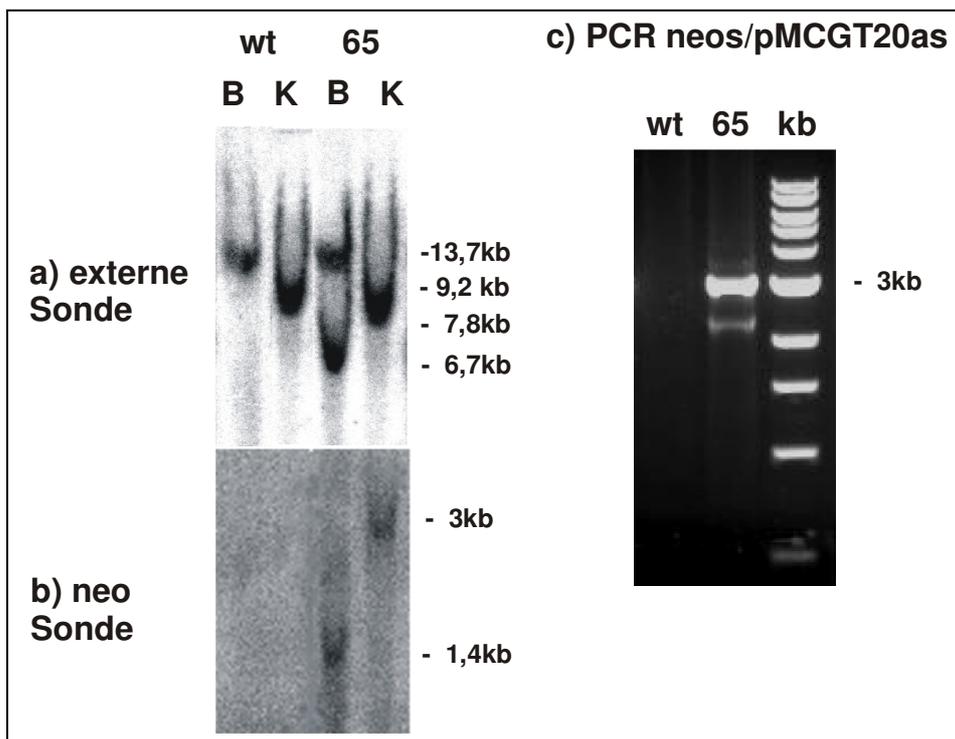


Abb. 8: Nachweis der homologen Rekombination am Beispiel von Wildtyp DNA (wt) und Klon 65 Southern Blot Analyse von genomischer DNA nach BamHI(B) und KpnI(K) Verdau. Hybridisierung mit der a) externen 3' Sonde, b) internen neo-Sonde. c) PCR Nachweis der homologen Rekombination mit den Primern neos(intern) und pMCGT20as(extern). Zur Lage der Primer siehe Abb. 6.

Trotz einer durchschnittlich zehnfachen Anreicherung zeigten ES Zellen der CJ7 Linie nur vier von 2391 untersuchten Klonen und zwei von 368 untersuchten

Klonen der V8.1 Linie eine homologe Rekombination. Aus den untersuchten Klonen der Linien R1(348 untersuchte Klone), MPI-II(106 untersuchte Klone) und HM1(651 untersuchte Klone) konnten keine homolog rekombinierten Klone isoliert werden (Tab.1). Weder durch Modifikation der Elektroporationsbedingungen, noch durch mehrfache Reinigung der DNA wurde eine Erhöhung der Effizienz der homologen Rekombination erreicht.

3.1.4 Transiente Cre Expression

Das targeting Konstrukt wurde mit drei loxP Sequenzen so gestaltet, dass die von ihnen flankierte neo box unter kurzzeitiger Cre-Rekombinase Einwirkung deletiert werden kann, ohne die ebenfalls von loxP Sequenzen flankierte ExonI Sequenz mit auszuschneiden. Somit kann, wie schon gezeigt wurde, bereits auf ES Zell Ebene der Selektionsmarker eliminiert werden (Gu, et al. 1994, Kuhn, et al. 1995). Hierdurch können unerwünschte Nebenwirkungen im zu generierenden Tier vermieden werden. Nach der Rekombination bleibt nur noch eine der beiden loxP Sequenzen bestehen. Die ExonI Sequenz ist somit weiterhin von zwei Erkennungssequenzen flankiert, die die Deletion später im transgenen Tier ermöglichen. Neben der erwünschten Deletion der neo-box können weitere Rekombinationsereignisse auftreten, so dass prinzipiell drei verschiedene Möglichkeiten gegeben sind:

- Deletion des gesamten Bereiches zwischen den beiden äußeren loxP Sequenzen
- Deletion des geflochten, das heisst von zwei loxP Sequenzen flankierten, Gens
- Deletion des Selektionsmarkers

Für die erneute Transfektion der homolog rekombinierten Zellklone durch Elektroporation wurden die Vektoren pBS185 (Sauer 1993), pIRESCreNLS (Uschkureit 2000) und pPGKCrebpA verwendet. In pBS185 und pIRESCreNLS steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des human cytomegalovirus (hCMV) Promoters und erfährt so eine relativ starke, ubiquitäre Expression. Der Nachteil dieser Vektoren besteht in der Stärke der Expression der Rekombinase, die das Ereignis einer partiellen Deletion in den ES Zellen erschwert. Als sinnvoller

erwies sich der Vektor pPGKCrebpA, der zu einer stark verminderten Cre-Expression und somit eher zu dem Ereignis der neo-box Exzision führt. Eine Selektion potentiell positiver Zellklone durch G418 war nicht mehr möglich, da der Selektionsmarker das Ziel der Exzision war. Daher wurde je ein Viertel der isolierten Klone in G418 haltigem Medium als negative Kontrolle kultiviert. Aliquote der restlichen Zellen wurden in G418 freiem Medium expandiert, zum einen Teil kryokonserviert und zum anderen für die Gewinnung von genomischer DNA eingesetzt. Klone die durch die G418 Behandlung abstarben, waren potentielle Kandidaten, die auf jeden Fall die Neomycinresistenz verloren hatten. Somit wurde für die Genotypisierung nur die DNA der G418 sensitiven Klone eingesetzt. Das Fehlen einer Bande im PCR Nachweis mit den Primern neos(intern) und pMCGT20as(extern) zeigt in diesem Fall das Rekombinationsereignis an, ohne eine Unterscheidung zwischen dem Ereignis einer neo-Exzision und einer Exzision des gesamten geflochten Bereiches zu ermöglichen. Daher wurde erneut eine Southern Blot Analyse nach BamHI und KpnI Restriktion durchgeführt, wobei eine Hybridisierung mit der neo-Sonde im Fall der ExonI Deletion, wie auch dem unveränderten cgt geflochten Genort, zu einem 3kb (KpnI) bzw. 1,6kb (BamHI) Fragment führt. Bei vollständiger Exzision der geflochten Bereiche oder selektiver neo-Box Exzision ist keine Hybridisierung zu erwarten. Mit der ExonI spezifischen Sonde können bei vollständiger Exzision, wie auch bei selektiver neo-Box Exzision ein 9,2kb (KpnI) und ein 13kb (BamHI) Fragment detektiert werden, da die verbleibende loxP Sequenz nur einen marginalen Einfluß auf die Größe der resultierenden Fragmente hat. Bei vollständiger Deletion der geflochten Bereiche sind mit der externen Sonde ein 9,4kb, ein 13kb Fragment (BamHI) und ein 9,2kb Fragment (KpnI) zu erwarten. Die Deletion von ExonI führte zu einem 6,7kb (BamHI) und die Deletion der neo-box zu einem 13kb (BamHI) Fragment. Für den Fall das keine Cre Rekombination stattgefunden hat, sollte ebenso ein 6,7kb Fragment entstehen. Somit würde ein Klon mit dem gewünschten Rekombinationsereignis der neo-Exzision zu einer 13 kb Bande (BamHI) und 9,2kb (KpnI) führen, die mit der ExonI und externen Sonde nachweisbar sind (Abb.9).

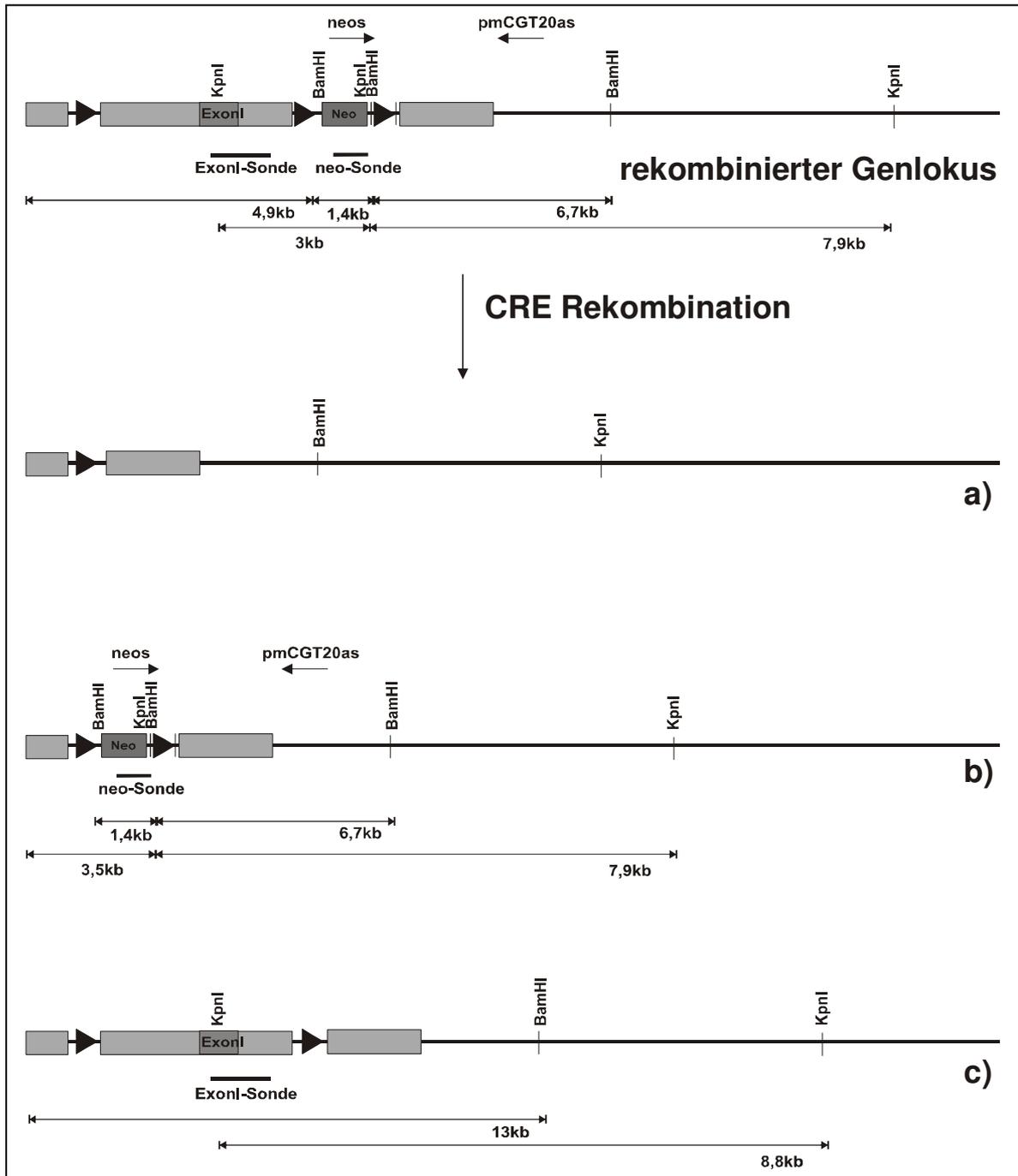


Abb.9: Prinzipielle Möglichkeiten der Cre Rekombination im homolog rekombinierten *cgt* Genlocus a) Deletion des gesamten Bereiches zwischen den beiden äußeren *loxP* Sequenzen b) Deletion des gefloxted Gens c) Deletion des Selektionsmarkers.

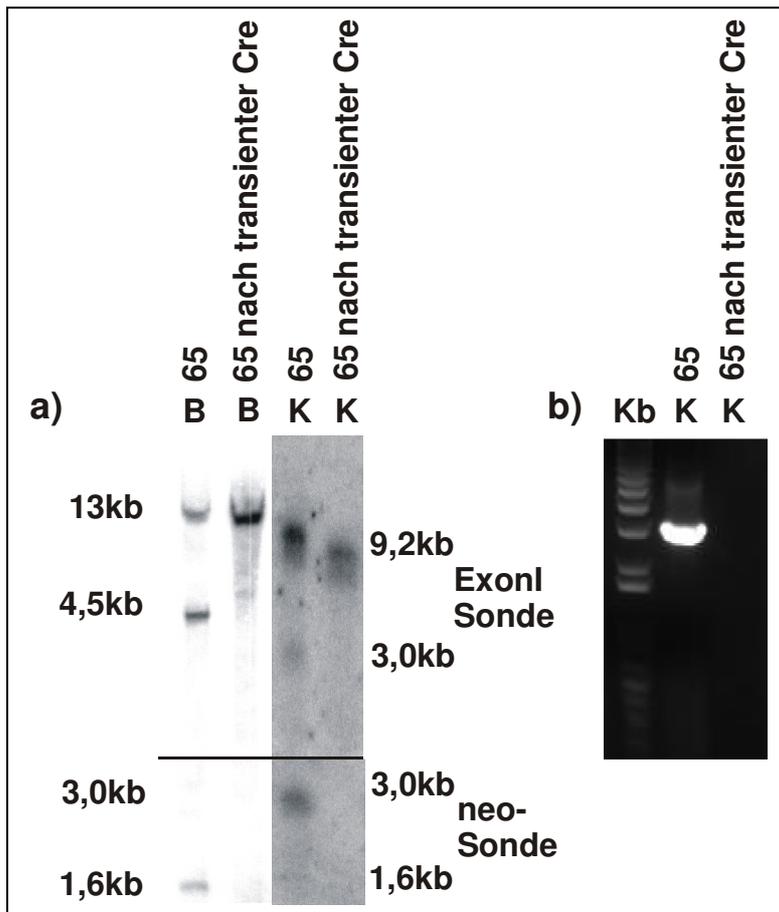


Abb.10: Nachweis der Deletion der loxP flankierten Bereiche vor und nach transienter Cre Expression in den ES Zellen a) Die Southern Blot Analyse mit der Exon1 spezifischen Sonde zeigt, dass auch Exon1 deletiert wurde. Durch das Fehlen der Banden in der Hybridisierung mit der neo-Sonde wird die Neobox Exzision bestätigt. b) die fehlende Bande in der PCR neos/pmcgt20as weist das Ereignis der neo Exzision nach, läßt aber keine Aussage über den Verbleib des geflochten Exon1 Fragments zu.

Tab.2: Zusammenfassung der transienten Cre Expressionen für die homolog rekombinierten ES-Zell Klone 17, 46, 47, 65, 31 und 59 mit den Vektoren pBS185, pIRESCreNLS und pPGKCrebpA.

Vektor	Klon	Anzahl der untersuchten ES-Zellen	unveränderter Locus	Neo exzision	Neo und Exon1 exzision
pBS185 (0,1-20µg)	17, 46, 47, 65	280	268(96%)	0 (0%)	12(4%)
pIRESCreNLS (0,1-20µg)	17, 46, 47, 65	448	430(96%)	0 (0%)	18(4%)
PPGKCrebpA (40µg)	65, 31, 59	198	192 (97%)	0 (0%)	6(3%)

Durch die in Tab.2 dargestellten Experimente konnte keine selektive Exzision der neo-Box nachgewiesen werden. Somit führte weder die Konzentrationsänderung der Vektoren, noch die Verwendung eines anderen Vektors zu einer partiellen Deletion. Abhängig von der Konzentration der Vektoren wurde in verschiedenen Anteilen der gesamte Bereich zwischen den beiden äußeren loxP Sequenzen

deletiert, oder aber der Genlokus blieb unverändert. Aus diesem Grund war die Injektion von ES-Zellen ohne Selektionsmarker nicht möglich, und es wurden direkt positive Zellklone mit dem pMCGT-loxP3 targeting Lokus für die Charakterisierung und Blastozysteninjektion benutzt.

3.1.5 Charakterisierung der homolog rekombinierten ES-Zell Klone

Die Pluripotenz von ES-Zellen ist eine essentielle Voraussetzung für die Durchführung von gene targeting Experimenten. Hierbei ist vor allem die Fähigkeit der Zellen, sich in Keimbahnzellen zu differenzieren, von größter Wichtigkeit, damit die genetische Information dieser Zellen weitervererbt werden kann. Die homolog rekombinierten Klone wurden zur Analyse ihres Differenzierungsgrades mittels EKMA-7 Antikörper, der die Glykolipidstrukturen undifferenzierter Zellen erkennt (Kemler 1980), angefärbt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Färbung aller sechs untersuchten ES-Zell Klone (17, 46, 47, 65, 31, 59). Die mit dem Hintergrund übereinstimmende, nicht vorhandene Färbung der embryonalen Fibroblasten als Beispiel für differenzierte Zellen, zeigte in diesen Fällen die Spezifität der Antikörperbindung. Desweiteren wurden die ES-Zellen mittels alkalischem Phosphatase Assay auf ihre Pluripotenz hin untersucht, die Ausdruck einer hohen alkalischen Phosphatase Aktivität ist (Pease, et al. 1990). Differenzierte Zellen zeigen dagegen keine oder eine stark verminderte Phosphataseaktivität. Ebenso wurden die Klone karyotypisiert, um numerische Chromosomenaberrationen (Mono-, Trisomien) auszuschließen, die die Integration der ES-Zellen in die Keimbahn der manipulierten Embryonen verhindern (Liu, et al. 1997). Hierzu wurden die Metaphasenchromosomen nach osmotischer Lyse der ES Zellen angefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Für alle homolog rekombinierten Klone zeigte sich der korrekte Chromosomensatz von 40 Chromosomen. Auch konnte eine hohe, mit wt-Zellen vergleichbare, alkalische Phosphataseaktivität festgestellt werden (Abb. 11).

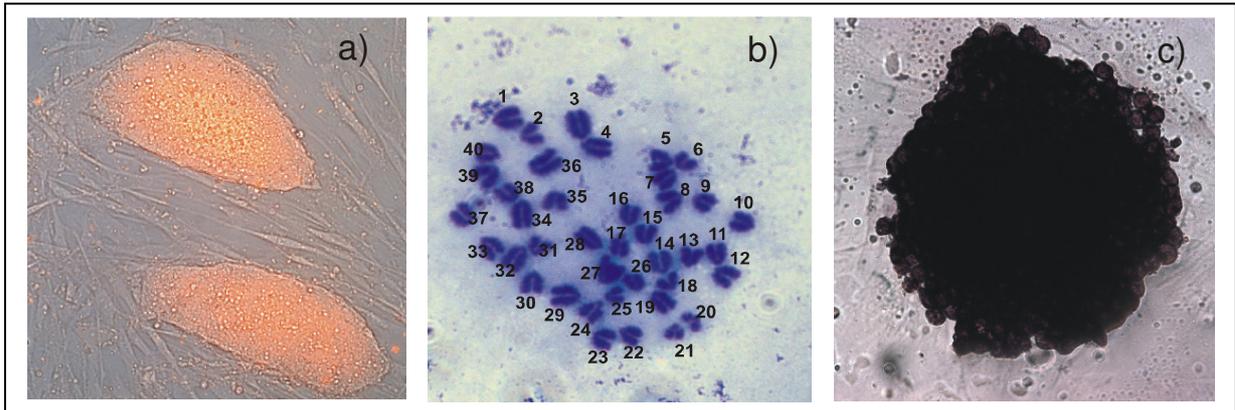


Abb.11: Charakterisierung der homolog rekombinierten ES-Zell Klone am Beispiel von Klon 65 (CJ7) a) Überlagerung einer Immunfluoreszenz und einer Durchlicht Aufnahme der EKMA-7 Färbung mit einem Cy-3 gekoppelten 2. Antikörper (40fache Vergrößerung). Die differenzierten Fibroblasten, auf denen die ES Zellen wachsen, sind nicht angefärbt b) Karyogramm (100fache Vergrößerung; Ölimmersion), die Chromosomen sind willkürlich nummeriert; c) alkalische Phosphatase Färbung (100fache Vergrößerung, Ölimmersion)

3.1.6 Blastozysteninjektion und Rückkreuzungsexperimente

Die homolog rekombinierten ES-Zell Klone wurden für die Injektion in Blastozysten (Tag 3,5 p.c.) aus C57/Bl6 Mäusen verwendet. Hierzu wurden die Blastozysten aus den Uteri der Mäuse isoliert und 15-25 ES-Zellen mit Hilfe einer Mikroinjektionsapparatur auf der inneren Zellmasse der Blastozysten abgelegt. Nach 1-2h Inkubation im Brutschrank wurden 6-15 Blastozysten in ein Uterushorn einer scheinsschwangeren (Tag 2,5 p.c.) CD1 Maus übertragen. Der Chimaritätsgrad der Nachkommen konnte anhand des Agouti Fellmarkers, der durch die injizierten ES-Zellen kodiert wird, bestimmt werden. Durch Rückkreuzungsexperimente mit weiblichen C57/Bl6 Mäusen wurden die fellchimären Böcke auf ihre Keimbahnchimarität hin getestet. Die Tiere wurden fünf bis zehnmal verpaart und ihre Nachkommen bei Auftreten einer braunen Fellfarbe genotypisiert. Tritt nach diesen Verpaarungen keine braune Fellfarbe bei den Jungtieren auf, kann man von einer fehlenden Keimbahntransmission ausgehen. Nach dem Erhalt von 13 (Klon17); 12 (Klon46); 12 (Klon47); 10 (Klon65) und einem (Klon31) fellchimären Böcken (siehe Abb.12) konnte in den Rückkreuzungsexperimenten für keinen Klon eine Keimbahntransmission der homologen Rekombination nachgewiesen werden (Tab 3).

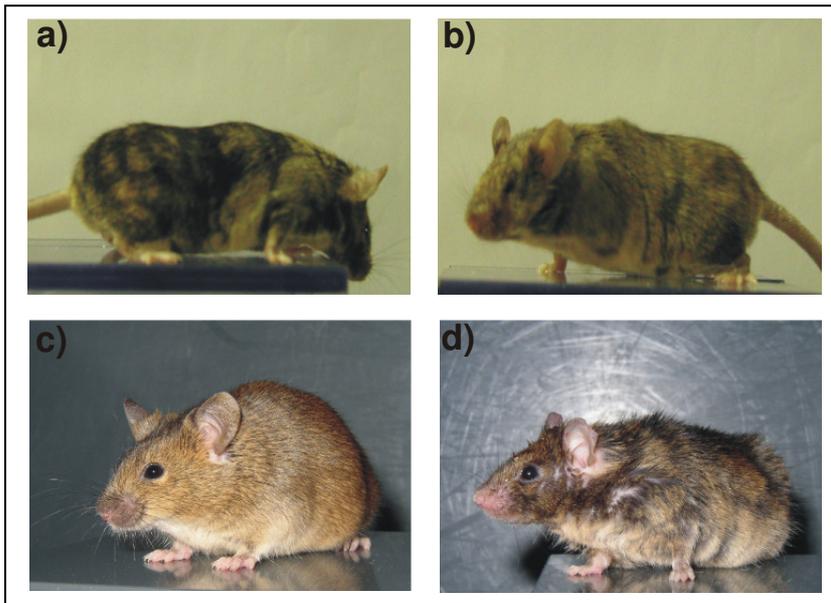


Abb.12: Beispiele chimärer männlicher Nachkommen nach Blastozysten-injektion, die für die Rückkreuzungs-experimente eingesetzt wurden. a) Nachkomme 3 Klon 17 b) Nachkomme 1 Klon 46 c) Nachkomme 6 Klon 65 d) Nachkomme 1 Klon 47.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Injektionsexperimente für die homolog rekombinierten ES-Zell Klone Angaben in [] beziehen sich auf CD1 Blastozystenspender, alle anderen Zahlen beziehen sich auf C57/Bl6 Blastozystenspender.

ES-Zell Klon	Blastozysten spender	Reimpl. Blastozysten	Nachkommen	Chimäre Männchen	Chimäre Weibchen	Keimbahn chimäre Männchen
17CJ7	C57/Bl6	491[182]	108	13	4	0
46CJ7	C57/Bl6	531	75	12	2	0
47CJ7	C57/Bl6	541	57	12	1	0
65CJ7	C57/Bl6	575	93	10	0	0
31V8.1	C57/Bl6	60	12	1	0	0
59V8.1	C57/Bl6	23	6	0	0	0
	Σ	2221[182]	333(15%)	48(7,2 %)	6(0,3%)	0

Nach der nach mehreren Verpaarungen nicht ersichtlichen Keimbahntransmission, wurden die homolog rekombinierten ES-Zell Klone im Vergleich zu wt ES-Zellen und homolog rekombinierten Klonen anderer Linien, die schon zu einer Keimbahntransmission geführt haben(Klon VIII/25 (Zumbansen 2001)), hinsichtlich der Expression verschiedener Markergene auf ihre Pluripotenz hin untersucht. Es wurde besonderes Augenmerk auf die Expression des POU(Pit, Oct, Unc) Domain Transkriptionsfaktors Oct4 (Buehr, et al. 2003, Pesce, et al. 1998a, Pesce und Scholer 2001, Pesce, et al. 1998b, Scholer, et al. 1990) gelegt, da dieser Faktor die Pluripotenz von ES-Zellen anzeigt. Wichtig ist hierbei nicht nur das Vorhandensein des Transkriptionsfaktors, sondern auch die Stärke seiner Expression, da schon relativ geringe Änderungen der Oct4 Expression eine

Differenzierung auslösen können, die nicht durch die Zugabe von LIF beeinflusst werden können (Niwa, et al. 2002, Niwa, et al. 2000). Ebenso wie eine Erhöhung zu einer Differenzierung zu Endoderm und Mesoderm führt (Niwa, et al. 2000), führt eine Reduzierung der Expressionsstärke zu beginnender Differenzierung in trophoblastischer Richtung (Nichols, et al. 1998). Die hier verwendeten Differenzierungsmarker Flk1 für frühe Endothelentwicklung (Yamaguchi, et al. 1993); GATA1 für frühe hämatopoetische Entwicklung (Suwabe, et al. 1998) und Ebox für frühe Differenzierung von ES-Zellen (Jackson, et al. 2002) zeigen eine schon beginnende Differenzierung der ES-Zellen an. Neben den untersuchten Transkriptionsfaktoren gibt es signifikante Hinweise für eine Beteiligung von Stat3 an der Aufrechterhaltung des pluripotenten Status von ES-Zellen, dessen vielfältige Funktionen im Organismus diesen aber für die Bestimmung des Differenzierungszustandes als weniger geeignet auszeichnen (Niwa, et al. 1998, Ogawa, et al. 2004, Raz, et al. 1999).

Als Methode der Wahl wurde die Messung der Expressionsstärke von integriertem ³²P-dCTP mittels semiquantitativer RT-PCR Reaktion gewählt. Die Reaktionsprodukte eines ES-Zell Klons wurden bezogen auf einen internen, endogenen Standard, in diesem Fall das housekeeping Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase). Um die vergleichende Quantifizierung der PCR Reaktionen zu ermöglichen, wurden die Produkte aller Gene per Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und zunächst der lineare Bereich der Reaktionen bestimmt. Die Analyse der amplifizierten DNA geschah mittels Image Quant Software und Phosphoimager (Molecular Dynamics), wobei stets doppelte Ansätze untersucht wurden, um Varianzen der Synthese zu mitteln.

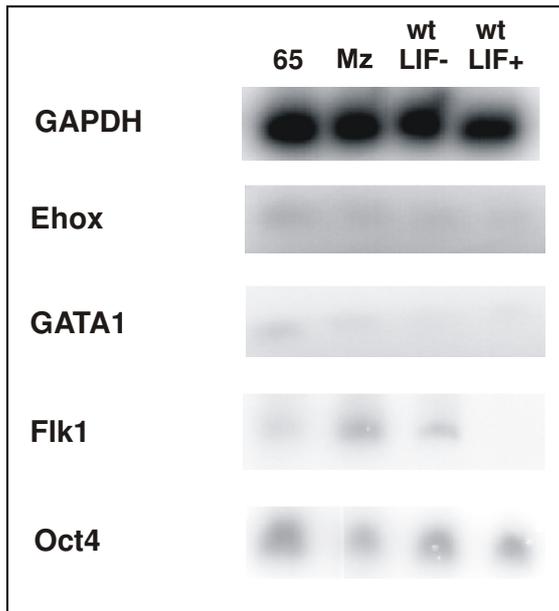
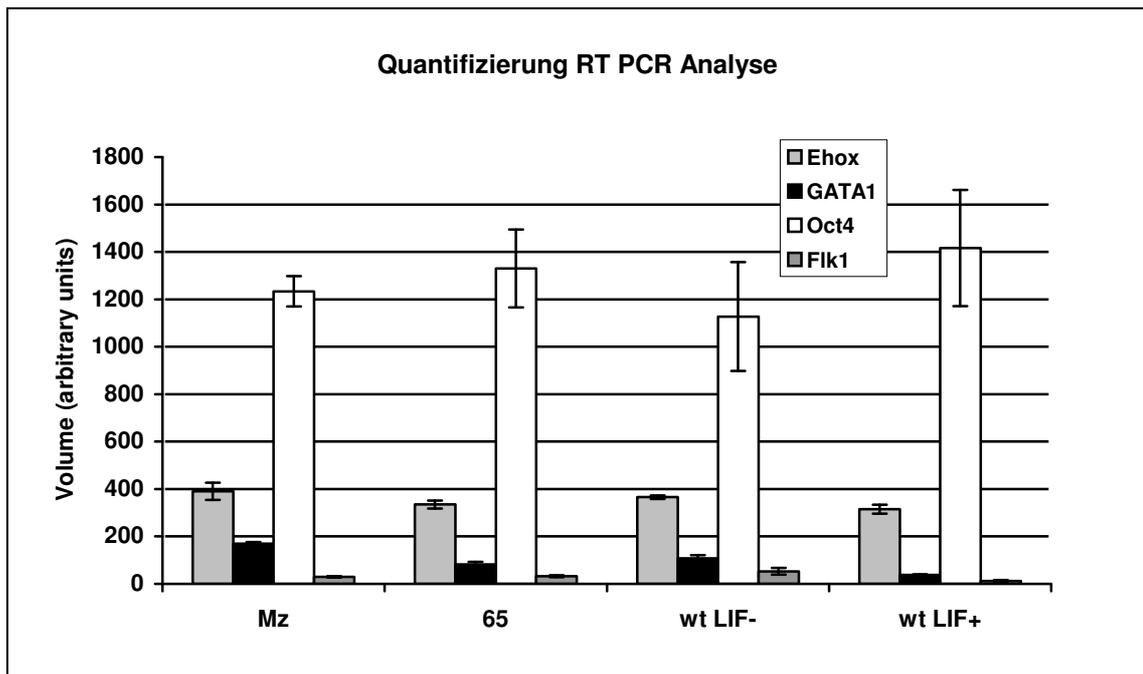


Abb.13: Vergleich der Expressionsstärken für unterschiedliche Differenzierungsmarker nach quantitativer RT-PCR am Beispiel des Klon 65 und wt CJ7 Zellen im Vergleich zu dem Klon (Mz VIII/25) der bereits zu einer Keimbahntransmission geführt hat. LIF- Kulturbedingungen ohne Zugabe von LIF; LIF+ Supplementation von LIF. Links: Abbildung der Autoradiographie der RT PCR; Quantifizierung der Differenzierungsmarker aus der Autoradiographie bezogen auf GAPDH. Die zugehörigen Primer sind im Anhang aufgeführt und in ihrer Herleitung beschrieben.



Aus den oben angeführten Gründen wurde die Expressionsstärke der Differenzierungsmarker relativ zu der von CJ7 wt Zellen (kultiviert unter Zugabe von LIF) ermittelt, die sich in Injektionsexperimenten als keimbahngängig erwiesen haben (von Hoch 2003). CJ7 wt Zellen, die ohne LIF kultiviert wurden, sollten als Negativ-Kontrolle dienen und Zellen mit beginnender Differenzierung darstellen

(Abb. 12). Die Expressionsstärke von Oct4 liegt für die Klone Mz und 65 innerhalb der Fehlergrenzen der wt Zellen (LIF+), während die Expression der Kontrollzellen wt LIF- niedriger ist. Klon 65 und wt LIF+ stimmen innerhalb der Fehlergrenzen in ihrer Ebox Expression überein, während die Klone Mz und wt LIF- jeweils darüber liegen. Alle Klone zeigen hinsichtlich der Expression von GATA1 und Flk1 deutlich höhere Werte, als die wt LIF+ Zellen. Besonders auffällig ist die hohe GATA1 Expression von Klon Mz(VIII/25) gegenüber Klon 65 und wt LIF-.

Die Klone 17, 46, 47, 31 und 59 stimmten mit den Ergebnissen für den Klon 65 innerhalb ihrer Fehlergrenzen überein (ohne Abbildung) und wichen ebenso wie dieser nur hinsichtlich der Expression von GATA1 und Flk1 leicht von den CJ7 wt LIF+ Zellen ab. Allerdings führte Klon Mz(VIII/25) schon zu einer keimbahnchimären Maus, mit der eine transgene Mauslinie etabliert wurde. Da die Expression von Ebox und Oct4, wie auch bei den Klonen 17, 46, 47, 65, 31 und 59, nicht signifikant von den CJ7 wt LIF+ Zellen abwich, kann auch die Expressionsstärke von GATA1 und Flk1 allein nicht die fehlende Pluripotenz erklären, sondern muß im Zusammenspiel mit anderen, hier nicht untersuchten Faktoren, liegen.

Somit ergab die Analyse der hier untersuchten Differenzierungsmarker keine Erklärung für die fehlende Keimbahntransmission der ES-Zell Klone.

3.2 Erstellung einer induzierbaren, myelinspezifischen Cre Expressierenden Mauslinie

Der Erfolg einer Cre-Rekombinase vermittelten induzierbaren Genablation hängt in großem Ausmaß von der Potenz der Cre-exprimierenden Mauslinie ab. Da diese Mauslinien meist durch ein transgenes Konstrukt erstellt werden, kann eine mosaikartige Expression und die Lokalisation des Transgens im Genom, z.B. in schlecht zugänglichen DNA Strukturen, den erwünschten Erfolg vermindern oder sogar gänzlich verhindern.

Das Konstrukt zur Erstellung einer induzierbaren Cre-Rekombinase-Mauslinie sollte einen tetrazyklinabhängigen, reversen Transaktivator (rtTA) unter der Kontrolle des mbp Promoters (Kimura, et al. 1989) beinhalten, durch den das unter einem *tetO7* Promotor (hCMV^{-1*} minimal Promoter verbunden mit einem Heptamer aus Tetrazyklin Operatoren) stehende Cre Gen über eine IRES (*internal ribosome entry site*) Sequenz gekoppelt mit einem EGFP (*enhanced green fluorescent Protein*)Gen (Cubitt, et al. 1995) (Clontech) induziert werden kann. Das EGFP Gen, das ursprünglich aus der leuchtenden Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Shimomura, et al. 1962), ermöglicht unter UV-Licht die Visualisierung von Proteinen in lebenden Zellen. Allerdings wird eine relativ hohe Kopienzahl (ca. 10^5 /pl Zellvolumen) benötigt, um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu überbieten (Lamparter 2000). Die Auswahl des mbp Promoters soll hierbei zu einer gezielten Expression des Transaktivators in Oligodendrozyten und Schwann Zellen, den Zelltypen die neben anderen myelinspezifischen Proteinen die CGT Aktivität im PNS bzw. ZNS besitzen, führen. Durch die gekoppelte Expression der Cre Rekombinase und des *enhanced green fluorescent protein* ist ein indirekter Nachweis der Cre-Rekombinase im Gewebeschnitt möglich. Das zugefügte β -Globin Intron und das folgende polyA Signal dienen der Initiation der Proteinbiosynthese des reversen Transaktivators bzw. deren Termination. Es sollte ein bicistronischer Vektor erstellt werden, um die unabhängige Expression des Transaktivators und nachfolgend des cre-Gens gekoppelt mit dem egfp-Gen bei gleichzeitigem Einbau und geringem Einfluß durch die sonst nötige, mehrfache Transfektion zu gewährleisten. Die Wahl eines tetrazyklinabhängigen Systems ist

für die hier zu untersuchende Fragestellung sinnvoll, da Doxyzyklin als Tetrazyklinderivat eine höhere Lipophilie besitzt und die Bioverfügbarkeit auch im Hirn gegeben ist (Baron und Bujard 2000). Dies wird ebenso durch eine Reihe von Studien zur Therapie von Borreliose Erkrankungen (Dotevall, et al. 1988, Dotevall und Hagberg 1989, Dotevall, et al. 1999, Karkkonen, et al. 2001, Karlsson, et al. 1996, Karlsson, et al. 1994), wie auch bestehende Tetrazyklin-, bzw. Doxyzyklin-induzierbare Cre exprimierende Mauslinien bestätigt (Gimenez, et al. 2004, Huang, et al. 1999, Lindeberg, et al. 2002, Sakai, et al. 2002, Tremblay, et al. 1998, Vogel, et al. 2004). Somit ist generell die Tauglichkeit des Systems gegeben.

3.2.1 Klonierungsstrategie

Als Grundvektor wurde pIRES2-EGFP (Clontech) verwendet. Der tetO7 Promoter aus pUHD15-1 (Gossen und Bujard 1992) wurde als 400bp Fragment XhoI/EcoRI isoliert und gerichtet in den ebenso linearisierten pBluescript Vektor eingefügt. In den resultierenden Vektor wurde in die EcoRI Schnittstelle ein modifiziertes cre Gen (Uschkureit 2000) eingefügt. Dieses enthält neben einer nuclear localization sequence (NLS)(Yoneda 1997) auch eine Kozak Sequenz (Kozak 1987) zur Transkriptions-Initiation. Die Orientierung des mbp-Promoters wurde mittels Sequenzierung nachgewiesen. Das XhoI/PstI Fragment aus diesem Vektor, das die beiden Sequenzen enthält, wurde in den XhoI/PstI linearisierten pIRES2-EGFP Vektor inseriert. Der resultierende Vektor wurde pCMVcreIRES2-EGFP (6,8kb) genannt. Der MBP Promoter wurde als 1,4kb HindIII/EcoRI Fragment in einen ebenso linearisierten pBluescript eingefügt. In die verbleibende EcoRI Schnittstelle wurde der reverse Transaktivator, gefolgt von einem β -Globin Intron (1,6kb) aus pUHG17-1, ungerichtet in diesen Vektor ligiert. Dieser Transaktivator wurde nach Absprache mit Mitarbeitern des Laboratoriums von Prof. Bujard in Heidelberg und nach der Maßgabe der Homepage des tetCre Systems (Bujard 1996) verwendet. Die Orientierung wurde durch Sequenzierung bestimmt. Ein 200bp NdeI/EcoRI polyA Fragment aus pUHG17-1 wurde „blunt end“ hinter das β -Globin Intron plaziert. Die Orientierung wurde wiederum durch Sequenzierung überprüft. In die verbleibende SpeI Schnittstelle wurde ein XhoI Linker (NEB S1073S) eingefügt.

Durch XhoI Verdau konnte das gesamte Fragment mit mbpPromoter, rtTA, β Globin Intron und polyA isoliert werden und in den XhoI linearisierten Vektor pCMVcreIRES2-EGFP ungerichtet eingefügt werden. Hierdurch ergaben sich die Vektoren pinduzCREsense (10,1kb) und pinduzCREantisense (10,1kb), die durch PCR, mehrere Restriktionsschnitte, nachfolgendem Southern Blot und Sequenzierungen (siehe Anhang) überprüft wurden. Die Klone 15 und 20 zeigten in den Analysen die Merkmale von pinduzCREantisense und wurden im folgenden verwendet. Die Linearisierung der Vektoren erfolgte jeweils mit AflIII.

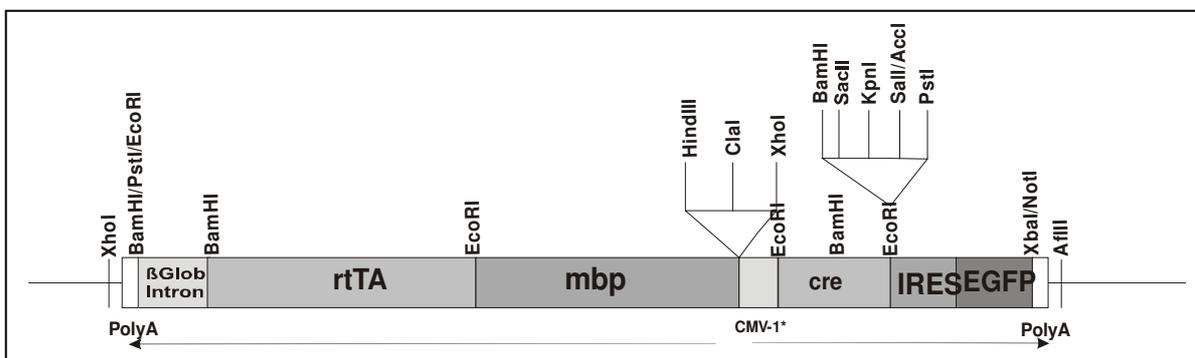


Abb.14: Schematische Darstellung des Vektors pinduzCREantisense Die Pfeile geben die Orientierung (5' nach 3') der zugehörigen Fragmente an. Die Erkennungsstellen für die verschiedenen Restriktionsendonukleasen sind nicht vollständig wiedergegeben. Sie dienen dem Verständnis der im Text beschriebenen Klonierung. Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht.

3.2.2 Charakterisierung von pinduzCREantisense

Der Vektor pinduzCREantisense wurde vor seiner Verwendung eingehend charakterisiert, um zu gewährleisten, dass keine Fehler die Funktion des Vektors im transgenen Tier beeinflussen. Hierzu wurden Southern Blot Analysen nach verschiedenen Restriktionsschnitte des Vektors mit den drei verschiedenen Sonden mbpPromoter, cre und egfp durchgeführt (Tab.4 und Abb.14). Zusätzlich wurden neben PCR Analysen mit spezifischen Primern (Abb.14d)) die entscheidenden Bereiche sequenziert (siehe Anhang).

Tab. 4: Die Tabelle gibt die erwarteten Fragmente nach diversen Restriktionen und die erwarteten Hybridisierungen mit der mbpPromoter-, cre- und egfp- Sonde wieder

Restriktions- endonuklease	Schnitt- muster	Erwartete Hybridisierung	Restriktions- endonuklease	Schnitt- muster	Erwartete Hybridisierung
AfIII	10,1 kb	10,1 (mbp) 10,1 (egfp) 10,1 (Cre)			
BamHI	5,5kb 3,0kb 0,9kb 0,7kb	3,0 (mbp) 5,5 (egfp) 0,9; 0,7 (Cre)	PstI	5,5kb 2,3kb 1,6kb 0,7kb	1,6 (cre) 2,3 (mbp) 5,5 (egfp)
EcoRI	5,5kb 1,9kb 1,6kb 1,1kb	1,9 (mbp) 5,5 (egfp) 1,1 (Cre)	Sall	6,4kb 2,1kb 1,1kb 0,5kb	6,4 (egfp) 1,1 (Cre)
HindIII	6,8kb 1,8kb 1,5kb	1,8 (mbp) 6,8 (egfp) 1,8 (Cre)	XhoI	6,8kb 3,3kb	3,3 (mbp) 6,8 (egfp) 6,8 (Cre)

Die Sequenzierungen, die Überprüfung durch PCR und die Southern Blot Analyse bestätigten die erwartete Konfiguration des Vektors pinduzCREantisense, so dass dieser für die nachfolgenden Experimente verwendet wurde.

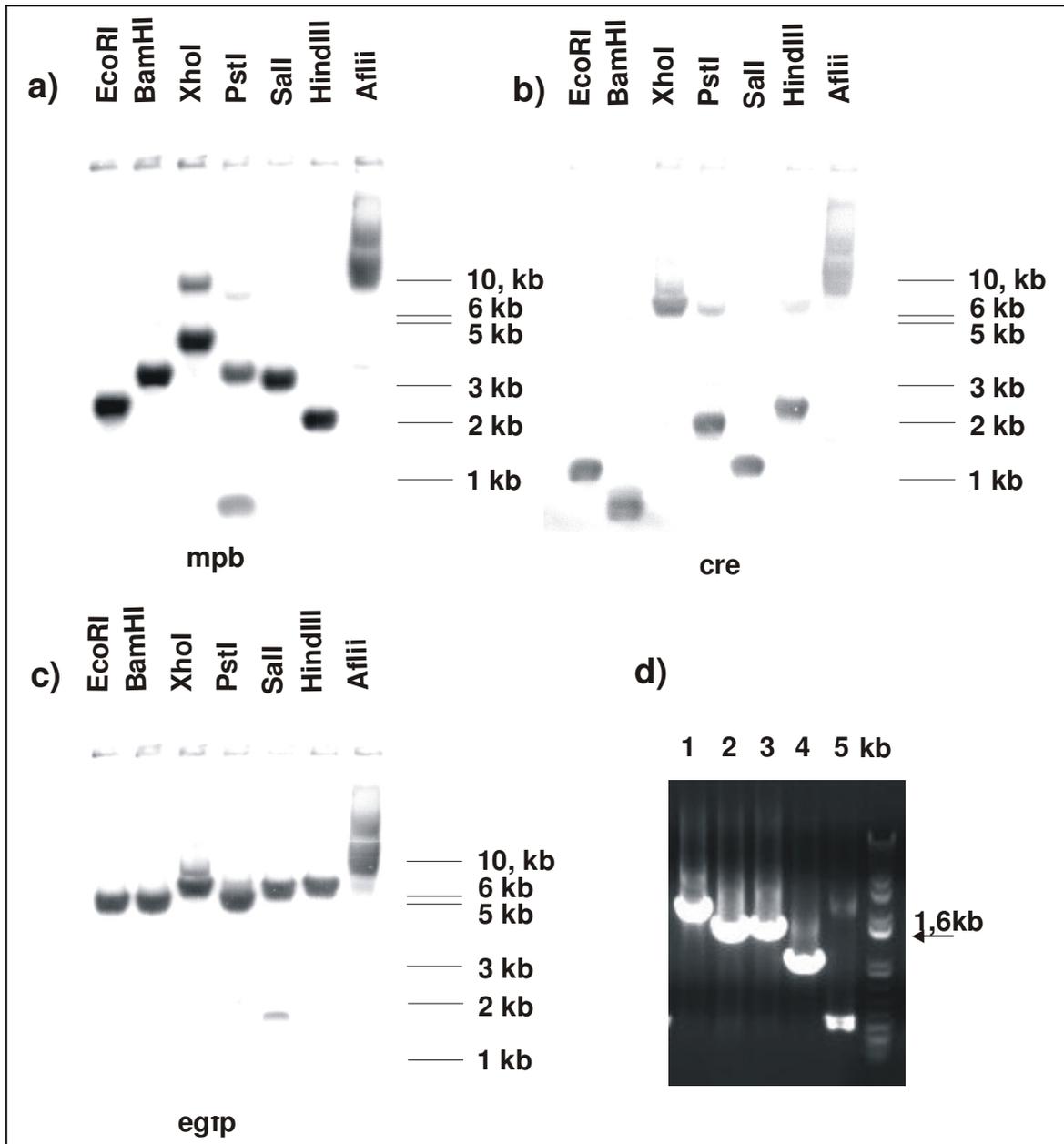


Abb.14: Überprüfung des Vektors pinduzCREantisense durch Southern Blot Analyse der a) *mbp*Promoter, b) *cre*, c) *egfp* Sonde; die erwarteten Fragmentenhybridisierungen zu den entsprechenden Sonden sind in Tabelle 4 aufgelistet und d) verschiedenen Primerkombinationen durch PCR. Primerkombinationen sind: 1 *mbpas*/*EGFPas* ~2,3kb; 2 *Cres*/*EGFPas* ~1,8kb; 3 *SC1+*/*EGFPas* ~1,8kb; 4 *Cres*/*Creas* ~1kb; 5 *SC1+*/*SC3-*~200bp; zur Lage der Primer siehe Anhang

3.2.3 Transfektion von Olineu Zellen

Das System wurde in der immortalisierten Oligodendrozyten-Zelllinie Olineu (Trotter und Schachner 1989) getestet. Hierzu wurde an transient exprimierenden Zellen die Induktion des Transaktivators mit dem Tetrazyklinderivat Doxyzyklin ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) vorgenommen, da hierbei eine deutlich bessere Aktivierung zu erwarten ist als mit Tetrazyklin selbst (Gossen, et al. 1995). $5\mu\text{g}$ des gereinigten Vektors wurden für die transiente Transfektion von 10^7 Zellen verwendet. Eine Fluoreszenz ohne Doxyzyklin Zugabe würde bedeuten, dass das System „leaky“ ist und der tetO7 Promoter die Transkription von Cre und EGFP auch ohne Aktivierung durch Tetrazyklin oder ein Analogon initiiert. Weder mit noch ohne Aktivierung durch Doxyzyklin konnte in transfizierten Olineu Zellen eine EGFP Aktivität mit signifikantem Unterschied zum Hintergrund der mock Transfektion beobachtet werden (Abb.15). Eine Expression von EGFP sollte in einer ubiquitären Färbung der Zellen resultieren. Kontrollexperimente mit EGFP Expression unter der Kontrolle des mbp Promoters zeigten jedoch die erwartete Fluoreszenz (Abb.22), so dass die Funktionalität des mbp Promoters in diesen Zellen nachgewiesen werden konnte. Es konnte mit diesem Versuchsansatz jedoch keine abschließende Aussage über das Konstrukt im in vivo Experiment getätigt, noch konnte die gekoppelte Cre und EGFP Expression durch Vermittlung der IRES

Sequenz nachgewiesen werden.

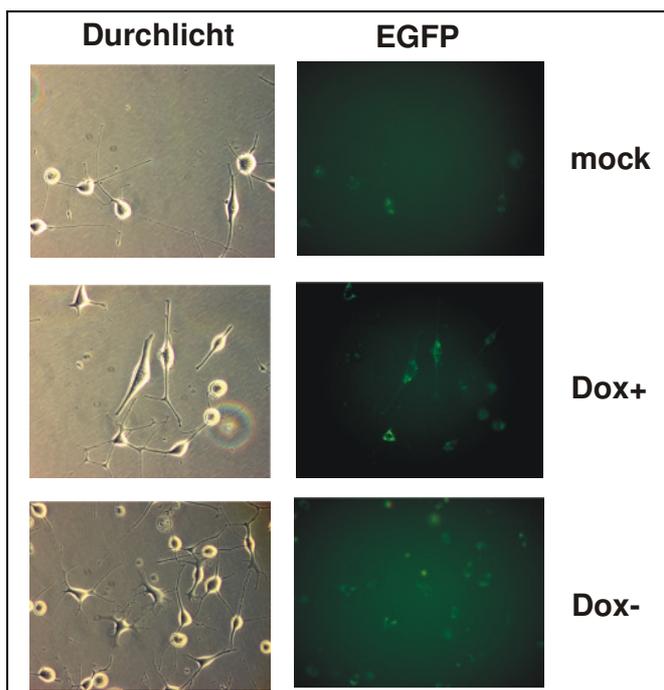


Abb.15: Fluoreszenzanalyse der mit pinduzCREantisense transfizierten Olineu Zellen mit (Dox+) und ohne (Dox-) Induktion durch Doxyzyklin. Als Vergleich dienten „mock“ transfizierte Zellen.

3.2.4 Vorkerninjektion und Etablierung der Mauslinie

Die Injektion von Fremd-DNA in den männlichen Vorkern befruchteter Eizellen integriert diese DNA durch heterologe Rekombination in das Wirtsgenom (Hogan, et al. 1986). Der Vektor pinduzCREantisense wurde nach AflII Linearisierung und Reinigung in einer Konzentration von 1-2ng/ μ l durch Mikroinjektion in das Genom von CD1 Mäusen eingefügt. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Injektionsexperimente. Hierbei entwickelten sich aus 278 injizierten und reimplantierten Eizellen 85 Nachkommen (30,9%), von denen 8 (9,4%) das Transgen enthielten. Durch Verpaarung mit CD1 Wildtyp Mäusen und anschließendem Kreuzen der Nachkommen wurde eine stabile Linie für das Transgen etabliert.

Tab. 5: Übersicht über die Vorkerninjektionsexperimente zur Erstellung der transgenen induzCRE Maus

	Anzahl der reimplantierten Eizellen	Anzahl der Foster	Anzahl der Nachkommen	Anzahl der transgenen Nachkommen
pinduzCREantisense	278	17	85(30,9%)	8(9,4%)

3.2.5 Genotypisierung der transgenen Mäuse

Die transgenen induzCre Nachkommen wurden mittels Southern Blot und PCR analysiert. Für die Southern Blot Analyse wurde der mbp Promoter als Sonde gewählt, der es ermöglichte, neben dem Nachweis des Transgens die Anzahl der Kopien des mbp Promoters zu bestimmen. Durch PstI Restriktion entstehen im Transgen ein 2,3kb und ein 2,2kb Fragment, die jeweils den halben mbp Promoter beinhalten und daher beide mit der mbp Promoter Sonde hybridisieren. Allerdings lassen sich diese beiden Banden aufgrund ihrer ähnlichen Größe im Southern Blot nicht unterscheiden und stellen eine Bande dar. Im endogenen Locus erzeugt der PstI Verdau ein 1,1kb Fragment und ein Fragment von über 3,2kb Größe. Durch zwei PCR wurden die Tiere durch die Primerkombination SC1+/SC3- und Cres/Creas (Abb.16) charakterisiert. Nach der ersten Bestätigung durch PCR und Southern Blot wurde die Zucht der Mauslinie weiter durch PCR analysiert.

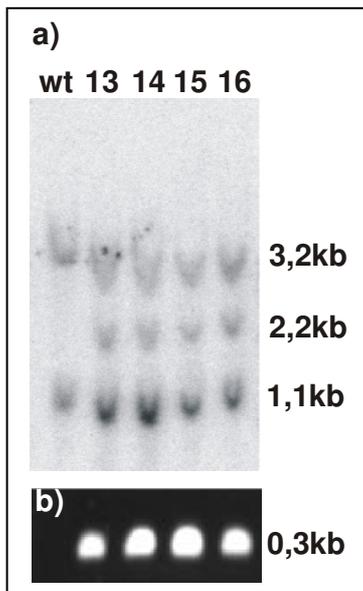
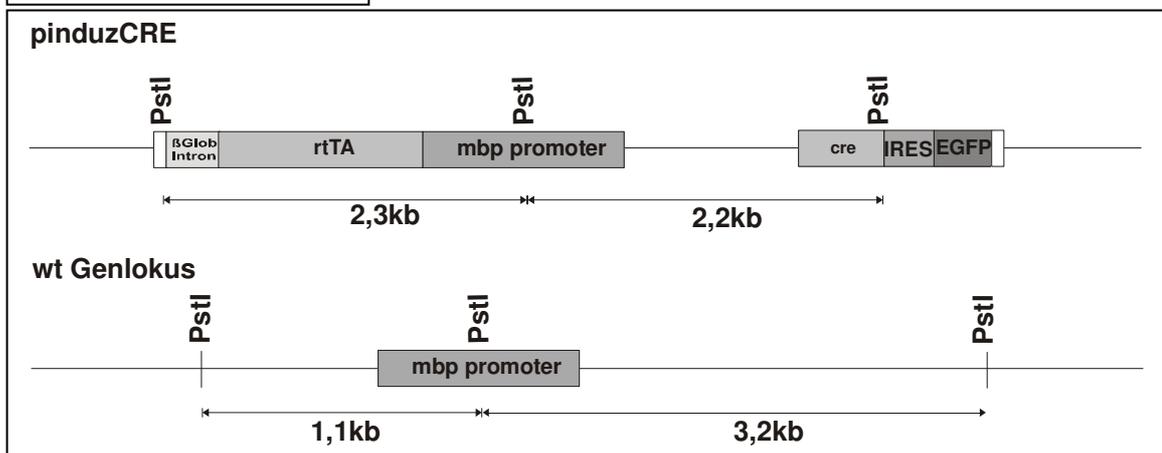


Abb.16: Nachweis des Transgens in der Mauslinie induzCre am Beispiel der Tiere 13-16 und einer wt Kontrolle durch a) Southern Blot: Im wt sind nur die beiden durch den mbp Promoter anfärbbaren Banden zu erkennen; in der DNA der Tiere 13-16 ist die spezifische Bande des Transgens bei 2,2/2,3 kb. b) PCR Analyse mit der Primerkombination SC1+/SC3-; die DNA der Tiere 13-16 ergibt die spezifische Bande bei 0,3kb, die im wt fehlt. Die Darstellung des Konstruktes und des mbp Promoter wt Lokus verdeutlichen die erwarteten Fragmente.



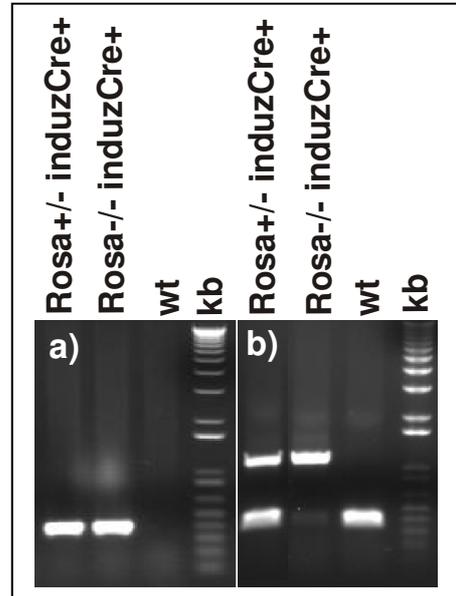
3.2.6 Kreuzung mit der ROSA26βgeo Mauslinie

Die ROSA26βgeo Mauslinie (Mao, et al. 1999) ermöglicht ein sicheres „Monitoring“ von Cre-Rekombinase abhängigen DNA Exzisionen in Mäusen. Dafür wurde ein beta-Galaktosidase Neomycin Phosphotransferase Fusions Gen (βgeo) in den ROSA26 Locus durch gene targeting integriert. Das βgeo Reportergen wird nur nach erfolgter Exzision eines vorgelagerten loxP flankierten DNA Bereiches exprimiert. Die β-Galaktosidase Färbung im Gewebeschnitt oder im Embryo ist ein indirekter Nachweis für die erfolgte Rekombination. Ebenso kann die Rekombination auf DNA Ebene durch Southern Blot Analyse und PCR nachgewiesen werden. Mäuse mit dem induzCre Transgen wurden mit Mäusen

der Linie ROSA26 β geo gekreuzt und die Nachkommen auf ihren Genotyp hin analysiert. Tiere die für beide Transgene positiv waren, wurden für die weiteren Experimente eingesetzt.

Abb.17: PCR Analyse der DNA aus Mausschwänzen zur Bestimmung des Genotyps der Nachkommen der induzCRE/ROSA26 β geo Mauslinie

a) Primerkombination SC1+/SC3- das ca.300bp Cre spezifische Fragment ist nur bei den transgenen Tieren nachweisbar. Hierzu vergleichende PCR Überprüfung des Konstruktes, Abb.14 b) Primerkombination R523 / R1295 / F150 (Mao, et al. 1999) Sowohl die Bande für den wt ROSA26 Locus bei 375bp als auch die Bande für den rekombinanten Locus bei 1146bp charakterisieren das heterozygote Tier, während die wt Bande bei homozygoten Tieren fehlt und die Bande für den rekombinanten Locus im wt nicht auftritt. Zur Lage der Primer siehe Anhang.



3.2.7 Analyse der induzCRE/ROSA26 β geo Mäuse

3.2.7.1 β -Galaktosidase Färbung und Fluoreszenzanalyse

Wie oben beschrieben, dient die Färbung durch β -Galaktosidaseaktivität im Gewebe als indirekter Nachweis für eine Aktivität der Cre-Rekombinase. Mäuse, die sowohl den modifizierten ROSA26 Locus als auch das Transgen besaßen, wurden im Alter von 25-35 Tagen, dem Expressionsmaximum für das mbp Gen, analysiert. Hierzu wurden Mäuse über 24-48h mit doxyzyklinhaltigem Wasser (1 μ g/ μ l) versorgt und ebenso wie Kontrollgruppen ohne Doxyzyklingabe mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert. Die Hirne wurden isoliert, in O.C.T. (Tissue Tek, Miles Scientific) eingebettet, im Gefriermikrotom geschnitten, fixiert und mit X-Gal gefärbt. Hirnschnitte wurden unter einem inversen Lichtmikroskop betrachtet. Sie zeigten keine spezifischen, von der wt Kontrolle abweichenden Färbungen (Abb. 18).

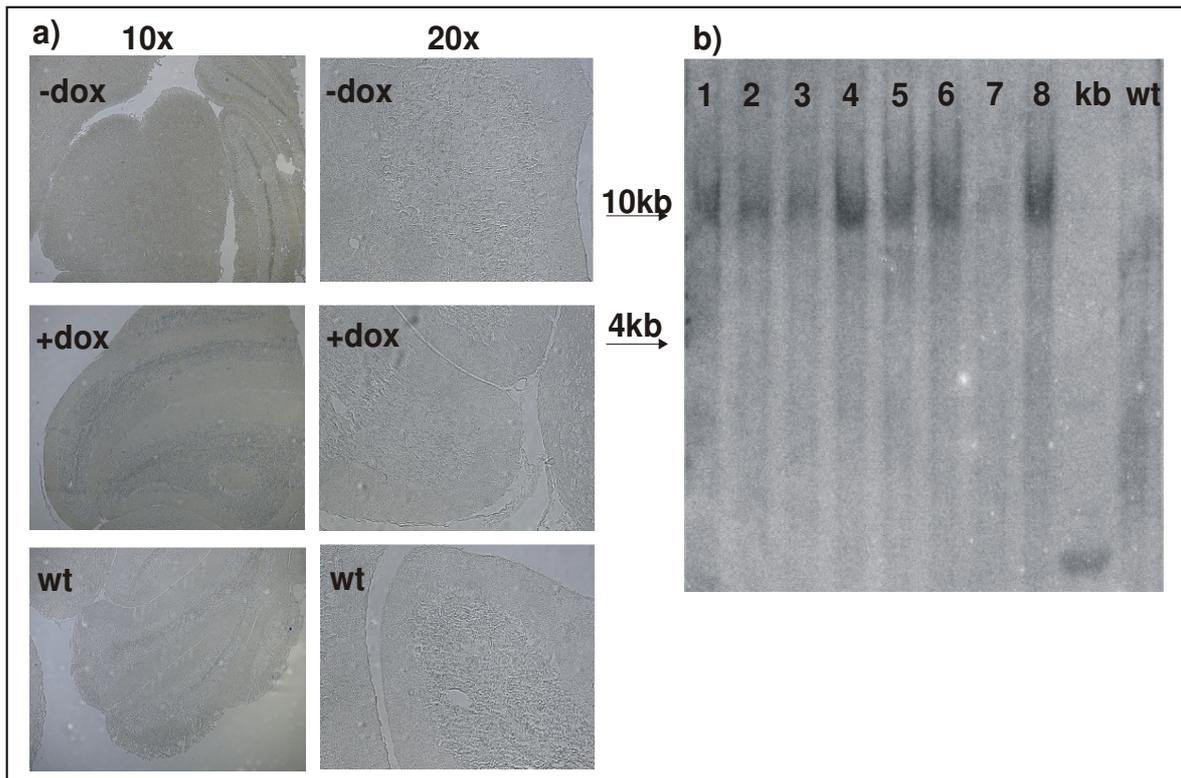


Abb.18: Analyse der induzCRE/ROSA26betageo Mäuse a) β -Galaktosidase Färbung des Kleinhirns nach (Dox+) und ohne (Dox-) Induktion durch Doxyzyklin im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle (wt), Aufnahmen jeweils mit 10- bzw. 20-facher Vergrößerung; b) Southern Blot Analyse von Gesamt-Hirn DNA mit einer neo-Sonde; die DNA der Tiere nach Doxyzyklingabe (1-7) zeigt die gleiche Bande bei 10kb, wie die ROSA26betageo Maus ohne Doxyzyklin (8). Die Bande fehlt in der wt Kontrolle.

Für die Fluoreszenzanalyse wurden die Mäuse mit 0,9% NaCl perfundiert, die Hirne isoliert, sofort kryofixiert, geschnitten und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Weder mit noch ohne Stimulation durch Doxyzyklin konnte eine Fluoreszenz in den angefertigten Hirnschnitten beobachtet werden (ohne Abbildung). In den analog zur Fluoreszenzanalyse angefertigten Hirnschnitten tritt eine β -Galaktosidase Färbung in den myelinreichen Regionen des Kleinhirns weder mit noch ohne Doxyzyklin Zugabe auf (Abb. 18). Hierbei sind keine signifikanten Unterschiede zu korrelierenden Hirnbereichen von wt Kontrollen ersichtlich. Durch die Southern Blot Analyse von Hirn DNA wurde ebenso keine Veränderung im homolog rekombinierten Genlokus nachgewiesen. Im unveränderten Genlokus tritt nach XbaI Restriktion eine 10kb Bande auf, die nach Modifikation durch Cre Rekombination in eine 4kb Bande überführt wird (Mao, et al. 1999). Für die hier untersuchten Tiere 1-7 konnte im Vergleich zur ROSA26betageo (8) und wt Maus Cre Rekombination nachgewiesen werden.

Übereinstimmend mit den Tests in Olineu Zellen wurde keine Cre bzw. EGFP Aktivität in den transgenen Tieren mit oder ohne Doxyzyklin Aktivierung festgestellt.

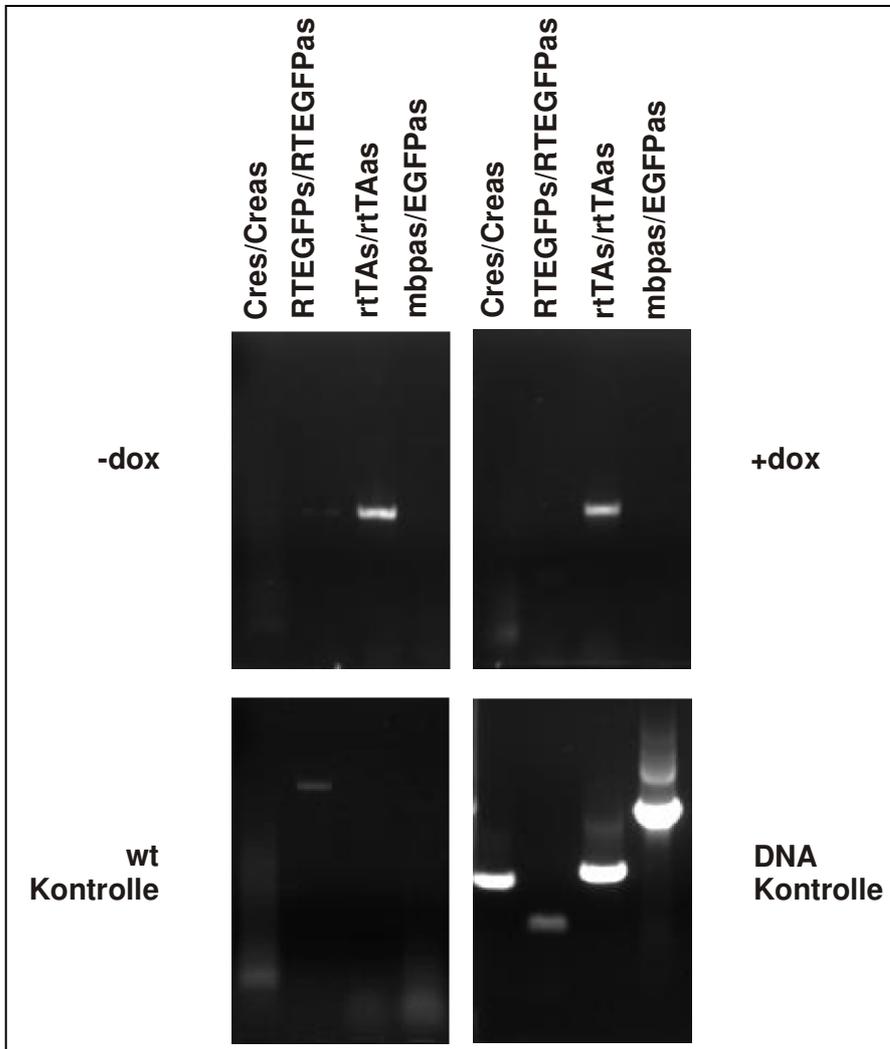


Abb.19: RT-PCR Analyse der ROSA26/induzCR E Mauslinie vor und nach Doxyzyklingabe im Vergleich zu wt Mäusen und genomischer DNA aus diesen Mäusen als positive Kontrolle. Die mbpas/EGFPas PCR nach reverser Transkription diente als Kontrolle, um eventuelle DNA Verunreinigungen auszuschließen. Zur Lage der Primer siehe Anhang

3.2.7.2 RT-PCR Analyse

Da der indirekte Nachweis der Cre Rekombinase in den Gewebeschnitten, wie auch der Southern Blot Analyse nicht möglich war, wurde die Expression der Transgene auf Transkriptionsebene untersucht. In der RT-PCR Analyse von Gesamthirn RNA der ROSA26/induzCRE Mauslinie tritt weder mit noch ohne den Induktor Doxyzyklin die spezifischen Banden für das Cre Gen und das EGFP Gen auf (Abb. 19). Einzig der reverse Transaktivator ist als Fragment nachweisbar. Wegen des Fehlens der Bande in der wt Kontrolle können diese als spezifisch

betrachtet werden. Als positive Kontrolle diente eine PCR mit Mausschwanz DNA und denselben Primern. Eventuelle DNA Verunreinigungen, die zu einer Verfälschung der RT-PCR führen könnten, wurden durch die Primerkombination mbpas/EGFPas ausgeschlossen, die nur auf DNA Ebene zu einem Produkt führen können und für die RT-PCR kein Produkt aufweisen. Somit bestätigte die RT-PCR die Ergebnisse der β -Galaktosidase Färbungen und zeigt das Fehlen der spezifischen Transkripte für Cre und EGFP in der induzierten und nicht induzierten transgenen Maus.

3.3 Analyse des putativen Promoterbereiches der murinen CGT

3.3.1 Klonierungsstrategien

Der Klon pMCGT7 (Bosio 1997, Meininger 1998) liefert zusätzlich zu dem ersten cgt Exon auch einen 5' wärts gelegenen untranslatierten Bereich, in dem durch *primer extension* bei -144 bp stromaufwärts vom Translationstart der wahrscheinliche Transkriptionsstart lokalisiert wurde (Bosio 1997). Trotz Berichten über das Vorhandensein eines nicht kodierenden Exon O, das den 5' untranslatierten Bereich des Gens trägt (Coetzee, et al. 1996b) wurde der hier vorliegende, etwa 3kb umfassende 5' untranslatierte Genabschnitt hinsichtlich des cgt Promoters oder zugehöriger regulatorischer Sequenzen untersucht. Eine erste Analyse des Bereiches wurde nach seiner Sequenzierung durch die Programme *findpatterns* im *Wisconsin Package* der *GCG Genetics Computer Group, Inc.*, *MatInspector* (Quandt, et al. 1995) und *PromoterInspector* (*Genomatix*) durchgeführt. Durch das Programm *PromoterInspector* konnte keine Promoterregion in der Sequenz erkannt werden. Allerdings führte die Suche nach Transkriptionsfaktorbindungsstellen mit den beiden anderen Programmen zu Listen mit 446 (*findpatterns*) und 273 (*MatInspector*) möglichen Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren. Besonders Transkriptionsfaktoren wie der *homeodomain* Faktor GTX (Awatramani, et al. 2000, Awatramani, et al. 1997) und AP1 (*activator protein1*)(Olive, et al. 1997), die für die Entwicklung von Oligodendrozyten mitverantwortlich sind, machten die Untersuchung des Bereiches in eukaryontischen Zellen sinnvoll. Allerdings wurden eine Reihe bekannter neuronaler Transkriptionsfaktoren, wie Sox10, Olig1 und Olig2, oder Brn-1 und Brn-2 (Wegner 2001) nicht gefunden.

Zur Analyse wurden mit Vektoren der Reihen pEGFP (*Clontech*) und pCAT (*Promega*) zwei verschiedene Reportersysteme verwendet, um die Sequenz zu charakterisieren. Das nach UV-Anregung fluoreszierende EGFP kann, wie schon beschrieben (3.2), als Indikator in zellulären Systemen dienen. Die Vektoren der pCAT Reihe ermöglichen dagegen die Analyse über die von der Chloramphenicol Acyltransferase (CAT) katalysierte Reaktion. CAT ist ein bakterielles Enzym, das Chloramphenicol durch Acylierung an einer oder beiden Hydroxylgruppen

inaktiviert. Da das Enzym in Eukaryonten nicht vorkommt und somit dort keine Hintergrundaktivität besitzt, stellt es ein geeignetes System zur quantitativen Analyse der Genexpression dar (*Promega, pCAT reporter Vektors*).

In diese Vektoren wurden, wie in Abb.20 dargestellt, Fragmente unterschiedlicher Länge des 5' untranslatierten Bereiches des murinen CGT Gens, in der gleichen Orientierung wie die des nachfolgenden Gens, eingefügt. Die trunkierten Fragmente 1kbcgt5'utrl und 2kbcgt5'utrl enthielten nur die vom 5' Ende aus gesehenen ersten 1000bp, bzw. 2000bp, und sollten zum Eingrenzen eventueller genregulatorischer Funktionen dienen. Die Fragmente wurden durch PCR mit den folgenden Primerkombinationen (siehe Anhang):

- 1kbcgt5'utrl – cgt3kb3Xho und cgtExl3as
- 2kbcgt5'utrl – cgt3kb5'Xho und cgt Exl3as
- 3kbcgt5'utrl – cgtIN5s und cgtExl3as

amplifiziert und anschließend in den Vektor pCR2.1 (*Invitrogen*) kloniert und durch Sequenzierung validiert. Danach wurden die Fragmente mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI für die Vektoren pCAT-Basic und pCAT-Promoter bzw. HindIII und ApaI für pEGFP1 ausgeschnitten und in die ebenso linearisierten Vektoren gerichtet eingefügt und in die transiente Transfektion eingesetzt.

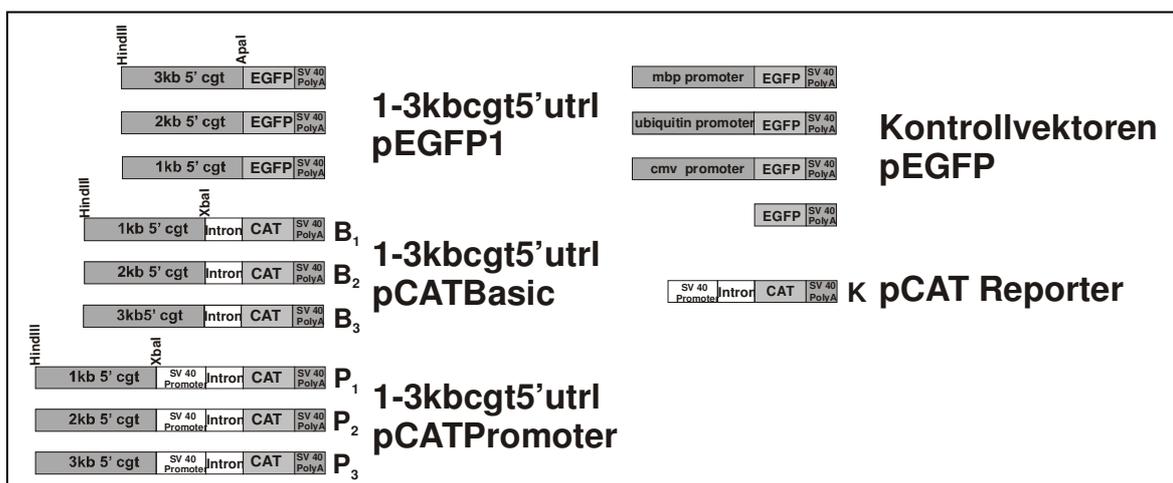


Abb. 20: Vektoren für die Analyse des 3kb 5' untranslatierten Bereiches des murinen cgt Gens. Beschreibung der Klonierungen im Text. B₁₋₃ und P₁₋₃, sowie K siehe Abb.23.

Als Kontrollvektoren dienten pEGFP1 (*Clontech*), cmvPromoterEGFP (=pEGFPN2) (*Clontech*), mbpPromoterEGFP (Laborpräparation), und ubiquitinPromoterEGFP (Laborpräparation) Konstrukte, sowie der pCATReporter Vektor (*Promega*).

Aufgrund ihrer endogen nachgewiesenen CGT-Aktivität (Abb. 21) wurden mittels dieser Vektoren sowohl Olineu-(Trotter und Schachner 1989) als auch HEK293-Zellen transfiziert und auf die putative Promoteraktivität untersucht.

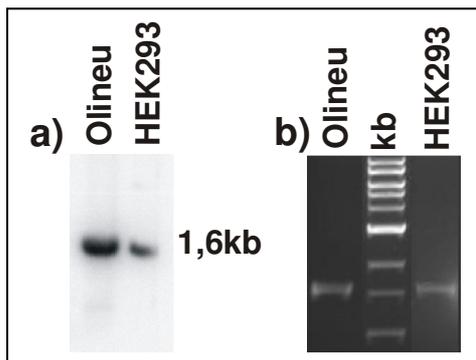


Abb.21: a) Northern Blot und b) RT-PCR Analyse der Olineu und HEK293 Zellen a) spezifische Hybridisierung mit der 1,6kb rnCGT cDNA Sonde für beide Zelltypen b) RT PCR Analyse mit den Primern CGTs und CGTas (siehe Anhang). In beiden Zelltypen ist das spezifische Produkt bei 220 bp detektierbar.

3.3.2 EGFP Fluoreszenzanalyse

Die Kontrollvektoren cmvEGFP(pEGFPN2) und ubiquitinEGFP zeigten sowohl in HEK293-, als auch in Olineu-Zellen die erwartete Fluoreszenz bei einer Transfektionsrate von etwa 10%. Für das mbpEGFP Konstrukt wurde eine schwächere Fluoreszenz in beiden Zelltypen detektiert. Weder für das 3kb5'utrEGFP Konstrukt, noch für die Konstrukte 1kb5'utrEGFP und 2kb5'utrEGFP konnte in einem der beiden Zelltypen eine von der pEGFP1 Kontrolle bzw. dem Hintergrund unterscheidbare Fluoreszenz gezeigt werden.

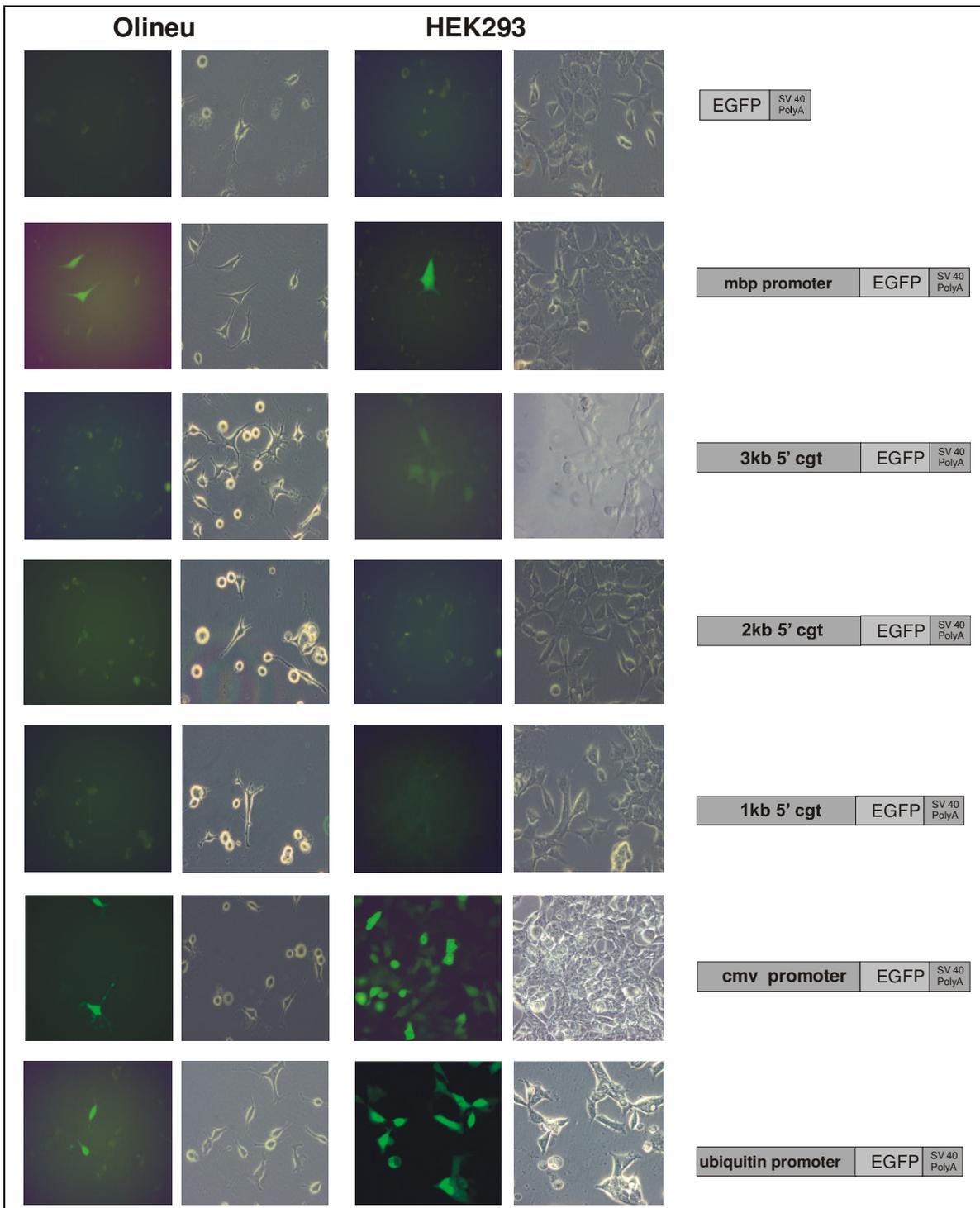


Abb.22: **EGFP-Fluoreszenzanalyse der transfizierten Olineu und HEK293 Zellen.** Die 1-3kb 5'cgt Konstrukte zeigen keine von der mock Transfektion unterscheidbare Fluoreszenz. In den Positivkontrollen mit mbp-, ubiquitin- und cmv- Promoter ist bei jeweils ca. 10% der Zellen eine Fluoreszenz detektierbar.

3.3.3 CAT-Assay Analyse

Um die durch die EGFP Fluoreszenzanalyse erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und zu präzisieren, wurde die Chloramphenicol Acyltransferase Aktivität gemessen. Die Verwendung von ^{14}C -markiertem Chloramphenicol als Substrat ermöglichte eine wesentlich genauere Quantifizierung mit dem Flüssigszintillationszähler (*LSC, liquid scintillation counter*) und durch Autoradiographie der HPTLC (*high performance thin layer chromatographie*) als die Fluoreszenzanalyse. Durch die Verwendung von n-Butyryl-CoA an Stelle von Acetyl-CoA als Acylierungsreagenz wird die Extraktion der Reaktionsprodukte mit dem unpolaren Lösungsmittel für die LSC Analyse erleichtert. Auch sind in der HPTLC Analyse die RF Werte für die Produkte und Edukte deutlich unterschieden (Abb.23).

Zur Analyse wurden sowohl HEK Zellen, als auch Olineu Zellen transient mit den oben beschriebenen pCAT-Vektoren transfiziert und nach 48h geerntet. Die Präparation der Zellextrakte und die CAT Enzym Assays wurden nach der Vorschrift von *Promega* für beide Zelltypen analog durchgeführt.

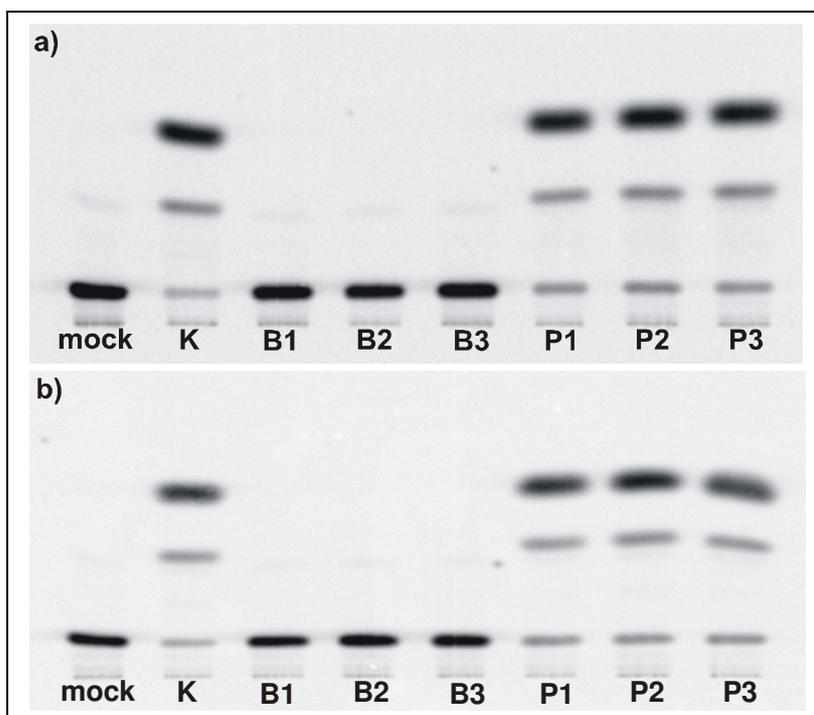


Abb.23 HPTLC Analyse des CAT Assays mit Zell-Extrakten aus transfizierten HEK293 a) und Olineu b) Zellen. mock: mock transfizierte Kontrolle mit dem Vektor pCATBasic; K, B1-3 und P1-3 siehe Abb. 20. Die obere Bande ist zweifach butyryliertes Chloramphenicol, wobei die intermediäre Bande nur einfach butyryliert ist.

Die Assays zeigen in beiden Zelltypen für HPTLC und LSC Analyse übereinstimmende Ergebnisse. Radioaktiv markierte Produkte der Chloramphenicoltransferase (CAT) sind nur in der Kontrollfraktion und den Fraktionen der pCATPromoter Konstrukte zu erkennen. Die Konstrukte pCATPromoter 1kb 5'utrl – pCATPromoter 3kb 5'utrl zeigen, wie vor allem in der LSC Analyse deutlich wird, eine mit absteigender Größe des putativen Promotorbereiches abnehmende CAT Aktivität. Die Fraktionen der pCATBasic Konstrukte liegen auf dem Niveau der mock transfizierten Kontrolle und haben somit wie diese keine CAT-Aktivität.

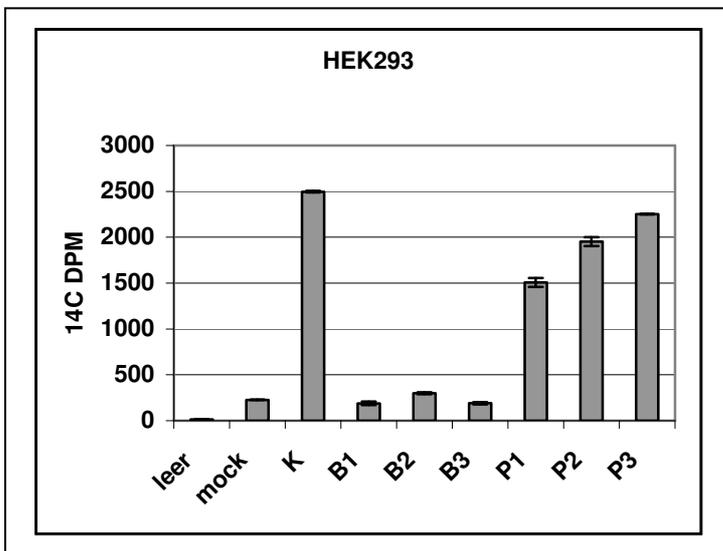
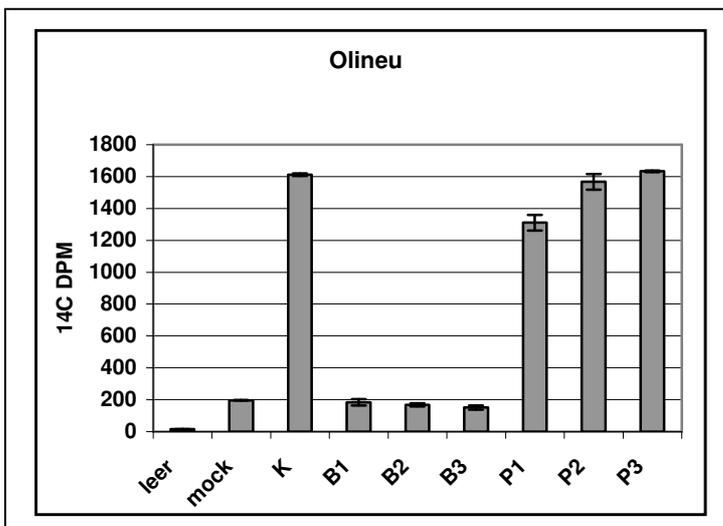


Abb.24 LSC Analyse des CAT Assays mit Zellextrakten aus transfizierten HEK293 (oben) und Olineu (unten) Zellen. mock: mock transfizierte Kontrolle mit dem Vektor pCATBasic; K, B1-3 und P1-3 siehe Abb. 20.



Die unterschiedlichen Aktivitäten der pCATPromoter Konstrukte, die in den LSC Analysen deutlich wird, deutet nicht auf das Vorhandensein regulatorischer Sequenzen hin, da sich die Werte für P3 nicht signifikant von denen des Kontrollvektors unterscheiden. Die gegenüber P3 und K verminderten Expressionen können nicht als Hinweis auf reprimierende regulatorische Sequenzen gewertet werden, da diese Sequenzen auch in P3 vorhanden sind und dort nicht die entsprechende Wirkung entfalten. In Kombination der Ergebnisse aus den Fluoreszenzuntersuchungen und den CAT-Enzym-Assays kann für den vorliegenden 5'untranslatierten Bereich eine Promoteraktivität oder das Vorliegen genregulatorischer Sequenzen nicht bestätigt werden.

3.4 Antikörpersynthese

Für immunozytochemische Untersuchungen der Mauslinien sollten für CGT spezifische polyklonaler Antikörper generiert werden. Hierbei sollte das luminal im ER liegende N-terminale Fragment (AS 20-477) und das cytosolisch liegende C-terminale Ende (AS 496-521) jeweils ohne die Transmembranhelix exprimiert werden. Beide Konstrukte wurden analog zueinander erstellt und unterschieden sich nur in der Größe der eingefügten cDNA Fragmente. Die bekannte Proteinsequenz wurde mittels Proteinstrukturvorhersage (Guex und Peitsch 1997, Schwede, et al. 2003) und Homologiescreening analysiert, um die für die Antikörpersynthese vorgesehenen Bereiche näher zu charakterisieren.

3.4.1 Klonierungsstrategie und Charakterisierung des Expressionsvektors

Als Expressionsvektor wurde pET22b+ (Novagene) benutzt. Einem mit diesem Vektor exprimierten Protein wäre N-terminal eine Ribosomenbindungsstelle und eine pelB leader-Sequenz vorgeschaltet, die zu einer Lokalisation des Zielproteins im periplasmatischen Raum führen soll. Da diese zu Problemen bei der Expression geführt haben (Zumbansen), wurde hier darauf verzichtet indem die zu exprimierenden Sequenzen in die Schnittstellen NdeI/XhoI eingefügt wurden. C-terminal enthalten diese Proteine ein Hexamer aus Histidinresten, das zur

Reinigung der Proteine über Metallchelat Affinitätschromatographie genutzt werden kann. Die zu exprimierenden Fragmente wurden per PCR amplifiziert, wobei die Oligonukleotide (siehe Anhang) so gewählt wurden, daß in das entsprechende Fragment der rCGT cDNA terminal die NdeI bzw. XhoI Schnittstellen für die weitere Klonierung eingefügt wurden und sich die Sequenzen in das bestehende Leseraster des Vektors einfügten. Die Primer für das spätere N-terminale Fragment 3'XhoICGTtoTMH und Ndecgtolok wurden so gewählt, dass die Signalsequenz des CGT Gens und auch die Transmembrandomäne nicht im Amplifikat codiert werden. Die Primer für das spätere C-terminale Fragment cgtCterm5 und cgtCterm3 wurden ebenso gewählt, dass die Transmembrandomäne nicht codiert wird.

Die PCR-Produkte wurde mittels TA-Kloning-kit (Invitrogen) in den Vektor pCR2.1 kloniert und in E.coli amplifiziert. Die Fragmente wurden nach NdeI/XhoI-Restriktion mittels NucleoSpin Extract (Macherey Nagel) isoliert und in den NdeI/XhoI linearisierten pET22b+ einligiert. Der Einbau der Fragmente in die Vektoren wurde mittels Kontrollrestriktionen (ohne Abbildung), PCR (siehe Abb.24) und Sequenzierungen (siehe Anhang) überprüft. Durch die Isolation der Fragmente nach einer NdeI/XhoI Restriktion wurde der Einbau ebenso bestätigt, wie durch die Amplifikation der eingefügten Sequenzen mittels PCR mit den jeweiligen Mutageneseprimern. Für das C-terminale Fragment ergab sich die erwartete Größe von etwa 120bp ebenso wie für das N-terminale Fragment mit etwa 1,3 kb.

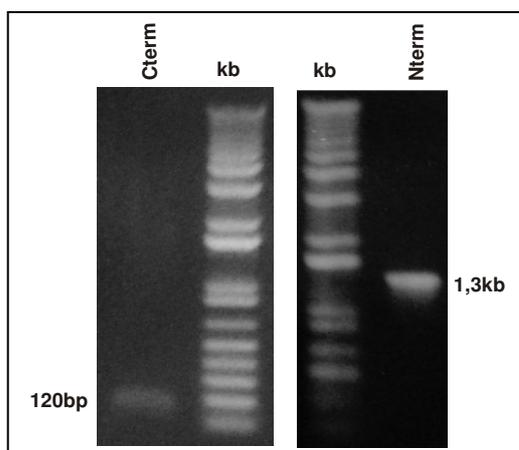


Abb.24: PCR Nachweis der eingefügten Fragmente aus rCGT in pET22b+

Verwendet wurden die jeweiligem Mutagenesprimer (siehe Anhang) 3'XhoICGTtoTMH/Ndecgtolok und cgtCterm5 /cgtCterm3

3.4.2 Proteinexpression, Aufreinigung und Charakterisierung

Die Expression erfolgte in dem E.coli Stamm BL21pLysSStar (Invitrogen), der über das Plasmid LysS das T7-Lysozym bereitstellt. Dieses stabilisiert zum einen die Zielplasmide als natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase, zum anderen ist es für die Spaltung der Peptidoglykane mitverantwortlich und erleichtert so eine Lyse der Zellen unter milden Bedingungen (siehe 6.6.1). Außerdem fehlen den BL21 Zellen als B-Strang die Ion-Protease, sowie die ompT-Protease der äußeren Zellmembran, die Proteine während der Reinigung degradieren könnten (Novogene, pET-System-Manual).

Die Proteine wurde nach Angaben des Herstellers über Metall-chelat-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zur Kontrolle der gereinigten Proteine wurden die verschiedenen Fraktionen einer Western Blot Analyse mit einem His-Tag spezifischen Antikörper unterzogen und bestätigt(ohne Abbildung).

Für das C-terminale Fragment wurde für die Immunisierung jeweils Fraktion E-3 verwendet. Die Menge an Protein des N-terminalen Fragmentes nach der Affinitätsreinigung in den Elutionsfraktionen war zu gering, um eine vollständige Immunisierung der Kaninchen zu gewährleisten und die Reinheit des Fragmentes reichte in den Waschfraktionen für eine Immunisierung nicht aus, so dass die vorgereinigten Fraktionen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend die 45kDa Banden isoliert, das Protein elektroeluiert und anschließend lyophilisiert wurden. Abbildung 25 zeigt den Reinigungserfolg nach der Affinitätschromatographie und der Elektroelution.

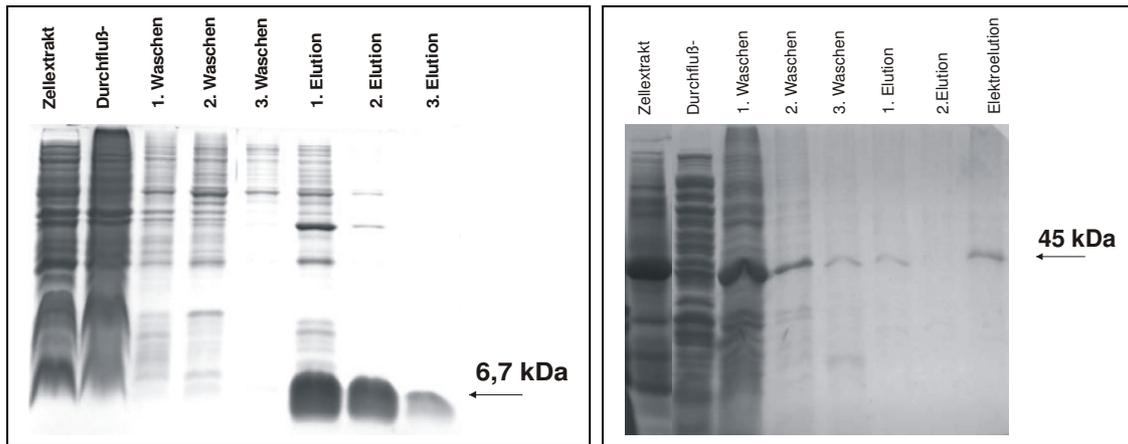


Abb.25: Polyacrylamidgele der Reinigung des 6,7kDa C-terminalen(Cterm) und des 45kDa N-terminalen(Nterm) Fragmentes nach Coomassie Blau Färbung

Von den so gereinigten rekombinanten Proteinen wurden zur Verstärkung der Immunantwort je 200µg in einer PBS/Öl Emulsion mit komplettem FREUNDschen Adjuvans in je zwei Kaninchen injiziert. Es folgten im Abstand von drei Wochen booster-Injektionen, mit je 100-150µg Protein in inkomplettem FREUNDschen Adjuvans bis ein genügend hoher Titer erreicht war. Die Kontrolle des Titers erfolgte mittels enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) und wurde als die Serumverdünnung definiert, bei der die gleiche Reaktivität auftritt, wie beim non-immune Serum. Nach der dritten *booster*-Injektion hatten die Tiere einen genügend hohen Titer (C-term: 1: 50000; N-term 1.:15000) erreicht und das Serum der Tiere wurde gewonnen.

Die spezifischen Antikörper wurden aus dem Antiserum durch Affinitätsreinigung über das jeweilige an BrCN aktivierte Sepharose gekoppelte rekombinante Protein gewonnen und in PBS; 0,1% TritonX-100 gelöst.

Die Charakterisierung der Antikörper wurde durch Western Blot Analyse der rekombinanten Proteine (siehe Abb.22a)b)) und Gesamthirnllysate von *cgt +/-* und *cgt -/-* Mäusen durchgeführt (siehe Abb.22c)d)). Ebenso wurden Immunfluoreszenzanalysen für Gewebeschnitte von *cgt +/-* Mäusen in Niere und Hirn durchgeführt (siehe Abb.23). Wie Abb. 22 zeigt sind die Antikörper für die rekombinanten Proteine als auch für natives CGT spezifisch. Die Färbung der Gehirnschnitte stimmt mit den myelinreichen Bereichen im Cerebellum überein und entspricht somit den Erwartungen. Ebenso zeigen sich Färbungen in den

Tubuli von Nephronen, die wie beschrieben(Lullmann-Rauch, et al. 2001, Tadano-Aritomi, et al. 2000), hohe Konzentrationen an sGalC aufweisen und daher auch der Synthese von GalC und somit der CGT bedürfen. Hierbei erwiesen sich beide Antiseren als sehr spezifisch.

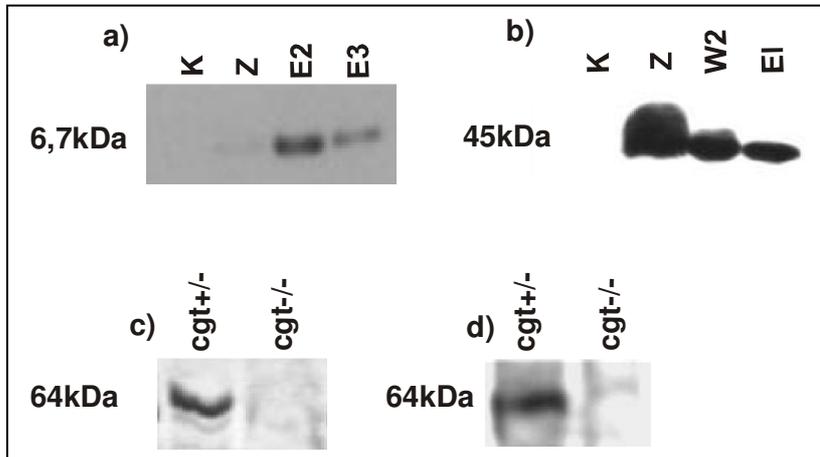


Abb.26: Western Blot Analyse der Antisera anti-Cterm und anti-Nterm a) Detektion des rekombinanten C-terminalen Fragments (6.7kDa) mit Antiserum Cterm b) Detektion des rekombinanten N-terminalen Fragments (45kDa) mit Antiserum Nterm c) Myelinproteine von cgt+/- und cgt-/-

Mäusen mit Cterm Antiserum d) Myelinproteine von cgt+/- und cgt-/- Mäusen mit Nterm Antiserum, die Antikörper markieren jeweils eine Bande bei 64kDa deren Größe mit CGT korrespondiert, die homozygoten Tiere zeigen erwartungsgemäß keine Banden; K= negativ Kontrolle mit Lysat aus nicht transfizierten Bakterien, Z= Zellysate der transfizierten Bakterien, E2/E3= Elutionsfraktion, W2= Waschschrift; EI= Protein nach der Elektroelution.

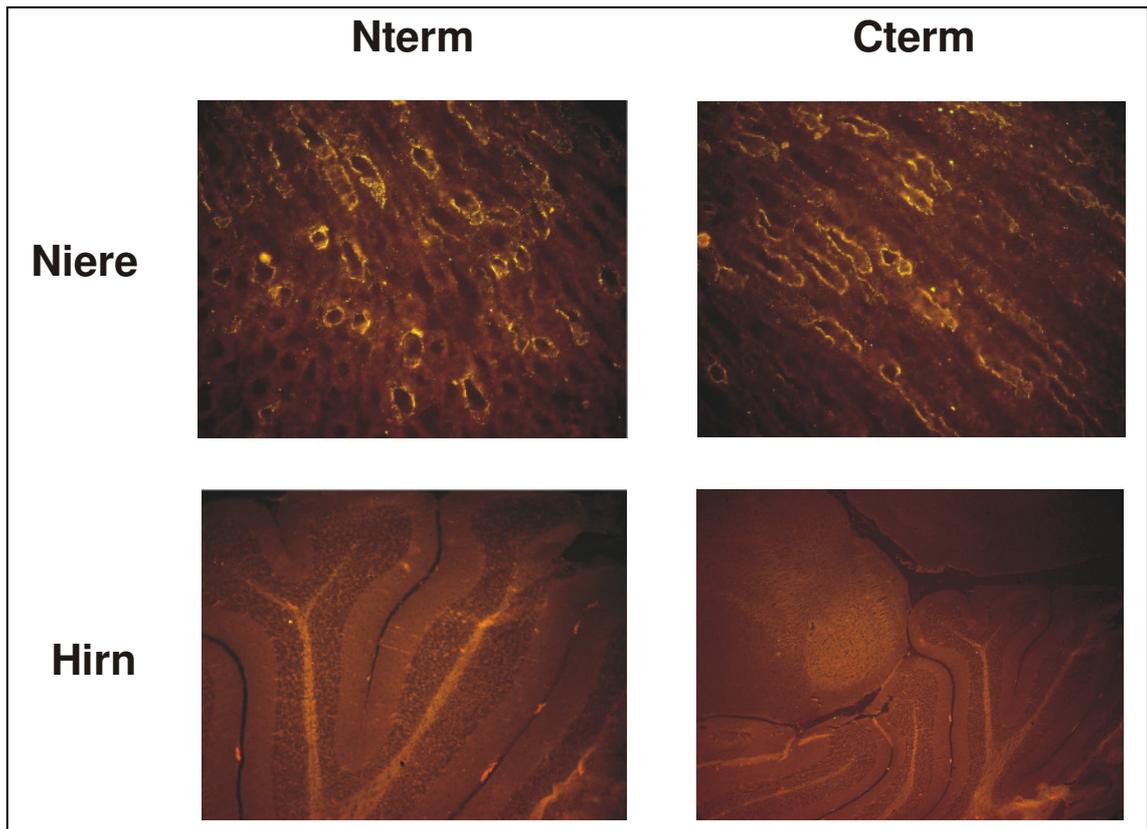


Abb.27: Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeschnitten aus wt Mäusen mit den Antisera anti-Nterm und anti-Cterm in Niere (40fache Vergrößerung) und Cerebellum (Nterm10fache Vergrößerung, Cterm 5fache Vergrößerung). Als zweiter Antikörper wurde ein anti rabbit IgG Cy3 verwendet.

3.5 Analyse der funktionellen Expression von CGT Mutanten in HEK293 Zellen

Die UDP Galaktose: Ceramid Galaktosyltransferase ist ein Glykoprotein. Sie wurde in vorhergehenden Arbeiten eingehend durch Endoglykosidasen und verschiedene Lektine hinsichtlich ihres Glykosylierungstyps untersucht (Schulte und Stoffel 1993). Es wurde bestätigt, dass die Glykosylierung der CGT, wie auch die anderer ER ständiger Glykoproteine (z.B. HMG-CoA-Reduktase(Liscum, et al. 1983)) dem mannosereichen Typ der Asparagin gebundenen Zucker entspricht. Um die Auswirkungen der Glykosylierung auf die Funktionalität der CGT zu untersuchen, wurde die cDNA aus *rattus norvegicus* an den drei putativen Glykosylierungsstellen Asn 78, Asn 333, Asn 441 mittels SOE (*splicing by overlap extension*) PCR mutiert und so in den Vektor pRC/CMV kloniert, dass drei Einzelmutanten (A, B, C) zwei Doppelmutanten (AB, BC) und eine Tripelmutante (ABC) für die Glykosylierungsstellen des gesamten *cgt* Gens entstanden(Koske 1995). Die Doppel- und Tripelmutanten stellen jeweils Kombinationen der Einzelmutanten dar. Um weitere notwendige Strukturkomponenten für die Lokalisierung und Aktivität des Enzyms im ER zu bestimmen, wurden zwei verschiedene trunkierte Mutanten (9-1, 10-1) generiert (Niemand 1995), die zum einen nur aus dem N-terminalen im ER Lumen liegenden Teil des Enzyms (9-1) und zum anderen aus dem um das KKVK ER Retentionssignal am C-terminus verkürzten Protein (10-1) bestehen (siehe Abb.28).

Die spezifischen Veränderungen der CGT in den Konstrukten sind im Einzelnen:

A	=	AA 78 Asn->Ser; Base 350 ersetzt AAC -> AGC
B	=	AA 333 Asn->Ser; Base 1115 ersetzt AAC -> AGC
C	=	AA 442 Asn->Ser; Base 1442 ersetzt AAT -> AGT
AB	=	Kombination von A and B
BC	=	Kombination von B and C
ABC	=	Kombination von A, B and C
CGT/20-1	=	AA 1-521; Basen 1-1740 rnCGT
10-1	=	AA 1-516; Basen 1-1728 rnCGT
9-1	=	AA 1-475; Basen 1-1545 rnCGT

Diese Vektoren wurden nach NruI Linearisierung und Reinigung für die Transfektion von HEK293 Zellen benutzt, die aufgrund ihrer endogenen CGT Aktivität einen geeigneten Zelltypus darstellen, um eine Überexpression der CGT

Mutanten zu gewährleisten. Als Kontrolle dienten mit dem unveränderten CGT Konstrukt (CGT, 20-1) und mock transfizierte HEK293 Zellen. Die stabil exprimierenden Zellklone wurden nach zwei Wochen G418 Selektion vereinzelt und die Einzelklone für die Analyse weiter propagiert. Um die Expressionsstärke der verschiedenen Konstrukte zu analysieren, boten sich zwei verschiedene Methoden an: zum einen der NPT (*neomycin phosphotransferase*)-Assay, der das neo-Gen aus dem Vektor pRC/CMV als Reporter gen nutzt (Duch, et al. 1990, Platt und Yang 1987) und die Northern Blot Analyse, die im Vergleich zu einem *housekeeping gene* wie z.B. GAPDH, die Quantifizierung der Expressionsstärke auf der Transkriptionsebene ermöglicht. Da bei stabiler Expression die Ausbeute der NPT abhängig vom Integrationsort der cDNA im Genom variiert, wurde die Expressionsstärke durch Northern Blot Analyse bestimmt (siehe Abb. 29). Die Klone A, B, C, AB, BC, ABC und CGT bzw. 20-1 zeigen die für die mCGT spezifische Bande bei 3,2kb, wohingegen die Klone 9-1, 10-1 und 11-3 (homolog zu 10-1 und nicht weiter in dieser Arbeit verwendet) spezifische Transkripte bei 2,1 kb (10-1) und 1,9kb (9-1) aufwiesen.

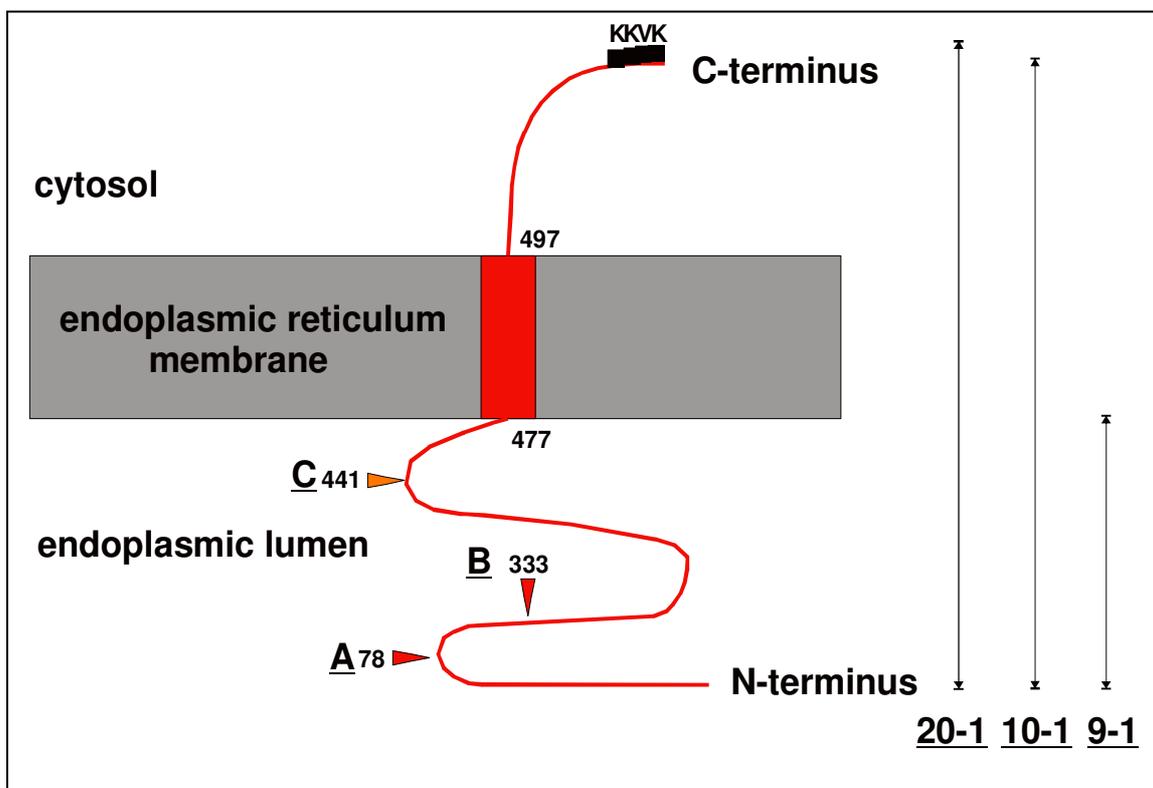


Abb.28: Überblick über die Struktur der CGT und die vorgenommenen Modifikationen der einzelnen Mutanten A, B und C bezeichnen die drei putativen N-Glykosylierungsstellen. 20-1, 10-1 und 9-1 deuten die Größe der Fragmente der trunkierten Konstrukte an.

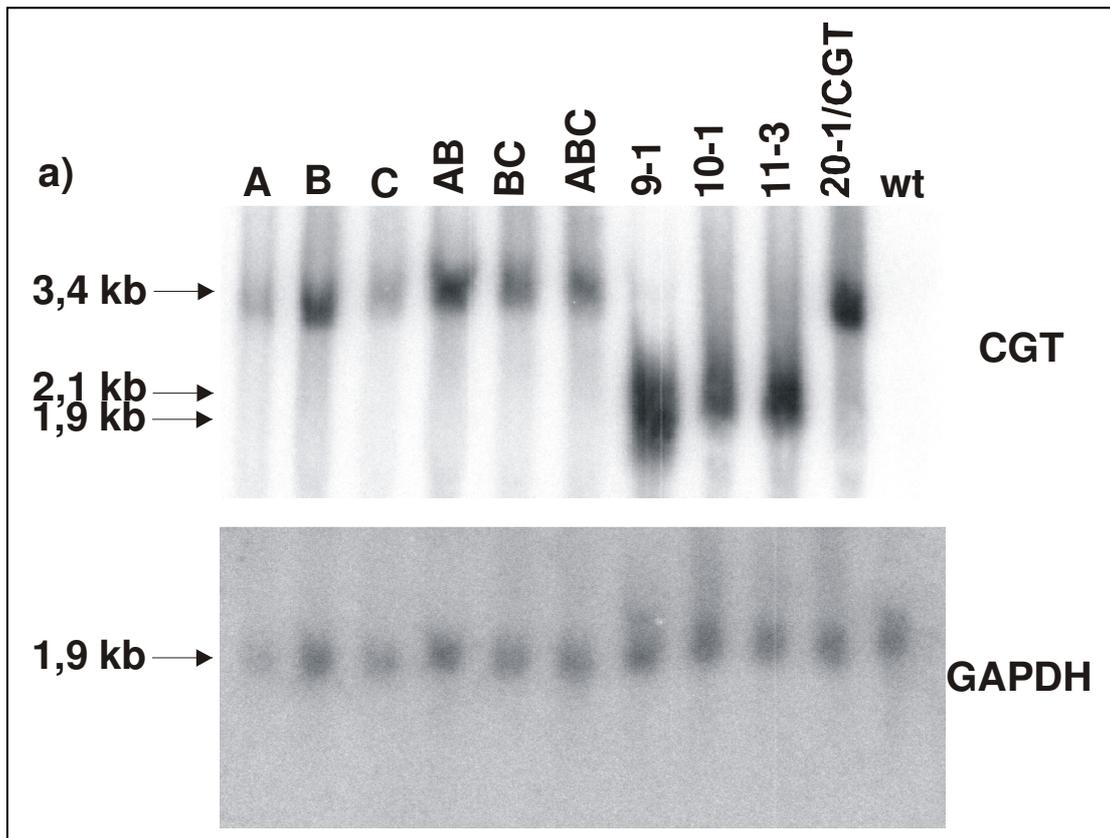
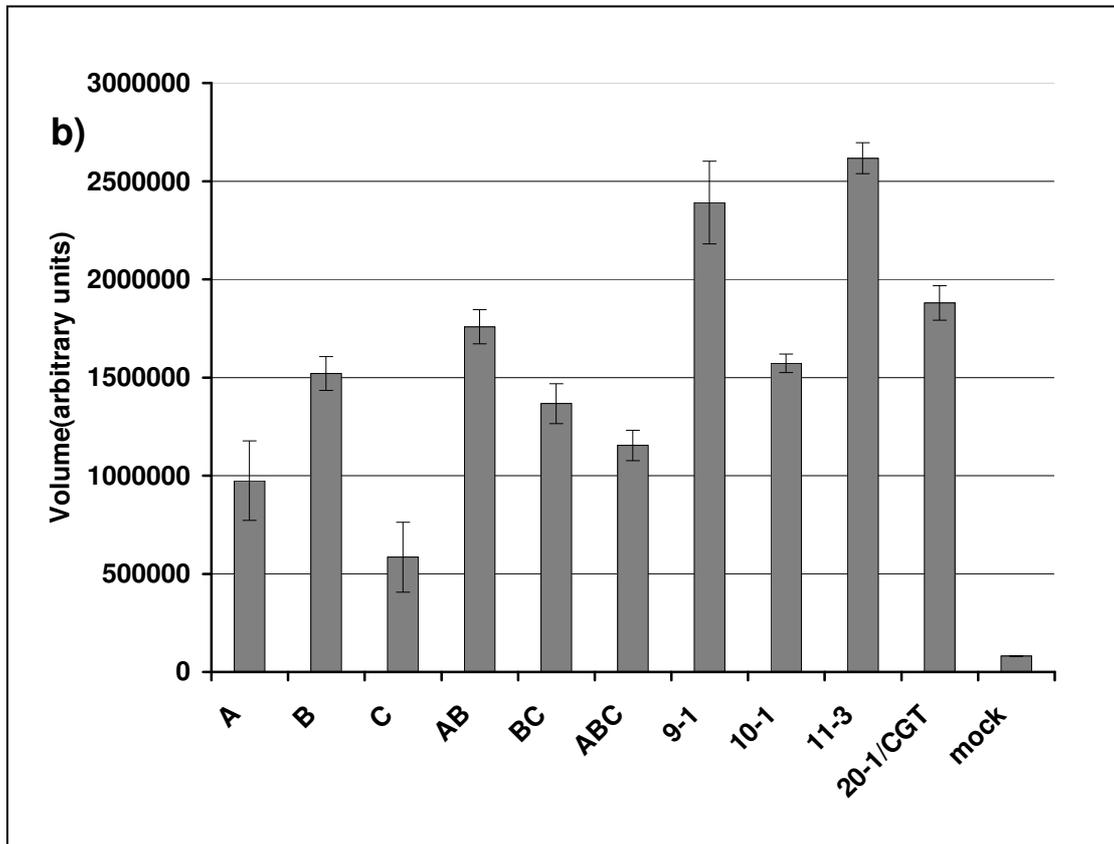


Abb.29: Northern Blot Analyse der HEK293 Klone a) Northern Blots mit CGT und GAPDH Sonde, b) unten: Quantifizierung der Überexpression bezogen auf den endogenen Standard GAPDH



3.5.1 CGT Aktivitätsbestimmung der Glykosylierungsmutanten

Anhand der CGT Aktivitätstests wurden die einzelnen Mutanten hinsichtlich des Einflusses ihrer jeweiligen Mutation(en) auf die Enzymaktivität untersucht. Die Zellen der Mutanten wurden nach einer modifizierten Methode von Neskovic et al. (Neskovic, et al. 1981, Neskovic, et al. 1986) aufgearbeitet und die Lysate nach Entfernung der unlöslichen Bestandteile verwendet. Die Analyse durch radioaktiven Enzymassay erfolgte nach Überprüfung durch HPTLC wie früher beschrieben (Schulte und Stoffel 1993). Es wurden jeweils mindestens zwei unabhängige Proben gemessen, um die statistischen Schwankungen auszugleichen. Die Messungen wurden jeweils auf die in der Northern Blot Analyse gemessenen Expressions-Werte und die Gesamtmenge des eingesetzten Proteins bezogen.

Die Messungen der Glykosylierungsmutanten zeigten, dass bis auf die Aktivitäten für die Klone B, C und CGT alle Aktivitäten im Bereich der endogenen Aktivität der HEK293 Zellen liegen (Abb.30). Die endogene Aktivität liegt bei etwa 200nMolCer/h pro mg, Klon B bei 650nMolCer/h pro mg und Klon C bei 380nMolCer/h pro mg. Wie erwartet zeigte der Klon mit der Überexpression der unveränderten CGT mit etwa 900nMolCer/h pro mg die höchste Aktivität.

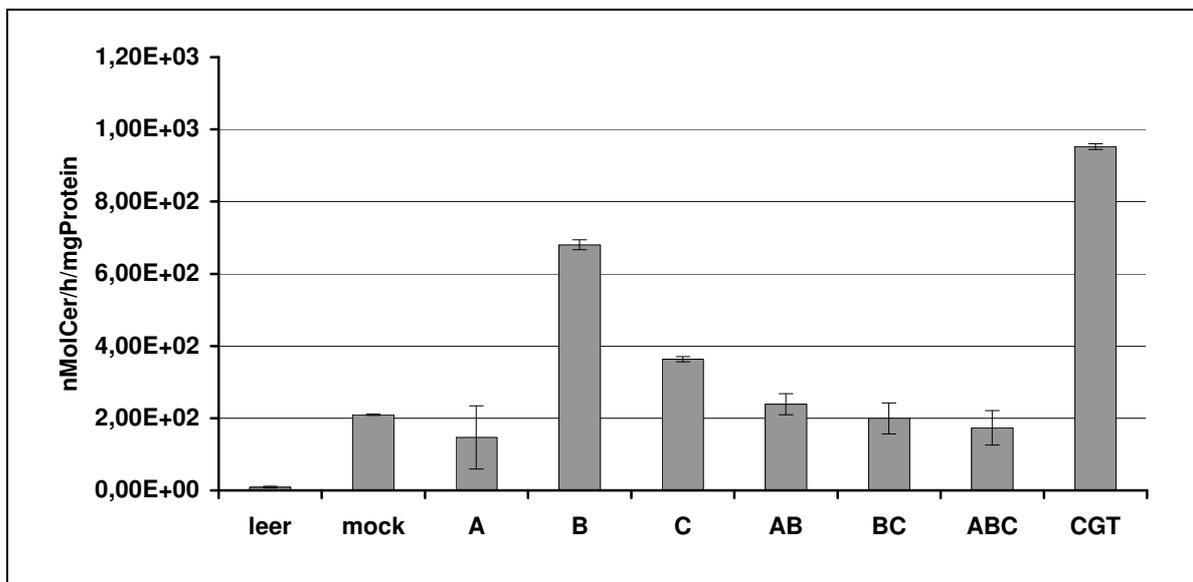


Abb.30: CGT Aktivitätstest der Glykosylierungsmutanten Die Enzymaktivitäten wurden jeweils mit D-2-Hydroxyoktanoylsphingosin als Akzeptorsubstrat für die UDP¹⁴C-Galaktose bestimmt.

Um die Überexpression und die fehlende Glykosylierung in den glykosylierungsdefizienten Klonen zu bestätigen, wurden die Proteine der Zellysate für die Western Blot Analyse eingesetzt. Die Proteinfractionen wurden jeweils mit und ohne vorhergehenden EndoglykosidaseF Verdau zur Bestätigung des Glykosylierungsgrads der Klone mit dem CGT spezifischen Antikörper Cterm hybridisiert. Durch EndoglykosidaseF (Elder und Alexander 1982) ist es möglich, sämtliche, an Asparagin gebundene, Oligosaccharide von Glykoproteinen abzuspalten. Abb. 31 zeigt für alle Klone die jeweils spezifischen Fragmente vor und nach dem EndoglykosidaseF Verdau. Die mock Kontrolle läßt nur eine sehr geringe CGT Menge, ebenso als Basisaktivität in den Mutanten A, B, und C, erkennen. Erwartungsgemäß zeigen die Mutanten AB und BC ohne EndoF Verdau eine intermediäre Größe, während Klon ABC vollständig unglykosyliert erscheint und in der Größe den deglykosylierten Proteinen bei ca. 58kDa entspricht. Der Klon CGT, der das unveränderte Enzym überexprimiert, zeigt spezifische Banden, die die der mock transfizierten Kontrolle überlagerten.

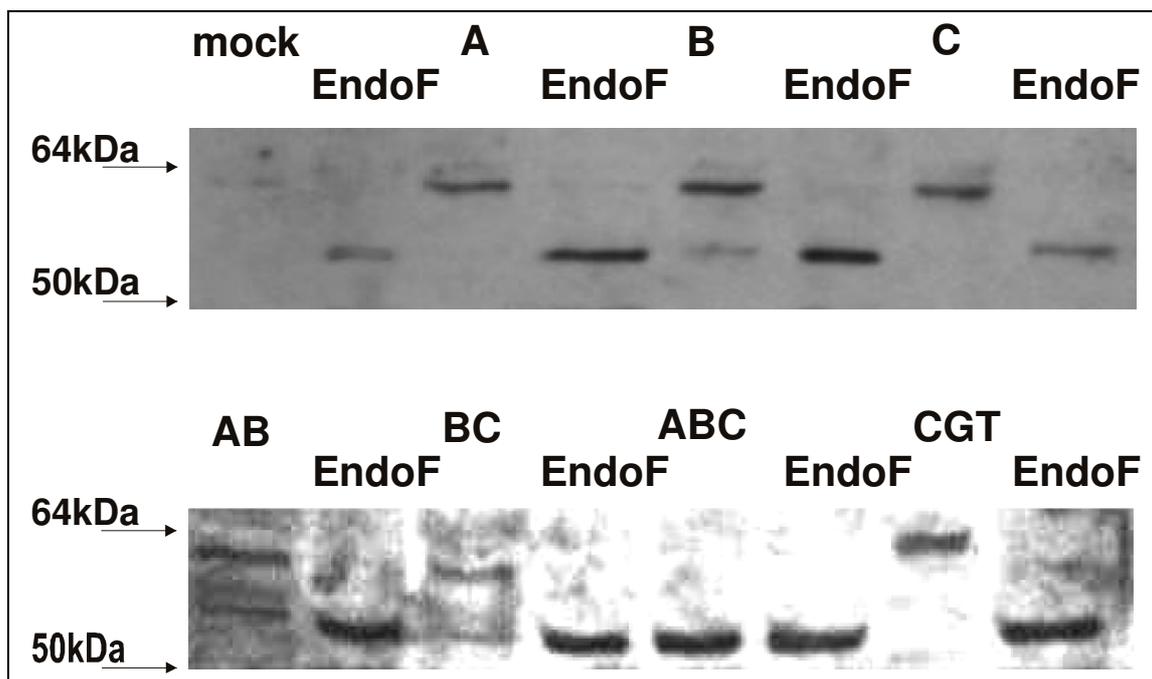


Abb.31: Western Blot Analyse von Zellextrakten der verschiedenen Glykosylierungs Mutanten mit CGT Cterm Antikörper vor und nach EndoglykosidaseF Verdau Alle Mutanten zeigen eine Überexpression von spezifisch angefarbtem Protein. Nach dem Verdau mit EndoglykosidaseF zeigt sich bei allen Proteinfractionen eine Bande bei ca. 58kDa somit sind einer Glykosylierung etwa 2kDa zuzuordnen.

3.5.2 Bestimmung der in vivo Halbwertzeiten

Die Notwendigkeit der Glykosylierung für die Aktivität von CGT wurde bereits durch die Messungen im vorhergehenden Kapitel deutlich. Um die Stabilität und Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit von der Glykosylierung zu untersuchen, wurde die Neusynthese durch Tunicamycin, einen Inhibitor der N-Glykosylierung, unterbunden. Der Verlauf der CGT Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit gibt somit Aufschluss über die Halbwertzeit des Enzyms in den Zellklonen. Abb.32 gibt einen Überblick über den Verlauf der CGT Aktivitätsmessungen nach Tunicamycingabe. Hierbei wird deutlich, dass die Aktivität der Mutanten A, C, AB, BC, und ABC nur im Bereich der endogenen Aktivität liegt und ebenso wie diese abfällt. Diese Bestimmungen korrelieren mit den vorhergehenden Aktivitätstests (Abb.29), die ebenso eine CGT Aktivität auf dem endogenen Niveau anzeigen. Die Halbwertzeit des Enzyms liegt jeweils bei etwa 9 Stunden und unterscheidet sich nicht zwischen den einzelnen Mutanten.

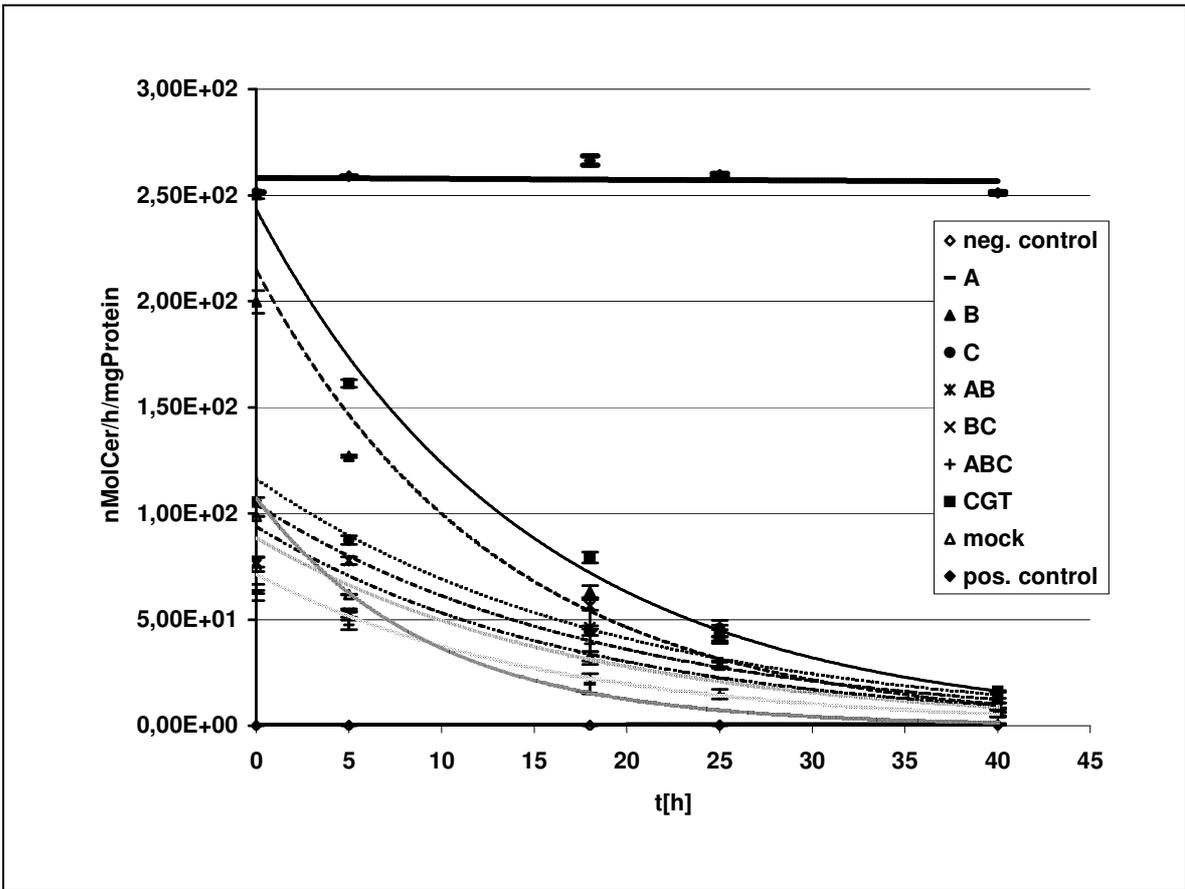


Abb.32: Zeitabhängige CGT Aktivitätsbestimmung nach Tunicamycingabe. Alle Messpunkte basieren auf zwei voneinander unabhängigen Messungen und wurden jeweils mit D-2-Hydroxyoktanoylsphingosin als Substrat bestimmt.

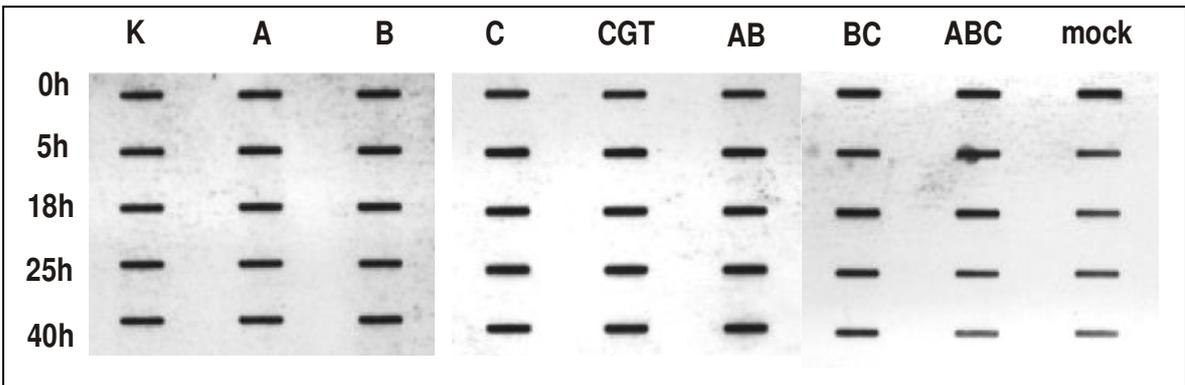


Abb.33: Slot Blot Analyse der in Abb.32 verwendeten Proteinfractionen mit dem CGT spezifischen Antikörper Cterm Zu allen untersuchten Zeitpunkten(0-40h) sind in allen Fraktionen CGT spezifische Hybridisierungen detektierbar. K=positiv Kontrolle.

Abb.33 zeigt, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten in allen Proben Protein mit dem CGT spezifischen Antikörper Cterm detektierbar ist. Die verminderte bzw. nicht vorhandene Aktivität in den einzelnen Fraktionen beruht daher nicht auf

fehlendem Protein, sondern ist direkt auf die fehlende Glykosylierung der CGT zurückzuführen.

3.5.3 Aktivität und subzelluläre Lokalisation der trunkierten Mutanten

Die Mutanten 9-1 und 10-1 wurden im Vergleich zu CGT überexprimierenden (20-1) und mock transfizierten HEK293Zellen hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität und ihrer subzellulären Lokalisation analysiert. Die Messungen der enzymatischen Aktivität wurden analog zu den Messungen der Glykosylierungsmutanten (3.5.2) durchgeführt. Hierbei zeigte die Mutante 9-1 einen Wert, der mit 225nMolCer/h pro mg nur leicht über dem Wert der mock transfizierten Kontrolle (200nMolCer/h pro mg) lag. Die Mutante 10-1 zeigte dagegen eine verglichen mit der CGT Überexpression (900nMolCer/h pro mg) leicht erhöhte Aktivität von etwa 1000nMolCer/h pro mg.

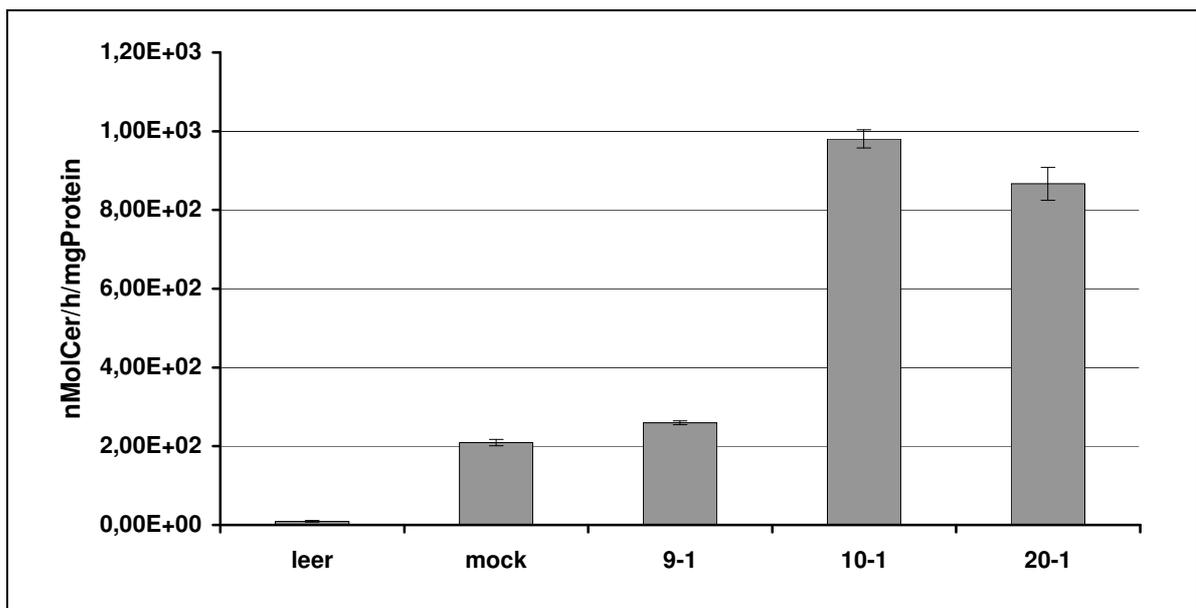


Abb.34: CGT Aktivitätstest der trunkierten Mutanten

Klon 9-1 besitzt eine der mock transfizierten Kontrolle entsprechende Aktivität. die Mutante 10-1 zeigt eine gegenüber dem Klon 20-1 erhöhte Aktivität.

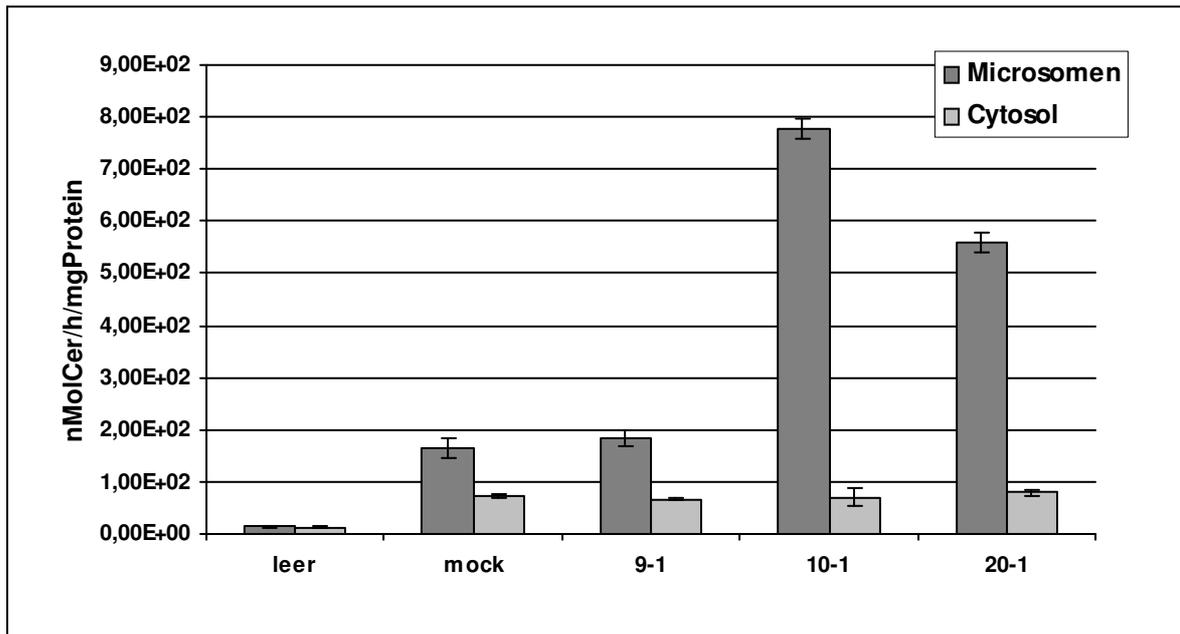


Abb.35: CGT Aktivitätstest der subzellulären Fraktionen aus den trunkierten Mutanten Die Aktivität läßt sich für alle Klone nur in den mikrosomalen Fraktionen nachweisen.

Die CGT Aktivität wurde in grob getrennten subzellulären Fraktionen bestimmt. Um zu bestimmen, ob die CGT Aktivität einem bestimmten zellulären Kompartiment zuzuordnen ist, wurden sie nach milder Lyse und subzellulärer Fraktionierung durch Zentrifugation (100000g/h) gemessen. Hierbei zeigte nur die mikrosomale Fraktion, die enzymatische Aktivität, keine Aktivität befand sich im Medium (ohne Abbildung) oder in der cytosolischen Fraktion (Abb.35). Die Aktivitätswerte lagen allerdings für mock bei 75%, 9-1 bei 81%, 10-1 bei 77,5% und CGT bei 61% der Werte vorangegangener Messungen, was auf einen Aktivitätsverlust im Verlauf der Reinigung hindeutet.

Die Lokalisation der CGT Aktivität in der mikrosomalen Fraktion führte zur Untersuchung der Mutanten durch Immunfluoreszenzanalyse. Die Lokalisierung im endoplasmatischen Retikulum wurde durch eine Doppelfärbung mit dem ER spezifischen Antikörper BIP (Immunoglobulin heavy chain binding protein) (Hendershot 2004) nachgewiesen. Das 78 kDa BIP Protein (GRP78) gehört zur Familie HSP 70 (heat shock proteins ~70 kDa) und ist Glukose reguliert. Es wirkt im ER zusammen mit anderen Proteinen, wie Grp94, Calnexin und Calreticulin als Chaperon und verhindert die Akkumulation von Faltungsintermediaten (Brodsky, et al. 1993). Wie Abb.36 zeigt, ist in allen Klonen eine Kolokalisation von CGT und

BIP zu beobachten. Auch für den Klon 9-1 zeigen sich keine Unterschiede in der Verteilung der Fluoreszenz. Erwartungsgemäß sollte dieses Peptid, dem die Transmembrandomäne und damit die Verankerung in der Membran fehlt, im Falle der Expression zu einer diffuseren Färbung in den Zellen führen. In den Fluoreszenzanalysen sind zudem zwischen den überexprimierenden Zellen und der mock transfizierten Kontrolle keine offensichtlichen Intensitätsunterschiede detektierbar.

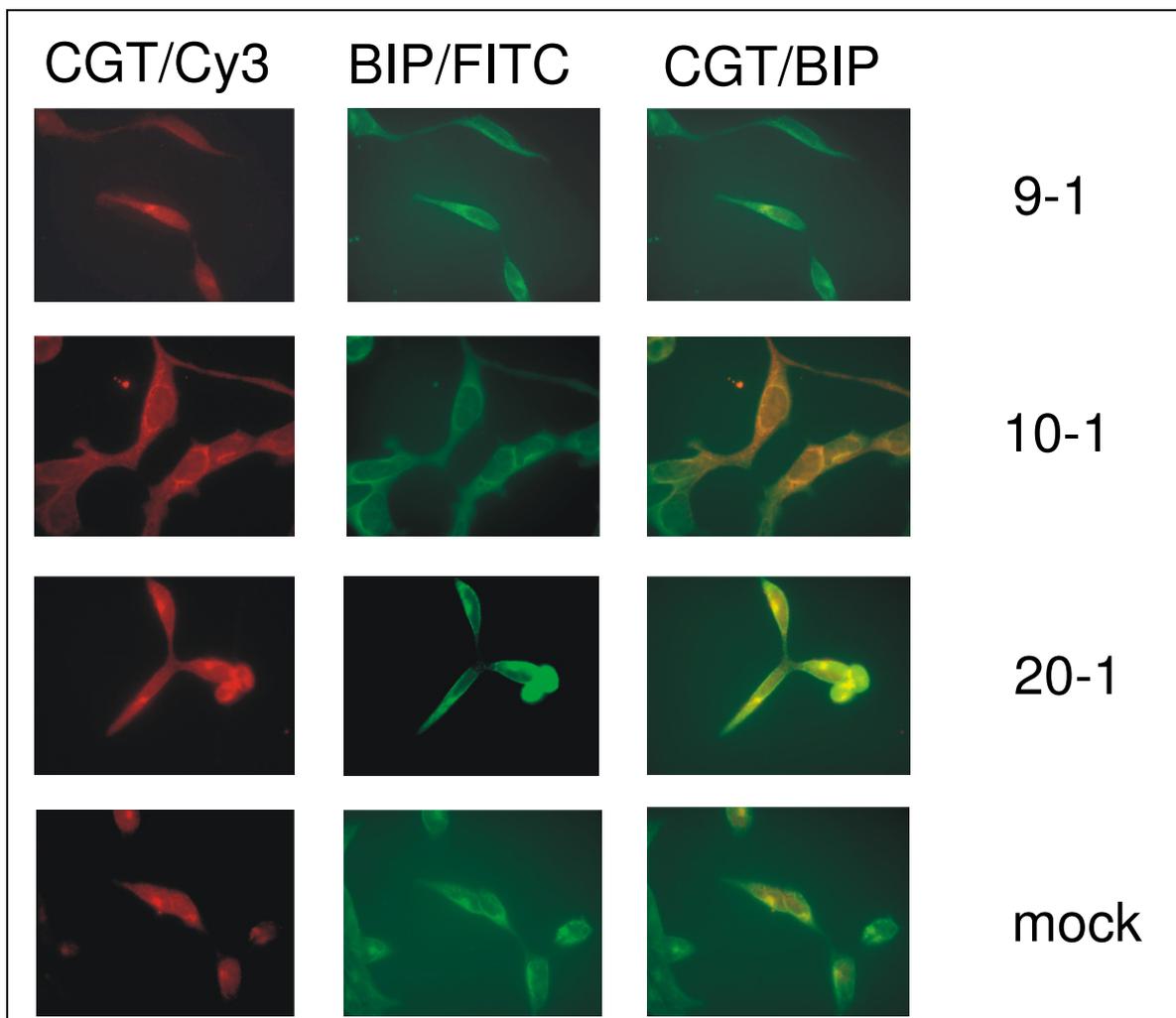


Abb.36: Immunofluoreszenz Mikroskopie zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation der trunkierten Mutanten 9-1, 10-1 und 20-1 im Vergleich zu mock transfizierten HEK Zellen. Die Färbungen wurden mit dem CGT Antiserum Nterm und einem BIP spezifischen Antikörper (BDBioscience) durchgeführt. Alle Aufnahmen wurden in 100facher Vergrößerung an einem Zeiss Axioskop unter Ölimmersion angefertigt. Die einzelnen Überlagerungen sind in den Bildüberschriften angegeben.

Die nicht vorhandene Aktivität und die fehlende Fluoreszenz in Klon 9-1 führten zu der Annahme, dass dieses Peptid nicht im Zellsystem exprimiert oder schnell degradiert wird. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde eine Western Blot Analyse mit den Zelllysaten der überexprimierenden Klone durchgeführt. Zum Nachweis der Glykosylierung der Proteine wurde je ein Teil mit EndoglykosidaseF verdaut und zusammen mit dem unbehandelten Protein analysiert. Abbildung 37 zeigt, dass mit dem CGT Antiserum Nterm im Lysat von Klon 9-1 nur das endogene CGT detektiert wird, nicht aber das rekombinante Peptid, das eine Größe von etwa 51kDa (unglykosyliert) bzw. 57kDa (glykosyliert) besitzen sollte. Die Größe der endogenen CGT Proteine sowie die der Klone 10-1 und 20-1 stimmen mit den Erwartungen überein. Die Größe der endogenen CGT Proteine sowie die der Klone 10-1 und 20-1 stimmen mit den Erwartungen überein.

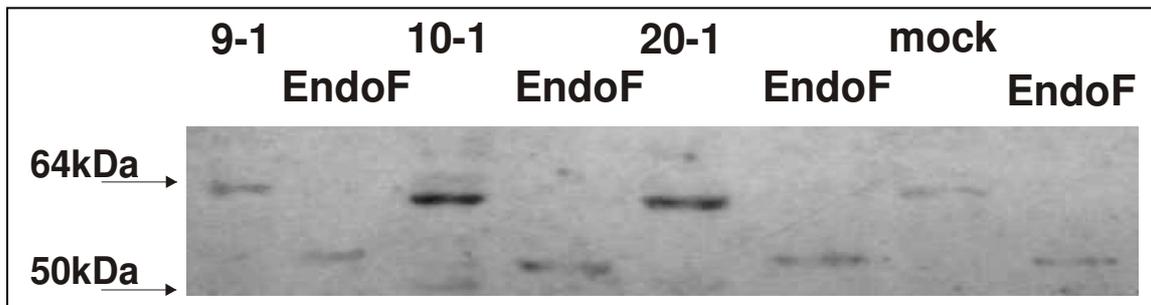


Abb.37: Western Blot der Proteine aus den Klonen 9-1, 10-1 und 20-1 im Vergleich zur mock transfizierten Kontrolle. Es wurde das Antiserum Nterm verwendet. Bei Mutante 9-1 ist kein Produkt in der erwarteten Größe von ca. 51kDa bzw. 57kDa nachzuweisen.

3.5.4 Lipidanalyse der trunkierten Mutanten

Es ist zu erwarten, dass der Einfluß der Überexpression, vor allem in den Klonen 10-1 und 20-1, in den HEK293 Zellen zu Veränderungen in der Cerebrosidzusammensetzung führt. Zudem ist ein Einfluß auf den gesamten Lipidmetabolismus der Zellen nicht auszuschließen. Dazu wurden die Zellen für 4-12h mit ubiquitär markiertem ^{14}C -Serin inkubiert, um eine Markierung insbesondere der Sphingolipide zu gewährleisten. Nach der Lipidextraktion (Bligh und Dyer 1959) wurden die einzelnen Fraktionen alkalisch hydrolysiert und durch HPTLC im Laufmittelsystem Chloroform/Methanol/ H_2O 65:24:4. analysiert. Abb. 38 zeigt den Vergleich der Gesamt- und alkalistabilen Lipide in der HPTLC Analyse.

Neben den Sphingolipiden sind auch die restlichen Lipidkomponenten markiert. Die quantitative Auswertung erfolgte durch die Phosphoimageranalyse. Bis auf erhöhte OHGalC Werte in den Klonen 20-1 und 10-1 konnten für die Lipidkomponenten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die erhöhten OHGalC Werte entsprechen den Messungen der CGT Aktivität (Abb. 34 und 35) unter Beachtung der Beobachtung, dass CGT als Substrat Ceramide bevorzugt, die mit einer α -Hydroxyfettsäure substituiert sind (siehe 1.4). Daraufhin wurden die Fettsäuresubstituenten gaschromatographisch analysiert. Dazu wurden die Lipide mit 1,25M methanolischer HCl umgeestert und α -Hydroxyfettsäuren mit Essigsäureanhydrid acetyliert.

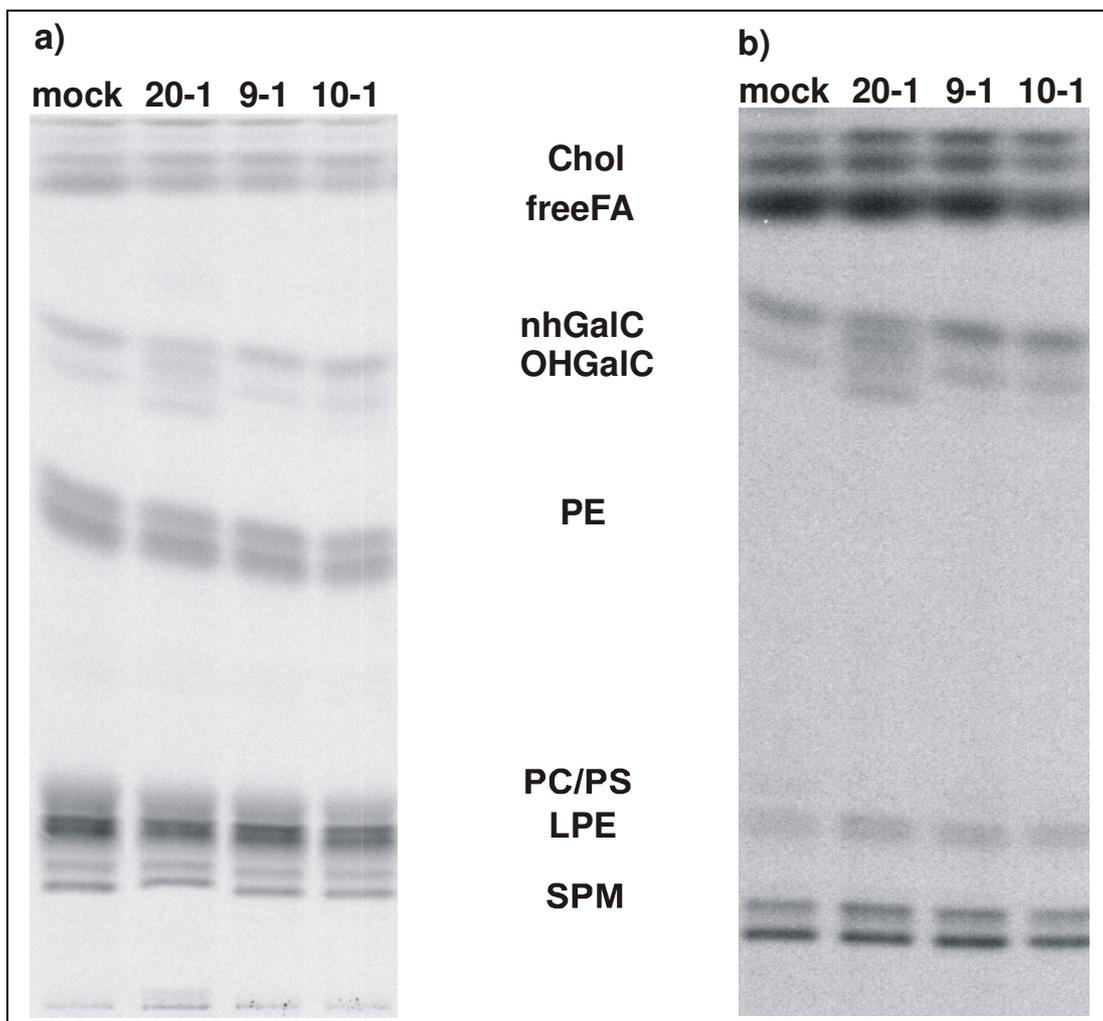


Abb.38: Analyse der a) Gesamtlipide und b) alkalistabilen Lipide im Laufmittelsystem 65:24:4. Bis auf erhöhte OHGalC Werte in den Mutanten 20-1 und 10-1 waren keine signifikanten Unterschiede messbar.

Hierbei ließ die Verteilung der Fettsäuren aus den verseifbaren Lipiden (Tab. 6) keine Rückschlüsse auf einen Einfluß der Überexpression in den jeweiligen Klonen zu. Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Verteilungsmuster der C18:1 und <C30 Fettsäuren, die jedoch nicht mit den CGT Aktivitätswerten korrelierten. Erwartungsgemäß wurden hier keine α -Hydroxyfettsäuren gefunden. Einige Fettsäuren konnten mittels der vorliegenden Standards nicht genauer charakterisiert werden und wurden so zwischen den nächsten bekannten Standards eingeordnet. Die Erwartungen erhöhter Werte für α -Hydroxyfettsäuren in den Mutanten 10-1 und 20-1 konnte in der Analyse der Fettsäuresubstituenten der alkalistabilen Lipide nur in geringem Maße für 20-1 bestätigt werden (Tab. 6).

Tab. 6: Gaschromatographische Analyse der Fettsäurekomponenten der verseifbaren und alkalistabilen Lipide. Alle Angaben in %

verseifbare lipide	mock	9-1	10-1	20-1/CGT
C12:0	5,82	<1	5,95	6,17
C14:0	2,12	4,58	5,72	7,52
C16:0	41,94	46,22	39,77	38,05
<C18:0	>1	3,68	3,1	3,08
C18:0	16,2	15,65	12,24	12,86
C18:1	5,67	19,15	15,17	13,53
C18:2(C19)	3,1	3,25	3,84	4,7
<C22	1,67	2,46	2,14	2,52
<C26	2,14	<1	1,24	1,16
<C30	11,52	2,28	1,78	4,12
<C30	6,43	<1	4,52	5,02
Gesamt	88,67	92,69	82,56	85,04

alkalistabile Lipide	mock	9-1	10-1	20-1/CGT
C16:0	21,15	29,16	29,12	22,47
<C18	2,96	5,02	4,73	3,55
C18:0	15,65	13,81	17,22	15,03
C18:1	45,37	37,36	34,54	34,47
C18:2(C19)	1,92	2,82	2,49	2,1
C18:0 OH	4,16	4,35	4,05	5
C22:0 OH	1,78	1,57	1,92	3,57
<26:0	3,4	2,76	3,11	2,44
<C30	2,43	<1	<1	5,75
Gesamt	98,82	96,85	97,18	94,45

Für Klon 10-1 konnten die Werte die Erwartungen nach der Aktivitätsmessung und der HPTLC Analyse nicht bestätigen. Die Unterschiede der Anteile Fettsäuren aus den alkalistabilen Lipiden korrelierten nicht mit den vorangegangenen Aktivitätsmessungen. Die Anteile der Fettsäuren ließen damit sowohl in den verseifbaren, als auch in den alkalistabilen Lipiden keine weiterführenden, auf die CGT Überexpression bezogenen, Interpretationen zu.

4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Verlauf dieser Arbeit wurden ausgehend von einem *replacement* Vektor sechs homolog rekombinierte ES Zellklone generiert, von denen vier der CJ7 Linie und zwei der V8.1 Linie entstammten. Durch Blastozysteninjektion wurden insgesamt 48 chimäre Männchen erzeugt. Obwohl die Analyse des Differenzierungsgrades der Klone einige Hinweise auf ihre Pluripotenz gab, konnte eine Keimbahntransmission des Transgens in Rückkreuzungsexperimenten mit C57Bl6 wt Tieren nicht bestätigt werden. Daher konnte bisher keine Mauslinie mit dem homolog rekombinierten Allel erstellt werden. Die vier Klone der CJ7 Linie wurden aufgrund der Datenlage als nicht keimbahngängig eingeschätzt und für die weiteren Experimente nicht mehr herangezogen. Über die beiden zur V8.1 Linie gehörigen Klone kann aufgrund der geringeren Anzahl an Experimenten zum jetzigen Zeitpunkt keine abschließende Einschätzung abgegeben werden.

Durch heterologe Expression eines durch das „tet on“ System induzierbaren Cre Rekombinase codierenden Vektors wurde eine Mauslinie für die entwicklungs- und gewebespezifische Cre Expression erstellt. Der verwendete reverse Transaktivator stand unter der Kontrolle des mbp Promoters, der die Gewebespezifität gewährleistet. Die Analyse dieser Linie mit der ROSA26 β geo Mauslinie zeigte allerdings, dass keine funktionelle Expression der Cre Rekombinase vorliegt. Obwohl Transkripte für den reversen Transaktivator gefunden wurden, konnte auch nach Induktion des Systems mit dem Effektor Doxzyklin keine Aktivität des Enzyms detektiert werden.

Die Untersuchung der murinen 3kb5' des Transkriptionsstarts gelegenen untranslatierten CGT Sequenz konnte keine genregulatorische Funktion in diesem Bereich bestätigen, was die alternative Benutzung dieser für die transkriptionelle Kontrolle z.B. in der Cre Expression ausschloss.

Es wurden in Kaninchen zwei unterschiedliche, gegen das CGT Protein gerichtete polyklonale Antikörper generiert. Diese wurden als spezifisch charakterisiert und im Verlauf dieser Arbeit eingesetzt.

Die rnCGT ist ein ER-ständiges Glykoprotein und wurde daher in Form von verschiedenen trunkierten und glykosylierungsdefizienten Mutanten in HEK293 Zellen überexprimiert. Von den drei putativen NGlykosylierungsstellen (Asn: 78,

Asn 333, Asn441) werden alle benutzt und tragen zur Aktivität des Enzyms bei. Einzig die Deglykosylierten Formen an Asn 333 und Asn 441 zeigten eine über der endogenen Kontrolle liegende, aber nicht der unveränderten Überexpression entsprechende Aktivität. Die Einzelmutante an Asn 78, sowie alle Doppel- und Trippelmutationen der Glykosylierungsstelle führten zu enzymatisch inaktivem Protein. Die Analysen der trunkierten Mutanten zeigte, dass für die korrekte Lokalisierung im ER das KKVK Retentionssignal nicht notwendig ist. Die Enzymaktivität in der Mutante 10-1, der nur das Retentionssignal fehlt, liegt sogar leicht über der der unverändert überexprimierten CGT. Das nicht membrangebundene, N-terminale Protein 9-1 ist in den HEK293 Zellen nicht detektierbar, wohingegen die Klone 10-1 und 20-1 in ihrer Lokalisation mit der mock transfizierten Kontrolle übereinstimmen.

5 Diskussion und Ausblick

5.1 Gene targeting

Das Neomycin Resistenzgen unter dem starken Phosphoglycerat Kinase Promotor als positiver Selektionsmarker führte in MP111, R1, CJ7 und HM1 Zellen zu einer Anreicherung um den Faktor 10 und in V8.1 Zellen um den Faktor 8. Aus insgesamt 58 Elektroporationen gingen 6 homolog rekombinierte Klone hervor. Dies entspricht einer absoluten Rekombinationsfrequenz von $1,7 \cdot 10^{-8}$ Zellen. Ein Grund für den geringen Wert der Rekombinationsfrequenz des *gene targeting* durch homologe Rekombination, und das Auftreten homologer Klone in nur zwei ES-Zell Linien kann die Verwendung von nicht isogener DNA zu ES-Zell DNA zur Erstellung des *targeting* Vektors sein. Schon geringe Unterschiede in der Basensequenz haben wie schon gezeigt wurde (te Riele, et al. 1992, van Deursen und Wieringa 1992), Auswirkungen auf das Rekombinationsereignis.

Ebenso haben die Homologie und Länge der auszutauschenden Genbereiche einen Einfluß auf die Häufigkeit der homologen Rekombination (Hasty, et al. 1991), wobei dieser Einfluß hier nicht so stark gewertet werden kann, da bereits eine korrespondierende homologe Rekombination für eine konventionelle Genablation durchgeführt wurde (Bosio 1997, Bosio, et al. 1996b). Der hier verwendete Vektor hat insgesamt 7kb homologe Sequenz (4,7 kb 5' wärts der neo box und 2,3 kb 3' wärts der neo box; siehe Abb.6) und ist damit in dieser Hinsicht ausreichend gestaltet. Durch die Untersuchung der ES-Zell-Klone durch Karyotypisierung, Immunofluoreszenzanalyse, und alkalische Phosphatase Färbung wurden die Zellen als potentiell für Blastozysteninjektion geeignet charakterisiert, und für die weitergehenden Experimente verwendet.

5.2 Transiente Cre-Expression

Die transiente Cre-Expression mit den Vektoren pBS185, pIRESCreNLS führte in den homolog rekombinierten ES Zellklonen nicht zu einer selektiven Entfernung des geflochten Neomycinresistenz-Gens. In der Mehrzahl der Fälle blieb der

rekombinierte Genort unverändert. Es konnten einige Klone nachgewiesen werden, bei denen die gesamte Sequenz zwischen den beiden äußeren loxP Sequenzen deletiert wurde (siehe Kapitel 3.2.1). Eine Veränderung der Vektorkonzentrationen für die transiente Elektroporation führte hierbei ebensowenig zum Erfolg, wie eine Veränderung der Elektroporationsbedingungen. Im Vorversuch wurde die Funktionalität der zwei terminalen loxP Sequenzen durch die Transformation des *targeting* Vektors in stabil Cre-Rekombinase exprimierenden Zellen nachgewiesen. Ebenso ist eine Mutation der drei loxP Sequenzen, die sie unbrauchbar machen würde, relativ unwahrscheinlich, da sie im Konstrukt sequenziert wurden (Meinzinger 1998), und die Ergebnisse von allen 6 verschiedenen ES-Zell-Klonen übereinstimmten. Insgesamt stimmen diese Ergebnisse nicht mit den Berichten anderer Arbeitsgruppen überein, die über eine selektive Deletion des Selektionsmarkers berichtet haben (Gu, et al. 1994). Dies geschieht danach mit etwa derselben Häufigkeit, wie die selektive Deletion der einzelnen geflochten Elemente. Somit lassen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf schließen, dass die transiente Cre-Expression nur in einem engen Konzentrationsfenster eine selektive Exzision ermöglicht. Hierbei stellt die Irreversibilität der Reaktion ein generelles Problem der Cre-Rekombinase vermittelten Exzision dar.

5.3 Injektion, Rückkreuzung und ES-Zell Analyse

Da die neo-Box nicht selektiv entfernt werden konnte, wurden die ES-Zell-Klone mit dem gesamten homolog rekombinierten Lokus für den Transfer in Blastozysten verwendet. Die Injektion der 6 Klone in C57/Bl6 Blastozysten führte in allen Fällen zu fellchimären Tieren, deren Chimaritätsgrad zwischen 10% und 100% schwankte (siehe Kapitel 3.2.3). In den Rückkreuzungsexperimenten erwies sich im Rahmen dieser Arbeit keines dieser Tiere als keimbahnchimär, obwohl die verwendeten ES Zellen jeweils durch Karyotypbestimmung, EKMA7 Immunofluoreszenzanalyse und alkalische Phosphatase Färbung als pluripotent charakterisiert wurden. Über die verwendeten CJ7 Zellen, denen vier der sechs Klone entstammten, wurde schon in früheren Arbeiten berichtet, dass sie nur ein geringes Keimbahntransmissions-Potential besitzen (Zumbansen 2001). Allerdings

wurden aus ES-Zellen dieser Linie 3 verschiedene homolog rekombinierte Mauslinien erstellt, die eine Pluripotenz dieser ES-Zell Linie anzeigen (Stoffel 2001, von Hoch 2003, Zumbansen 2001, Zumbansen und Stoffel 2002). Ebenso wurden die wt Zellen dieser Linie schon in Vorexperimenten als keimbahngängig bestätigt (von Hoch 2003) und so als geeignet für die Anwendung der ES-Zell-Technik charakterisiert. Die Klone, die der V8.1 ES-Zell-Linie entstammten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht abschliessend untersucht werden. Erste wt Injektinsexperimente führten zu einem 100%-ig chimären männlichen Nachkommen, der in den Rückkreuzungsexperimenten seine Keimbahntransmission zu beweisen hat (Meinzinger 2004). Somit war es bisher nicht möglich eine geflochte Mauslinie für die UDP Galaktose:Ceramid Galaktosyltransferase zu etablieren.

Dieses Ergebnis führte zu einer eingehenderen Untersuchung des Differenzierungsgrades der positiven ES-Zell Klone. Hierzu wurde die Analyse der ES-Zellklone hinsichtlich der Expression verschiedener Differenzierungsmarker angewendet. Sie ist nur im relativen Vergleich zu Klonen der gleichen ES Zell Linie, die ihre Keimbahntransmission bewiesen haben sinnvoll, da zwischen den einzelnen ES Zell-Linien durchaus Unterschiede bestehen können.

In der Quantifizierung der Differenzierungsmarker bezogen auf einen endogenen Standard zeigte kein Klon signifikant vom wt abweichende Werte, die auf eine begonnene Differenzierung schließen lassen. Alle anderen Klone stimmten in ihrer Oct4 Expression innerhalb der Fehlergrenzen mit dem wt und Klon VIII/25 überein (siehe 3.2.6). Alle Klone unterschieden sich von der wt Kontrolle, die ohne LIF kultiviert wurde, deutlich und deuteten damit auf das Vorhandensein einer Pluripotenz hin.

Die Expression der Differenzierungsmarker GATA1 und Flk1 lag für alle Klone unter der der differenzierten wt Zellen und des Klons VIII/25. Die Werte lagen jedoch jeweils leicht über den Werten der wt Zellen. Da aber sowohl die wt Zellen als auch Klon VIII/25 zu keimbahnchimären Tieren geführt haben, muß der Bereich der relativen Expressionsstärke zwischen diesen beiden Werten ausreichend sein, um eine Pluripotenz anzuzeigen.

Mit den hier verwendeten Methoden zur Charakterisierung der ES Zellen konnte eine fehlende Pluripotenz nicht nachgewiesen werden. Da die Klone sich im Injektionsexperiment aber alle als nicht keimbahngängig erwiesen, müssen die

untersuchten Faktoren zusammengefasst mit den Ergebnissen der in Kapitel 3.2.3 genannten Publikationen, als sicherlich notwendige Marker für die Differenzierung von ES Zellen angesehen werden. Diese können aber, wie vor allem die Ergebnisse für Klon Mz(VIII/25) zeigen, den Differenzierungsgrad nicht hinreichend charakterisieren. Dies gilt sowohl für die Untersuchungen durch RT-PCR als auch die Karyotypbestimmung, EKMA7 Immunfluoreszenzanalyse und alkalische Phosphatase Färbung. Diese Untersuchungen zeigen, dass das Verständnis der Vorgänge in der frühen Embryogenese in den letzten Jahren deutlich erweitert und fundiert wurde, die Wechselwirkungen von verschiedenen Faktoren allerdings weitaus komplexer sind, als dass sie mit einer qualitativen, oder quantitativen Analyse einiger dieser Faktoren ausreichend beschrieben werden könnten.

Die einzigen verlässlichen Experimente zur Bestimmung der Pluripotenz der ES-Zellen sind somit die Blastozysteninjektion und die nachfolgenden Rückkreuzungen.

Die Etablierung einer geflochtenen UDPGalaktose: Ceramid Gaktosyltransferase Mauslinie bleibt jedoch weiterhin von großem Interesse, da nach der Deletion des Gens zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten Einsichten über die Funktion des Enzyms in der Aufrechterhaltung der Myelinmembransysteme im ZNS und PNS erlauben, und die Stabilität und *turnover* Raten der synthetisierten Glykolipide zu betrachten helfen könnte.

5.4 Erstellung einer induzierbaren, myelinspezifischen Cre Expressierenden Mauslinie

Um ein zeit- und gewebespezifisches Ausschalten der UDP Galaktose: Ceramid Galaktosyltransferase zu gewährleisten, wurde ausgehend vom „tet on“ System, ein Konstrukt erstellt, das sowohl den reversen Transaktivator, als auch die Cre Rekombinase unter der Kontrolle der jeweiligen Promotoren codiert. Durch diesen Ansatz sollten die Kreuzungsschritte verschiedener Mauslinien, bei denen, inklusive der geflochtenen Mauslinie 6 Allele kombiniert werden müssten, minimiert werden. Der Vektor wurde eingehend per Southern Blot, Restriktionsendonukleasen, PCR und Sequenzierungen überprüft und zeigte die

erwartete Konstitution. *In vitro* Untersuchungen in Olineu Zellen zeigten keine Fluoreszenzaktivität, was allerdings durch die geringe nachgewiesene endogene Aktivität von mbp bedingt sein kann. Auszuschließen ist hierbei prinzipiell auch nicht, dass die IRES Sequenz ihre Funktion nicht erfüllt und die gekoppelte Transkription nicht gewährleistet. Die Vorkerninjektionen führten bei 9,4% der Nachkommen zu einer stabilen Intergration des Transgens, was in etwa den erwarteten Werten entspricht (Hogan, et al. 1986). Durch Kreuzung mit der ROSA26betageo Reportermauslinie sollte die Funktionalität des Systems *in vivo* nachgewiesen werden. Hierbei zeigten die β -Galaktosidase Färbung von Schnitten 25 Tage alter Mäuse weder mit, noch ohne Aktivierung durch Doxyzyklin eine vom wt unterscheidbare Färbung. Ebenso konnte keine EGFP Fluoreszenz in Gefrierschnitten myelinisierender, transgener Mäuse gezeigt werden. Durch die Southern Blot und RT-PCR Analyse von Hirn DNA bzw. RNA konnte schließlich nachgewiesen werden, dass weder eine spezifische Reduktion der Bandengröße nach XbaI Restriktion, noch spezifische Transkripte für die eingefügten Transgene Cre und EGFP existieren. Einzig die Expression des reversen Transaktivators ist in der RT PCR nachgewiesen. Da aber keine Aktivierungen der Transkription der Cre Rekombinase und des EGFP Reportergens zu erkennen sind, ist der Transaktivator aller Wahrscheinlichkeit nach das Element des benutzten Systems, das ein vollständiges Funktionieren verhindert.

Eine verminderte Aktivität der hier verwendeten Elemente des mbp Promoters und somit zu schwache Expression des reversen Transaktivators, erscheint als Grund für die fehlende Expression sehr unwahrscheinlich, da für Gewebe- und Entwicklungsspezifität bereits eine spezifische Transkriptionskontrolle angezeigt wurde (Miura, et al. 1989). Ebenso, wie die des mbp Promoters stimmten zudem alle weiteren verwendeten Sequenzen mit den Datenbankangaben überein und scheiden so ebenfalls als Grund für die Fehlfunktion aus.

Der ROSA26 Locus erweist sich für die Analyse der Cre Rekombination zwar als besonders geeignet, da er eine ubiquitäre Expression in der Maus gewährleistet (Wunderlich 2004). Ein Problem kann allerdings die geringe Expression des Reportertransgens im ROSA26 Locus für manche Reporterkonstrukte bedeuten, wie dies schon bei der Insertion einer EGFP Reporter Kasette durch Mao et al. (Mao, et al. 2001) beschrieben wurde. Daher wäre eine verminderte Expression des lacZ Reporters eine mögliche Erklärung für das Fehlen der Färbungen in den

Hirnschnitten. Allerdings zeigen die Analysen mittels EGFP Fluoreszenz in Hirnschnitten, Southern Blot Analyse von Hirn DNA und RT PCR von hirnspezifischen Transkripten, dass keine Cre Aktivität vorliegt, und somit auch der indirekte Nachweis über die β -Galaktosidase nicht funktionieren kann.

Eine zu schwachen Expression des reversen Transaktivators im neuronalen Gewebe scheidet als mögliche Erklärung aus, da diese mit Angaben aus der Literatur nicht belegt werden kann. Eine fehlende Aktivierung des reversen Transaktivators durch Doxzyklin scheidet ebenso aus, da dieser Ansatz auch für hirnspezifische Induktionen schon mehrfach gezeigt wurde (Koponen, et al. 2003, Mizuguchi, et al. 2003, Yamamoto, et al. 2003). Eine Beeinträchtigung des Wirtsorganismus durch die Doxzyklingabe zur Aktivierung der Cre- Rekombinase ist relativ unwahrscheinlich, da bisher keine Nebenwirkung in der verabreichten Konzentration von 1 μ g/ml dokumentiert wurde. Ebenso ist eine schnelle Expression von einer Stunde (Adult) bzw. 13 Stunden (Embryo) nach Doxzyklingabe beschrieben worden (Branda und Dymecki 2004). Der Zeitrahmen der Applikation von doxzyklinhaltigem Trinkwasser übersteigt diesen Rahmen deutlich und kann daher nicht für eine fehlende Expression verantwortlich sein. Trotz der bereits publizierten Funktionalität des Systems für hirnspezifische Anwendungen kann dies in diesem Fall nicht bestätigt werden. In *in vivo* Versuchen mit Rattenhirnen ist bereits eine sehr gute, die Expression des rtTA übertreffende, Regulierbarkeit der neuen Version des reversen Transaktivators rtTA2 (S)-M2 (Koponen, et al. 2003) nachgewiesen worden. Eventuell kann durch diese neue Version in zukünftigen Experimenten eine weitere Perspektive ermöglicht werden, das „tet on“ System für die konditionierte Genausschaltung zu benutzen. Einen interessanten Alternativansatz verfolgten Doerflinger et al. (Doerflinger, et al. 2003), die ein induzierbares Cre-Östrogen-Rezeptor Fusionsprotein unter der Kontrolle der regulatorischen Sequenzen des Proteolipidproteins verwendeten und so die Regulation der Cre-Rekombinase auf Proteinebene ermöglichten. Andererseits stellen die schon in der Einleitung erwähnten Ecdyson kontrollierbaren Systeme eine gute und spezifische Alternative mit geringerer basaler Aktivität für das „tet on“ System dar, da hierbei so gut wie keine Nebenwirkungen durch das Effektormolekül Ecdyson im Wirtsorganismus ausgelöst werden (No, et al. 1996).

5.5 Analyse des putativen Promoterbereiches der murinen CGT

Um für die Expression der Cre-Rekombinase eventuell den endogenen Promotor des murinen *cgt* Gens nutzen zu können, wurde der im Klon pMCGT7 vorliegende, 3kb umfassende, 5' des Startcodons liegende untranslatierte Bereich, in dem durch Primerextension der Transkriptionsstart lokalisiert wurde, auf das Vorliegen einer Promotoraktivität hin untersucht (siehe 3.4).

Die computergestützte Sequenzanalyse deutete hinsichtlich der gefundenen Bindungsstellen für Gtx und Ap1 auf einen potentiell interessanten Genbereich hin. Die weitergehende Analyse ließ allerdings keine genregulatorische Funktion erwarten, konnte diese aber auch nicht völlig ausschließen (siehe 3.4.1).

Aus diesem Grund wurden zur Analyse je 3 unterschiedliche große Genbereiche der Sequenz für die Analyse in den Reportersystemen pEGFP und pCAT verwendet. Die verkürzten Konstrukte sollten dabei die Eingrenzung eventuell vorhandener Funktionen ermöglichen.

Das EGFP Reportersystem ermöglichte nach transienter Transfektion die qualitative Analyse in Olineu und HEK293 Zellen. Hierbei konnte für keines der Konstrukte 1-3kbcgt5'utrl eine Fluoreszenz über dem Niveau der mock transfizierten Kontrolle nachgewiesen werden. Die Kontrollvektoren führten dagegen alle zu den erwarteten Fluoreszenzen. Da die HEK293 Zellen in G418-haltigem Selektionsmedium kultiviert wurden, müssen alle Zellen das Transgen mit dem Neomycinresistenzgen integriert haben. Diese Aussage kann für die Olineu Zellen nicht bestätigt werden, da diese Zellen mit Neomycin vorselektioniert wurden und somit alle G418 resistent sind. Der geringe Anteil fluoreszierender Zellen, von etwa 10% deutet erneut auf den Nachteil des EGFP Systems hin, dass es eine relativ hohe Kopienzahl pro Zelle benötigt, um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu überbieten. (siehe Kapitel 3.2.)

Um die Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse zu validieren wurde zusätzlich das pCAT Reportersystem verwendet. Dieses ermöglicht die genaue Quantifizierung der Reaktionsprodukte der Chloramphenicol Acyltransferase und somit Rückschlüsse auf die genregulatorische Aktivität der untersuchten Sequenzen. In dieser Analyse konnte übereinstimmend mit den Fluoreszenzuntersuchungen keine Promoteraktivität für den 3kb 5' untranslatierten Genbereich festgestellt werden. Zudem wurde durch die pCAT Promoterkonstrukte eine weitere

genregulatorische Funktion ausgeschlossen. Der Unterschied in den Messungen zwischen den 1-3kbcgt5'utrl. Konstrukten ist als artifiziell zu betrachten. Die verminderte CAT Aktivität könnte prinzipiell auf eine *silencer* Aktivität hindeuten, sollte dann aber wenn sie im Konstrukt 1kbcgt5'utrl auftritt auch in den beiden anderen Konstrukten zu finden sein, da diese die Sequenz ebenfalls beinhalten. In Kombination dieser Ergebnisse muss für den 3kb5' untranslatierten Bereich des murinen CGT Gens eine genregulatorische Funktion ausgeschlossen werden.

5.6 Analyse der funktionelle Expression von CGT Mutanten in HEK293 Zellen

Die funktionelle Expression in HEK293 Zellen diente der Untersuchung der putativen Glykosylierungsstellen an Asn 78, Asn 333 und Asn 441 und ihrer Bedeutung für die CGT Aktivität. Zudem sollte durch die Verwendung von trunkierten Konstrukten die Funktionalität und subzelluläre Lokalisation der überexprimierten CGT beschrieben werden.

Die CGT Aktivitätstests der Glykosylierungsmutanten zeigten, dass keine der Mutanten die Aktivität der unverändert überexprimierten CGT erreicht. Somit haben alle Glykosylierungsstellen eine, die CGT Aktivität mitbestimmenden Funktion. Dieser Einfluß scheint nach den Messungen bei den Glykosylierungsstellen B (Asn333) und C (Asn441) am geringsten zu sein, da für diese beiden Klone eine über der mock transfizierten Kontrolle liegende Aktivität detektiert wurde. Glykosylierungsstelle A (Asn78) scheint dabei den stärksten Einfluss auf die resultierende CGT Aktivität zu haben und liegt nur auf dem Niveau der mock transfizierten Kontrolle. Mit steigender Anzahl der mutierten Glykosylierungsstellen (Mutanten AB, BC, ABC) ist die Aktivität des Enzyms nur noch auf dem Niveau der endogenen CGT zu detektieren. Dies bestätigt in Übereinstimmung mit den *in vitro* Translationsversuchen von Koske (Koske 1995), dass alle Glykosylierungsstellen der CGT genutzt werden und für deren Aktivität nötig sind. Durch die Western Blot Analyse der für den Assay verwendeten Proteinfractionen, und den Vergleich der mit den Endoglykosidase F verdauten Fractionen konnte die Glykosylierung an allen drei Asparagin-Resten bestätigt werden. Die Fractionen A, B und C zeigten jeweils das um eine Oligosaccharidseitenkette verkleinerte Protein, während AB und BC eine

intermediäre Größe zwischen diesen und der vollständig deklykosylierten Form (ABC) einnahmen. Da die unglykosylierte Form in etwa bei 58 kDa und die native Form bei 64kDa liegt, kann jeder Glykosylierungsstelle ein Molekulargewicht von ca. 2kDa zugesprochen werden. Die Bestimmung der Halbwertzeiten der Mutanten bestätigte die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen und belegte, dass die Abnahme der Enzymaktivität kausal mit der Deglykosylierung der Proteine zusammenhängt, da in allen untersuchten Fraktionen Protein durch die Slot Blot Analyse mit dem spezifischen CGT Antiserum C-term nachweisbar war.

Die Analyse der trunkierten Mutanten zeigte in der Aktivitätsbestimmung, dass die Fraktion 9-1 keine erhöhte CGT Aktivität besitzt, wie dies für die Fraktionen 10-1 und 20-1 nachgewiesen wurde. Da Klon 9-1 nur für den N-terminalen Teil der CGT ohne Transmembrandomäne und C-Terminus codiert, sind hierfür im Falle der Expression ein 51 kDa Protein oder im Falle der Glykosylierung ein 57kDa Protein zu erwarten. Die Aktivität von Klon 9-1 war mit dem Level der endogenen HEK-Zell CGT Aktivität vergleichbar und führte zu dem Schluss, dass das trunkierte Protein keine Aktivität besitzt, oder aber durch raschen Abbau frühzeitig degradiert wird. Durch die Western Blot Analyse konnte kein spezifisches Produkt von 9-1 nachgewiesen werden, wodurch die Annahme gestützt wurde, dass das trunkierte Protein sehr schnell abgebaut wird. Die Proteine der Klone 10-1 und 20-1 zeigten im Western Blot sowohl in der glykosylierten Form als auch nach dem Endoglykosidase F Verdau die erwarteten Banden bei 64 und 58 kDa und stimmten damit mit der mock transfizierten Kontrolle überein. Die in den Fraktionen von Klon 9-1 auftretenden Banden sind jeweils auf die endogene CGT Aktivität der HEk293 Zellen zurückzuführen. Erstaunlich ist die hohe Aktivität der Mutante 10-1, die sogar die Aktivität der überexprimierten, unveränderten CGT (20-1) übertrifft. Da das Enzym nur um das KKVK ER Retentionssignal verkürzt wurde, ist eine nahezu unveränderte CGT Aktivität strukturell nicht ausgeschlossen, allerdings ist diese abhängig von der korrekten Lokalisierung im endoplasmatischen Retikulum. Die Aktivitätsbestimmung nach der subzellulären Fraktionierung zeigte die CGT Aktivität in allen Klonen in den mikrosomalen Fraktionen an. Das Fehlen von Aktivität in der cytoplasmatischen Fraktion und dem Kulturmedium schloss zudem die Sezernierung von funktionellem Protein aus. Um die subzelluläre Lokalisierung der trunkierten Enzyme weiter zu bestätigen, wurden die überexprimierenden Zellen in der

Immunfluoreszenzanalyse mit dem CGT spezifischen Antiserum Nterm und dem ER spezifischen BIP Antikörper analysiert. Die Färbungen bestätigen die Lokalisierung von CGT in allen Klonen im endoplasmatischen Retikulum. Wie die Überlagerungen der Fluoreszenzen zeigen, sind keine signifikanten Intensitätsunterschiede detektierbar, die z.B. mit einer höheren CGT Aktivität in den Klonen 10-1 und 20-1 korrelieren würden. Da die Lage des Proteins in der Mutante 10-1 mit der Kontrolle und der Überexpression des unveränderten Proteins übereinstimmte, ist anzunehmen, dass das Vorhandesein des KKVK ER Retentionssignals für die korrekte subzelluläre Position nicht zwingend notwendig ist. Die Lipidanalyse der trunkierten Mutanten zeigte erwartungsgemäß einen Anstieg der mit hydroxylierten Fettsäuren substituierten Galaktocerebroside für die Klone 10-1 und 20-1, der durch die Analyse der Fettsäuresubstituenten nur für 20-1 bestätigt werden konnte. Die restlichen Fettsäuren ermöglichten aufgrund der uneinheitlichen Verteilungsmuster keine weiterführende Interpretation.

6 Material und Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

Hier nicht aufgeführte Standardmethoden und -puffer wurden nach Sambrook et al. (Sambrook, et al. 1989) durchgeführt bzw. präpariert.

6.1.1 DNA Präparationen

Plasmid-Minipräparationen wurden nach der Methode von Birnboim (Birnboim und Doly 1979), oder Plasmidgroßpräparationen wurden mit dem Quiagen tip 500Kit (Quiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

6.1.2 Gewinnung von genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien

Zur DNA Gewinnung für die genotypische Bestimmung wurde ab Tag p6 etwa 0,5cm als Schwanzbiopsie entnommen und ÜN (mindestens 6h) bei 55°C in 700µl Lysispuffer (50mM Tris/HCl (pH8), 100mM EDTA (pH8), 100mM NaCl, 1%SDS) und 30µl Proteinase K (10mg/ml) verdaut. Nach vollständiger Auflösung des Gewebes wurde 5min mit 11000g bei RT zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Eppendorfgefäß mit 420µl Isopropanol versetzt. Nach 10min über Kopf schütteln bei RT wurde 15min mit 14000g bei 4°C zentrifugiert und das resultierende DNA-Sediment mit 400µl 70% Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen wurde die DNA in 200µl TE oder 10mM Tris/HCl (pH8) aufgenommen und mindestens 3h bei 55°C gelöst. 50µl der gelösten DNA wurden für die folgenden Restriktionen eingesetzt.

6.1.3 Gewinnung von genomischer DNA aus ES-Zellen

ES-Zellen wurden auf mit Gelatine beschichteten 24-Lochplatten bis zur Konfluenz kultiviert, das Medium abgezogen und der Zellrasen mit 500µl PBS gewaschen. Die Inkubation erfolgte in 500µl Lysispuffer (100mM Tris/HCl [pH8,5], 5mM EDTA [pH8], 200mM NaCl, 0,2%SDS) und 5µl Proteinase K (10mg/ml) ÜN bei 37°C. Nach 15min Schütteln wurde das Lysat in Eppendorfgefäße überführt und mit 450µl Isopropanol versetzt. Auch hier wurde nach 10min über Kopf-Schütteln bei RT 15min mit 20000g bei 4°C zentrifugiert und das resultierende DNA-Sediment mit 500µl 70% Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen der DNA wurde sie in 200µl TE oder 10mM Tris/HCl (pH8) aufgenommen und mindestens 3h bei 55°C gelöst. 50µl der gelösten DNA wurden für die folgenden Restriktionen eingesetzt. Auch für die DNA-Präparation aus 90mm Schalen wurde das oben beschriebene Protokoll benutzt. Die ES-Zellen wurden jedoch vor der Lyse trypsinisiert, mit PBS gewaschen und präzipitiert.

6.1.4 Restriktionsanalysen

6.1.4.1 Genomische DNA

50µl genomische DNA aus ES-Zellpräparationen oder Schwanzspitzen-Biopsien wurden in einem Volumen von 200µl ÜN mit 20-40U Enzym bei 37°C inkubiert. Für die Analyse von drei vereinigten Klonen je Ansatz wurden je 25µl DNA pro Zellklon eingesetzt und ebenso in 200µl Volumen ÜN bei 37°C mit 40U Enzym (s.o.) verdaut.

6.1.4.2 Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit 1U der entsprechenden Restriktionsendonuklease 1-2h bei 37°C inkubiert, wobei eine DNA-Konzentration von 1µg/10µl Ansatz nicht überschritten wurde.

6.1.5 Linearisierung der replacement-Vektoren

Für die Linearisierung wurde über Quiagen tip 500Kit gereinigtes Plasmid verwendet. In einem Volumen von 200 - 400µl wurden ca. 30µg des Plasmides mit 40U der entsprechenden Restriktionsendonuklease (PvuI; Sall) für 2-3h bei 37°C inkubiert und nachfolgend mit Phenol, Phenol/Chloroform (1:1 v/v) und Chloroform ausgeschüttelt um Proteinreste aus dem Ansatz zu entfernen. Nach einer Ethanol-Fällung wurde die DNA durch Zentrifugation bei 4°C mit 20000g für 15min präzipitiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Die Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Reinheit erfolgte durch Auftragen eines Aliquots (1µl) der nach kurzem Trocknen in 10mM Tris aufgenommenen DNA auf ein 0,8-1%iges Agarose-Gel.

6.1.6 Elektrophorese und Hybridisierungsanalyse von Nukleinsäuren

Die mittels Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA (Plasmid oder genomische DNA) wurde durch Gelelektrophorese auf einem 0,7 - 2% Agarosegel aufgetrennt und nach Angaben des Herstellers mittels Kapillarblot auf Nylon Membranen (Boehringer Mannheim) oder Gene Screen Plus Membranen (NEN) übertragen. Die Blots wurden in einer Lösung aus 50% Formamid, 2x SSC, 1% SDS, 10% Dextransulfat und 0,2mg/ml DNA aus Heringssperma (Ultraschall behandelt, denaturiert) für 2h bei 42°C vorinkubiert. Nach Zugabe des radioaktiv markierten Fragmentes (s.u.) zu dieser Lösung erfolgte die Hybridisierung unter leichtem Schütteln bei 42°C ÜN.

Nach der Hybridisierung wurden die Blots für 2x 5min in 2x SSC bei RT, 2x 30min in 2x SSC 1% SDS bei 60°C und falls notwendig 1x 20min in 1x SSC 0,1% SDS bei 42°C gewaschen. Die Analyse erfolgte über eine Auswertung mittels Phosphoimager (Molecular Dynamics). Die Phosphoimagerplatten wurden ein bis vier Tage exponiert.

Um die Blots einer erneuten Hybridisierung zu unterziehen, wurden sie in einer Lösung aus 0,015 M Natriumchlorid, 1% SDS und 0,0015 M Natriumcitrat gekocht. Alternativ wurden die Blots zweimal mit siedendem 0,1SSC 1% SDS übergossen und bis zur Abkühlung auf RT inkubiert.

Denaturierende Agarose Gele und die Durchführung des RNA Transfers, sowie die nachfolgende Hybridisierung und das Waschen der Membran wurden nach den Angaben des Membran Herstellers (Gene Screen Plus Membran NEN) durchgeführt.

6.1.7 Radioaktive DNA - Markierung

Mittels des Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer) wurde, den Herstellerangaben folgend, die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP oder [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (Amersham) durchgeführt. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte durch ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham). Vor Zugabe der markierten DNA zum prähybridisierten Blot, wurde die aufgefangene Fraktion 5-10min bei 96°C denaturiert und danach 5min auf Eis abgekühlt.

6.1.8 Ligation

Zur Herstellung von Konstrukten durch Insertion von DNA-Fragmenten in entsprechend linearisierte Vektoren wurden die Vektoren, falls notwendig, am 5'Ende mittels alkalischer Phosphatase (CIP) dephosphoryliert und bei 14°C in 20µl Volumen ÜN mit 1U T₄-DNA-Ligase inkubiert.

Die Klonierung von PCR-Fragmenten wurde mit dem TA Cloning Kit (Invitrogen) nach den Herstellerangaben durchgeführt.

6.1.9 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen

Mit 100µl, langsam auf Eis aufgetauten, kompetenten Zellen wurden 5 - 10µl eines 20µl Ligationsansatzes vorsichtig gemischt und 30min auf Eis gekühlt. einem Hitzeschock für 90sec bei 42°C folgte eine Zugabe von 1000µl kaltem LB-Medium, sowie eine Inkubation bei 37°C für 1h im Wasserbad. Nach 2min kühlen auf Eis wurden die Zellen mit 600g bei RT abzentrifugiert, in ca. 200µl LB-Medium resuspendiert und auf eine Ampicillin beschichtete LB-Platte ausgestrichen. Als negativ Kontrolle diente jeweils die Transformation von kompetenten Zellen ohne DNA-Zugabe.

6.1.10 Sequenzierungen

Die DNA-Sequenzierung erfolgte auf einem ABI Prism™ 377 DNA Sequencer von Applied Biosystems mit der Taq FS BigDye -Terminator cycle sequencing Methode.

6.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Reaktionen wurden in 50 oder 100µl Ansätzen (je 10mM dNTP's, je 10pmol Oligonukleotide, 1-5ng Plasmid DNA, 2U Taq-DNA-Polymerase, 10mM TrisHCl(pH8,3), 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 0,001% Gelatine) in einem Peltier Thermal Cycler (Biozym) durchgeführt.

PCR Reaktionen mit dem Expand-High-Fidelity-PCR Kit(Roche), dem Long Template PCR-Kit(Roche) und PWO-Polymerase (Roche) wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Annealing-temperatur und Elongationszeiten wurden den jeweiligen Bedingungen angepasst. Die Annealing-temperatur wurde etwa 5°C unter der berechneten Schmelztemperatur der Oligonukleotide festgelegt. Die Elongationszeiten richteten sich nach der Länge des zu

erwartenden Amplifikats (~1min/1kb). Jeweils 10µl eines PCR-Ansatzes wurden zur Analyse mittels Gelelektrophorese auf ein TBE-Agarose-Gel aufgetragen. Zur nachfolgenden Klonierung wurden die Fragmente direkt aus dem Ansatz in den PCR2.1 Vektor (Invitrogen) ligiert.

6.1.12 RNA Präparation

RNA Präparationen erfolgten mit dem TRIzol[®] LS Reagent (Life Technologies) nach den Angaben des Herstellers.

6.1.13 Reverse-Transkription

Für die Amplifikation von mRNA wurden je 1µg Gesamt RNA (~100ng polyA RNA) revers transkribiert. Hierzu wurde die RNA in 4,5µl für 5min bei 70°C inkubiert, 2min auf Eis gekühlt und mit 2µl 5x RT Puffer(Gibco/BRL), 1µl DTT(0,1M), 0,5µl RNAsin(Boehringer), 0,5µl SuperscriptII(Gibco/BRL), 0,5µl dNTP-Mix (10mM) und 1µl p(dN6) (50µM Boehringer) versetzt, aufgefüllt und für 1h bei 37°C inkubiert.

6.1.14 Quantitative RT-PCR

Für quantitative RT-PCR-Reaktionen wurden 10µg Gesamt RNA in 20 µl Volumen 30 min bei 37°C mit RNase freier DNase inkubiert und nach Phenol/Chloroform Extraktion mit Ethanol gefällt. Hiervon wurden 5µg in einem doppelten RT-PCR Ansatz(s.o.) in cDNA umgeschrieben. Die RT-Ansätze wurden nach der Reaktion auf je 130µl mit Wasser verdünnt. Hiervon wurden je 8µl für eine PCR Reaktion eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und nach dem Trocknen des Geles mittels Phosphoimager SI 445 und der ImageQuant Software Version5.1 (Molecular Dynamics) ausgewertet.

8 μ l verdünnter RT-Ansatz
1 μ l sense Primer (10pmol/ μ l)
1 μ l antisense Primer (10pmol/ μ l)
1 μ l dNTP's
3 μ l 10x PCR Puffer
0,1 μ l 32 P-dCTP
0,1 μ l Taq-Polymerase
15,8 μ l H₂O

6.2 Immunologische Methoden

6.2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Das Antigen (10 μ g/ml in PBS) wurde über Nacht bei 4°C auf Mikrotiterplatten gegeben, um diese zu beschichten. Hierauf folgte eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 1% BSA in PBS (1h 37°C). Das Antiserum wurde nach zweimaligem Waschen mit 0.1%NP-40 in PBS in einer Verdünnungsreihe 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:20 zugefügt (1h 37°C). Nach erneutem Waschen folgte die Inkubation mit einem Anti-Kaninchen-IgG gekoppelt mit alkalischer Phosphatase in 50mM Tris-HCl pH 8,0 1mM MgCl₂, 1%BSA (1h 37°C). Auf erneutes Waschen erfolgte die Zugabe des Substrats (25mM p-Nitrophenylphosphat in 1M Diethanolamin pH9,8; 0,5M MgCl₂) und die Extinktionsmessung (405nm ELISA-Reader, EAR 400AT, SLT Labinstruments) nach 30 min Inkubation. Die Werte der Verdünnungen wurden extrapoliert und derjenige, bei dem sich gerade noch ein Unterschied zum NIS zeigte wurde als Titer definiert.

6.2.2 Western Blot

Der Blot wurde in einer Sartoblot II S-Kammer (Sartorius) als semi dry blot auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 μ m BA85; Schleicher und Schuell) durchgeführt. Der Transfer fand bei 1-2mA/cm² für etwa 2h statt (max. 16V; Puffer A: 0,3M Tris pH10,4, 20% MeOH; Puffer B: 0,25M Tris pH10,4, 20% MeOH; Puffer C: 0,25M Tris pH9,8, 20% MeOH, 40mM ϵ -Aminocapronsäure)(Kyhse-Andersen 1984, Towbin, et al. 1979). Alternativ wurde das NuPage Western Blot System

(Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers benutzt. Durch Ponceau S Färbung wurde der Erfolg des Transfers überprüft. Die restliche Membran wurde für 2h bei RT oder über Nacht in TBST (TBS; 0,05%Tween 20); 3-5% Milchpulver zur Absättigung freier Bindungsstellen hybridisiert, wonach eine Inkubation mit dem ersten Antikörper für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C in TBST; 1% BSA stattfinden konnte. Nachfolgend wurde der blot für 5×5 min mit TBS; 0,1 - 0,2% Triton (bzw. NP40) gewaschen und mit dem 2.Antikörper Anti-Kaninchen IgG, konjugiert mit alkalischer Phosphatase bzw. Peroxidase in TBS;1-3%BSA, für 30-60min inkubiert. Nach nochmaligem waschen für 4×2 min. mit TBST; konnte der Blot entwickelt werden, indem er 2× mit TBS gewaschen wurde, um das Detergenz zu entfernen und danach in 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat (BCIP 20mg/ml in DMSO) und Nitroblautetrazolin (NBT 0,2 mg/ml in 0,1M Tris/HCl pH9,7 50mM MgCl₂) überführt wurde. Die Reaktion wurde mit H₂O abgestoppt. Die Peroxidase Färbung wurde mittels Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche) nach den Herstellerangaben, bzw. mit Luminol-Detektionsreagenz (100mM Tris/HCl pH 8,5; 2,5mM Luminol; 0,35mM Cumarsäure; 0,01% H₂O₂) durchgeführt. Anschließend konnte die Chemilumineszenz durch das Auflegen von Röntgenfilmen (Kodak, Fuji) detektiert werden.

6.3 Prüfung des Differenzierungszustandes von ES-Zellen

6.3.1 Alkalische Phosphatase Färbung

Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und in Aceton/Methanol (1:1) für 10min bei RT fixiert. Nach zweimaligen waschen mit PBS wurde 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (BCIP) (0,5g/10ml Dimethylformamid) in Kombination mit Nitroblautetrazolin (NBT) (0,5g in 10ml Dimethylformamid) als Substrat in AP Puffer (100mM Tris (pH9,5), 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) zugegeben und für 1h bei RT inkubiert. Die Färbungen wurden unter einem Zeiss Axioscope ausgewertet.

6.3.2 EKMA7 Antikörperfärbung

Auf einen Objektträger mit 4 Kammern wurden ES-Zellen (2×10^4) auf embryonalen Fibroblasten ($3-4 \times 10^4$) ausplattiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 15 min mit 4% Paraformaldehyd bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellmembranen für die Antikörper durchlässig gemacht und die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt, indem sie mit: 3% BSA in PBS für 30 - 40min bei RT versehen wurden. Die Überstände mit EKMA7 Antikörpern entstammten Laborpräparationen der entsprechenden antikörperproduzierenden Zellen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS (jeweils 5min) für 30min bei RT durchgeführt. Auf erneutes Waschen mit PBS konnte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper(anti anti Ratten IgG (Sigma) EKMA) für 30min bei RT folgen. Nach waschen mit PBS wurde das Präparat mit Glyceringelatine eingedeckelt.

6.3.3 Immunfärbungen an Gefrier- und Paraffinschnitten

6.3.3.1 Paraffinschnitte

Für Paraffinschnitte wurden die Mäuse anästhesiert und mit 4% Paraformaldehyd in PBS über den linken Herzventrikel ausgeblutet. Die Organe wurden vollautomatisch mit einem Citadell 1000 in Paraffin eingebettet. Das Programm lief von der Fixierung in 4% Paraformaldehyd in PBS über 70% EtOH für 3h, 80% EtOH für 1h; 90% EtOH für 1h; 96% EtOH für 1h; 100% EtOH für 2h; 100% EtOH für 2h; 100% EtOH für 2h; Xylol/100%EtOH(1:1) für 1,5h; Xylol für 1,5h; Xylol für 1,5h; RAS Paraffin Nr.3 für 2h bei 60°C, RAS Paraffin Nr.6 für 3h bei 60°C im Vakuum. Schnitte wurden mit einem Mikrotom (Vogel, AS300) angefertigt. Die Schnitte wurden 2x5min in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe (100% - 80% - 60% - 40% - 20%) rehydratisiert. Nach waschen mit PBS folgte die Lyse für 15min mit 0,5% TritonX-100/PBS. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit 3%BSA in PBS oder NIS in PBS für 1h bei RT abgesättigt. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte in 0,1%TritonX-100; 3%BSA; PBS für 1h bei RT (bzw. 4°C über Nacht). Nach dreimaligem Waschen in

PBS; 0,5% TritonX-100 wurde der 2. Antikörper in PBS; 3% BSA für 1h bei RT und Dunkelheit appliziert. Das Objekt wurde nach dreimaligem Waschen in PBS; 0,5% TritonX-100 mit Glyceringelantine eingedeckelt.

6.3.3.2 Kryoschnitte

Mäuse wurden mit Nembutal anästhesiert und über den linken Herzventrikel mit 4% Paraformaldehyd und 2% Glutaraldehyd in PBS oder 0,9% NaCl-Lösung perfundiert. Nach Präparation der Organe wurden diese mindestens drei Stunden in 4% Paraformaldehyd in PBS nachfixiert und über Nacht in 10 ml 0.5 M Sucrose bei 4°C inkubiert. Nach Perfusion mit Kochsalzlösung wurden die Organe direkt mit O.C.T. (*Tissue Tek, Miles Scientific*) überschichtet und bei -80°C gelagert. Vor dem Schneiden wurden die Organe bei -20°C in O.C.T. (*Tissue Tek, Miles Scientific*) eingebettet. Bei einer Kammertemperatur von -20°C wurden die Schnitte mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Vogel, Typ AS 650) in einer Stärke von 5-10 µm angefertigt und auf Objektträger (SuperFrost Plus) aufgezogen. Die mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger wurden ca. 10 min in 4% Paraformaldehyd in PBS eingelegt, mit PBS gewaschen und getrocknet. Vor einer Lagerung bei -20°C wurden die Objektträger für jeweils fünf Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 20%, 40%, 60%, 80% und reinem Alkohol dehydratisiert und vor Gebrauch mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert.

Gefrierschnitte wurden für 10min mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit 3%BSA in PBS für 1h bei RT abgesättigt. Die Inkubation mit dem 1.Antikörper fand in 1% BSA/PBS 2h bei RT statt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (1% BSA / 0.2% Triton X-100) wurde der 2. Ak für 1h bei RT in Dunkelheit aufgetragen. Nach viermaligem Waschen mit PBS/1% BSA, 0.2% Triton X-100 wurde das Objekt mit Glyceringelatine (Merck, mit 2.5% DABCO als Radikalfänger) und großen Deckgläschen einbettet.

6.3.4 Immunfärbungen an Zellen

Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger, Deckgläser oder Culture Slides (Falcon) plattiert. Die Fixierung erfolgte mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 10 min, anschließend wurden die Zellen mit PBS/0,5% Triton-X-100 für 15 min. permeabilisiert. Das Blocken der Zellen erfolgte für 1h bei RT mit 3% BSA, NIS oder Milchpulver in PBS. Danach wurde dreimal je 5min mit PBS gespült und der Antikörper bzw. das Antiserum in der vorher bestimmten Verdünnung für 1h bei RT in PBS 1% BSA zugegeben. Nach viermaligem waschen mit PBS wurde der zweite Antikörper in der passenden Verdünnung zugegeben und für 1h bei RT inkubiert. Für Doppelfärbungen wurden ein anti-Maus IgG (Sigma) Cy2 oder FITC markiert verwendet.

Die Präparate wurden anschließend dreimal mit PBS/0,2% Triton X-100 und zweimal mit PBS gewaschen und dann mit Glyceringelatine eingedeckelt.

6.3.5 EGFP Fluoreszenz Analyse

Zellen wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Kulturplatten (Nunc) ausplattiert und mittels eines Zeiss Axioscop Fluoreszenzmikroskops (Filterset für Enhanced - GFP; Chroma Analysetechnik) mit einem Flüssigimmersionsobjektivs (Zeiss) betrachtet und mittels CCDKamera (Hamamatsu Photonics) und der Software C4742-95-Twain Interface Version3 bzw. Zeiss Axiovision dokumentiert. Alternativ wurden die Zellen auf Chamberslides ausplattiert, mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 15min fixiert und anschließend mit Glyceringelatine eingedeckelt.

6.4 Biochemische Methoden

6.4.1 Lipidanalyse

6.4.1.1 Lipidextraktion aus Zellen

Die Lipidextraktionen aus Zellen und Organen erfolgte nach der Methode von Bligh und Dyer (Bligh und Dyer 1959).

HEK Zellen wurden mit einmal mit PBS gewaschen und in PBS mit einem *rubber policeman* von der Kulturschale gekratzt. Nach Sedimentation (960 x g, 5 min) wurden die Zellen in 0.5 ml H₂O resuspendiert und in ein Glasröhrchen überführt. Nach Zugabe von 1.5 ml Chloroform/Methanol 1:2 (v/v) und 0.4 ml 1M NaCl wurde unter wiederholtem kräftigen Mischen (vortex) 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von je 0.5 ml 1 M NaCl und 0.5 ml Chloroform wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die organische Phase wurde unter N₂ zur Trockene eingengt und in Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) gelöst.

6.4.1.2 Lipidextraktion von Organen

Die Maus-Organen wurden in 1 ml PBS mit einem Elvehjem-Potter durch 5-6 "strokes" bei ca. 1200 rpm homogenisiert. Es wurden 3 ml Chloroform/Methanol 1:2 (v/v) und 0.8 ml 1 M NaCl zugegeben und das Gemisch unter wiederholtem kräftigen Mischen (vortex) 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von je 1 ml Chloroform und 1 M NaCl wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt, die organische Phase unter N₂ zur Trockene eingedampft und in Chloroform/Methanol 2:1 gelöst.

6.4.1.3 Darstellung der alkali-stabilen Lipide

Für die Darstellung der alkalistabilen Lipide wurden die Gesamtlipid-Lösung unter N₂ zur Trockene eingedampft, in 1 ml 0.5 N methanolischer KOH gelöst und für 1-2 h bei 37° C hydrolysiert. Nach Zugabe von 1ml H₂O wurden die Lipide mit 1 ml Chloroform extrahiert. Nach Zentrifugation wurde die Unterphase in ein frisches Röhrchen überführt und die Oberphase erneut mit 1 ml Chloroform/Methanol 2:1

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter N₂ zur Trockne eingedampft und in Chloroform:Methanol (2:1) gelöst.

6.4.1.4 Präparationen für die Gaschromatographie

Die freien Fettsäuren der verseifbaren Lipide wurden aus der wässrigen Phase nach ansäuern mit Petrolether extrahiert, 2 mal mit Wasser gewaschen und zur vollständigen Trockne eingedampft. Nachfolgend wurden die Fettsäuren in 1ml BF₃-Methanollösung für 15 min bei 100°C verestert und nach Zugabe von 2ml H₂O mit Petrolether extrahiert. Nach erneutem Eindampfen unter N₂ bis zur Trockne wurden die Fettsäuremethylester in Chloroform:Methanol (2:1) oder Aceton gelöst und gaschromatographisch analysiert.

Die alkalistabilen Lipide wurden zur Trockne eingedampft und darauf in 2ml methanolischer HCl bei 80°C verestert. Nach abkühlen auf RT wurden die Fettsäuremethylester durch folgende Schritte extrahiert:

Extraktion mit 0,2ml Hexan; Zugabe von 0,2ml H₂O; Extraktion mit 0,4ml Hexan; Zugabe von 0,2ml H₂O; Extraktion mit 0,6ml Hexan; Extraktion mit 0,4ml Chloroform. Die organischen Phasen wurden vereinigt und unter N₂ zur Trockne eingedampft. Um eventuell vorhandene Hydroxyfettsäuren für die gaschromatographische Analyse zu präparieren, wurden die Fettsäuren in 0,03ml absolutem Pyridin gelöst und nach Zugabe von 0,03ml Essigsäureanhydrid für 12h bei RT in Dunkelheit acetyliert. Die Reaktionsprodukte wurden erneut unter N₂ bis zur Trockne eingedampft, in Chloroform:Methanol (2:1) oder Aceton gelöst und gaschromatographisch analysiert.

Sphingosinreste wurden mittels MSTFA [N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamide]

(Macherey-Nagel) silyliert und anschließend direkt für die gaschromatographische Analyse eingesetzt.

6.4.1.5 Dünnschichtchromatographie

In Abhängigkeit der aufzutrennenden Lipide wurden die Proben in verschiedenen Laufmitteln auf HPTLC Kieselgel 60 Platten (Merck) aufgetrennt.

Gesamt- und alkalistabile Lipide wurden in den Laufmitteln Chloroform/Methanol/H₂O (65:25:4 v/v/v), und Chloroform/Methanol (15:1)

aufgetrennt. Zur gleichzeitigen Darstellung von Sphingomyelin und Ceramid bzw. lyso-PC/lyso-PAF und Alkyl/Acyl-Glycerol wurden die Dünnschichtplatten ca. 8 cm im Laufmittel Chloroform/Methanol/H₂O (65:25:4 v/v/v) entwickelt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Platten dann im Laufmittel Chloroform/Methanol (15:1) entwickelt. Zur schärferen Trennung der Phospholipide wurde alternativ 8 cm in Chloroform/Methanol/ 2 N NH₄OH (65:35:5), gefolgt vom Laufmittel Chloroform/Methanol (15:1) entwickelt. Zur Analyse zuckerhaltiger Lipide wurden diese mit Chloroform/Methanol/2 N NH₄OH (65:35:5) oder Chloroform/Methanol/15mM CaCl₂ (65:35:8) aufgetrennt. Die aufgetrennten Gesamtlipide wurden mit 50 % H₂SO₄ besprüht und bei 120° C verascht. Phospholipide wurden mit Zinzadze-Reagenz angefärbt (Dittmer und Lester 1964), Amin-haltige Lipide mit Ninhydrin und zuckerhaltige Lipide durch Orcin-Färbung dargestellt(Ledeen und Yu 1982).

6.4.1.6 Gaschromatographie

Die gaschromatographische Auftrennung der Fettsäuremethylester und Sphingoisinbasen erfolgte mit einem GC 8000 Series Gaschromatographen (Carlo Erba Instruments) mit Flammionisationsdetektor und einer Kapillarsäule (Säulenlänge 30m ; Säulendurchmesser 0,22ID; Filmdicke 0,25µm) durchgeführt. Die Quantifizierung wurde mit dem Programm Chrom Card for Windows Version 1.21 (CE Instruments) durchgeführt. Der benutzte Gradient verlief von 2min. bei 180°C auf 210°C bei 30min. Die Gasdrucke waren Helium 125kPa, Luft 90kPa und H₂ 60kPa.

6.4.2 CGT Enzymtest

Der Aktivitätstest wurde nach einer modifizierten Methode von Neskovic (Neskovic, et al. 1981, Neskovic, et al. 1986) durchgeführt.

Die Zellen einer halbkonfluenten 90mm Kulturschale wurden in 200µl Lysispuffer (10% Glycerin, 0,1% TritonX-100, 1% Mercaptoethanol, 0,1M TrisHCl pH8,8)

aufgenommen und lysiert. Nach der Proteinbestimmung wurde der Glycingehalt auf 20% erhöht. Unlösliche Bestandteile wurden für 15 min bei 15000g abzentrifugiert und der Überstand als Zellextrakt eingesetzt. Je 20µl 2mM C8OH Ceramid und 0,2% Lecithin 0,2 wurden (Stocklösungen in Chloroform/Methanol (2:1)(v/v) Lagerung bei -20°C) wurden mit 20µl 1% Triton X-100 homogenisiert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurden 20µl 20mM MgCl₂ zugegeben und 2 min auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 50µl 200mM Tris/HCl pH 8,0, 100µl Zellextrakt und 10µl 0,5mM ¹⁴C-UDP-Galactose (5µCi/µmol) zugegeben und 60 min bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 400µl Chloroform/Methanol/Wasser (64:25:4) (v/v/v) wurde die Reaktion abgestoppt. Die zwei Phasen wurden homogenisiert und durch Zentrifugation (2min 12000g) wieder getrennt. Die wässrige Phase wurde möglichst komplett abgenommen und verworfen, die untere Phase 3 mal mit CHCl₃/Methanol/H₂O (3:48:47) (v/v/v) gewaschen. Ein 150µl Aliquot wurde in 5ml Ultima Gold (Packard bioscience) im Szintillationszähler gemessen, oder im Vakuum getrocknet, in 30µl Chloroform/Methanol (2:1) (v/v) aufgenommen und auf eine HPTLC Platte aufgetragen. Im Laufmittel CHCl₃/Methanol/H₂O (64:25:4) (v/v/v) wurden die markierten Lipide aufgetrennt und anschließend mittels Phosphoimager SI 445 und der ImageQuant Software Version 5.1 (Molecular Dynamics) ausgewertet.

6.4.3 NPT-Enzymtest(Platt und Yang 1987)

Die Zellen wurden in 200µl Puffer (20% Glycerin; 0,135M Tris/HCl pH6,8; 4mM Dithioerythritol) suspendiert und durch viermaliges Tauen und Schockfrieren lysiert.

Durch Zentrifugation für 3min bei 12000g wurden die unlöslichen Bestandteile sedimentiert und der Überstand als Zellrohextrakt abgenommen. 20µl Zellrohextrakt wurden mit 50µl ³²P-ATP Lösung (1µl radioaktiv markiertes ³²P-ATP in 500µl Maleatpuffer) und 110µl Kanamycinlösung (4µl Kanamycin in 1ml Maleatpuffer [67mM Tris Maleat pH7,1; 42mM MgCl₂; 400mM NH₄Cl]) für 2 h bei RT inkubiert. In einer selbst konstruierten Apparatur wurden je 150µl des Reaktionsansatzes auf 2 Blätter Nitrocellulose, 2 Blätter P81, 1 Blatt Whatman

3MM gegeben und 30min Einwirken lassen und dann für 1h einem Vakuumsog ausgesetzt. Es wurde 3 mal mit H₂O gespült und die Membran 2 x 30min in H₂O geschwenkt. Nach kurzem lufttrocknen wurden die Membranen auf einer Phosphoimager Platte exponiert mittels Phosphoimager SI 445 und der ImageQuant Software Version 5.1 (Molecular Dynamics) analysiert.

6.4.4 Myelinpräparationen

Ein Mäusehirn (ca. 0.5 g) wurde in 10 ml 0.32M Sucrose homogenisiert und mit 20 ml 0.86M Sucrose unterschichtet. Nach einer Sucrose-Gradientenzentrifugation wurde aus der Interphase das Myelin mit einer Pasteurpipette abgezogen, mit einem Überschuß an Wasser ausgefällt und abzentrifugiert. Nach erneutem Waschen mit Wasser und Zentrifugation wurde das Myelin direkt in 500 µl Probenpuffer (10% Glycerin, 125mM Tris-Cl, pH 6.8, 4% SDS, 0.02% Bromphenol-Blau, 2% β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Die Zentrifugationen wurden jeweils für 30 Minuten bei 4°C und 10.000 g durchgeführt. Für Silber-Färbungen wurden jeweils 10 µl für die gelchromatographische Auftrennung verwendet, für Coomassie Brilliant Blue Färbungen und Western Blots jeweils 30 µl.

6.4.5 Quantifizierung von Proteinen

Proteinlösungen mit einem Detergenzgehalt bis zu 0.1 % wurden nach der Vorschrift von Bradford (Bradford 1976) quantifiziert. Hierbei wurden Doppelproben von je 10 µl mit 200 µl der Färbelösung (0.06 % Coomassie G-250 in 1.9 % Perchlorsäure) in 96-Loch-Platten gemischt und in einem ELISA-Reader (EAR 400 AT, SLT Labinstruments) bei 620 nm ausgewertet. Proben mit höherem Detergenzgehalt aber ohne DTT wurden mit Hilfe des BCA-Standard-Tests bei 562 nm quantifiziert (Pierce). Als Standard dienten 0-600 µg/ml BSA-Lösungen im jeweiligen Probenpuffer.

6.4.6 X-Gal Färbung von Gewebeschnitten

Die Färbung von Gewebeschnitten der Rosa26 gekreuzten Mäuse wurde nach den Angaben von Soriano et al. (<http://www.fhcrc.org/labs/soriano/protocols/xgal.html>) und Monteggia et al. (Monteggia, et al. 2004) an Schnitten von in O.C.T. (Tissue Tek, Miles Scientific) eingebetteten Hirnen durchgeführt.

6.5 Methoden zur Erzeugung eines polyklonalen Antikörpers

6.5.1 Proteinexpression und Affinitätsreinigung im pET-System

Das zu exprimierende Gen wurde in das bestehende Leseraster des linearisierten Expressions-Vektor pET-22b(+) (Invitrogen) einkloniert. Das Plasmid wurde zur Transformation von Zellen des E.coli Stammes BL21pLysS Star (Invitrogen) mit LB-Medium verwendet. Von einem positiven Klon wurden 100ml M9ZB-Medium (1% Peptone 140 (BRL), 0,5% NaCl, 20mM Na₂HPO₄*12H₂O, 20mM K₂HPO₄, 20mM NH₄Cl, 1mM MgSO₄, 0,4% Glukose, Chloramphenicol 15µg/ml, Ampicillin 2,5µg/ml) in einem 500ml Expressionskolben mit 5ml ÜN-Kulturen angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀~0,6 im 37°C warmen Luftschüttler wachsen gelassen. Hierauf folgte eine Induktion mit 1mM IPTG für drei bis sechs Stunden. Die Zellen wurden für 10min bei 4°C und 3000g sedimentiert. Das Sediment wurde in 10ml PBS aufgenommen und durch dreimaliges Einfrieren (flüssiger Stickstoff) und auftauen (Wasserbad 37°C) wurden die Zellen aufgebrochen. Nach Zugabe von je 100µl RNase A (10mg/ml), DNase I (10mg/ml) und Lysozym (50mg/ml) und anschließender Inkubation für 30min bei 37°C wurden die Zellfragmente durch mehrfache Zentrifugation (15min 4°C 13000g) von der intrazellulären Flüssigkeit getrennt und konnten zur Analyse auf ein 10-15% SDS-Polyacrylamidgel(Laemmli 1970), bzw. Schägger-Gel (Schagger und von Jagow 1987) aufgetragen werden. Das Sediment wurde in 10ml Präextraktionspuffer (50mM Natriumphosphat, pH8,0; 10mM Tris-HCl, pH8,0; 100mM NaCl, 1% TritonX-100; 1% SDS; 1X

Complete™ ohne EDTA) aufgenommen und 30 min bei RT kräftig geschüttelt. Das nach 15min Zentrifugation bei 39.200g erhaltene Sediment wurde in 1-2ml Extraktionspuffer (50mM Natriumphosphat, pH8,0; 10mM Tris-HCl, pH8,0; 100mM NaCl; 1% SDS) 10 min bei 100°C inkubiert und erneut zentrifugiert. Präextrakt und Extrakt wurden vereinigt, durch einen 0,45µm Filter filtriert und sofort auf eine mit Waschpuffer (50mM Natriumphosphat, pH8,0; 10mM Tris-HCl, pH8,0; 100mM NaCl; 0,05% SDS) äquilibrierte Mini-talon-Säule (Clontech 0,5-1ml Bettvolumen) aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit Waschpuffer unter Zusatz von 1-2mM Imidazol solange gewaschen, bis im Durchlauf kein Protein mehr mittels Proteinbestimmung nach Bradford (s.o.) nachweisbar war. Die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgte mit Waschpuffer unter Zusatz von 50-100mM Imidazol. Alternativ wurde Ni-NTA Superflow (Quiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Von allen Schritten wurden Aliquots zur Dokumentation der Reinigung auf ein 10-15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

6.5.2 Immunisierung von Kaninchen

500µg des rekombinanten Proteins wurden mit dem gleichen Volumen kompletten FREUNDschen Adjuvanz (CFA) emulgiert und einem ca. 7 Wochen alten Kaninchen subcutan bzw. intramuskulär in die Hinterläufe injiziert. Aus der Ohrvene wurde zuvor eine Blutprobe, für die Präparation des non-immun-serum (NIS) entnommen. Drei Booster-Injektionen mit je 200µg des rekombinanten Proteins erfolgten im Abstand von je 2 Wochen ebenso in einer Emulsion mit inkomplettem Freundschem Adjuvanz (s.o.). Der Titer wurde mittels ELISA ermittelt und 2 Wochen nach der letzten Booster-Injektion wurde das Tier nach Betäubung mit Nembutal, über Herzpunktion ausgeblutet. Das Serum wurde nach Gerinnen des Blutes (4°C über Nacht) durch Zentrifugation gewonnen.

6.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Analyse der Proteinexpression und die Kontrolle der weiteren Aufreinigung des entsprechenden Proteins wurden 10-15%ige SDS-Polyacrylamid-Gele (Laemmli 1970) oder Schägger Gele (Schagger und von Jagow 1987) verwendet. Die SDS PAGE Gele wurden mit Coomassie-Blau für 15-30min gefärbt und in Entfärbelösung bis zum gewünschten Kontrast entfärbt. Nach 2-3h Inkubation in 50% Methanol / 47% Wasser / 3% Glycerin wurden die Gele zwischen zwei aufgespannten Einmachfolien getrocknet und bei Bedarf digitalisiert.

6.5.4 CuCl₂ Färbung von Gelen

Für die Färbung durch Kupferchlorid wurden die Proteingele für 5 min. in einer 0,3M CuCl₂ Lösung geschüttelt, mit H₂O gewaschen und dann auf einen dunklen Hintergrund gelegt, um die Banden sichtbar zu machen.

6.5.5 Elektroelution von Proteinen

Die interessierenden Banden aus Proteingelen wurden nach CuCl₂ Färbung ausgeschnitten und 3 mal für je 10 min in Entfärbelösung (0,25M EDTA; 0,25M Tris HCl pH 9) geschüttelt. Zwei vertikale Elektrodengefäße wurden durch einen PVC Schlauch verbunden. Eine permeable Membran verhinderte den Übertritt der Acrylamidreste von der Kathode zur Anode. Die Gelfragmente wurden in Elektrodenpuffer (0,1% SDS, 100mM NH₄HCO₃) zu der Kathode gegeben, wonach das restliche Volumen auf der Anoden Seite mit 50mM NH₄HCO₃ aufgefüllt wurde. Die Elektroelution wurde bei 40-70V über Nacht durchgeführt. Das Protein wurde mit dem Puffer der Anode aufgefangen und anschließend lyophilisiert.

6.5.6 Ponceau S Färbung

Nitrocellulose Membranen wurden nach Western Blotting für 5 min in Ponceau Färbelösung (0,1% Ponceau-S; 1% Essigsäure) geschüttelt. Danach wurde die Membran in Entfärbelösung (1% Essigsäure) transferiert und bis zum Sichtbar werden der Banden geschüttelt. Die vollständige Entfärbung der Membran erfolgte kurz in 0,2M NaOH. Nach dreimaligem Waschen mit H₂O konnte die Membran weiter verwendet werden.

6.6 Zellbiologische Methoden

6.6.1 Kultur von Olineu Zellen

Die Olineu Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichteten Kulturschalen in modifiziertem SATO-Medium (Trotter und Schachner 1989) kultiviert.

Als Kulturbedingungen galten eine H₂O gesättigte Atmosphäre mit 4,8% CO₂ bei 37°C. Alle 3-4Tage wurden die Zellen passagiert indem sie mit PBS gewaschen und nachfolgend mit Trypsin abgelöst (3-5min bei 37°C) wurden. Die Reaktion wurde mit Medium abgestoppt und die im Medium aufgenommenen Zellen auf frische Platten ausgesät. Die Transfektion der Olineu-Zellen erfolgte zwei Tage nach der letzten Passage durch Elektroporation. Hierzu wurde das DNA-Konstrukt in einer Elektroporationsküvette (0,4 cm; Biorad) mit $1,5 \cdot 10^7$ Zellen (trypsinisiert, PBS gewaschen, aufgenommen in 960µl Medium oder PBS) gemischt und für 5min bei RT oder 4°C inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 500µF und 200V im GenePulser (Biorad). Die elektroporierten Zellen wurden nach 5min bei 4°C auf eine 90mm Poly-L-Lysin beschichtete Kulturschale ausplattiert.

6.6.2 Kultur von HEK Zellen

Die HEK Zellen wurden auf unbehandelten Kulturschalen HEK-Medium kultiviert. Als Kulturbedingungen galten eine H₂O gesättigte Atmosphäre mit 4,8% CO₂ bei 37°C. Alle 2-3Tage wurden die Zellen passagiert, indem sie mit PBS gewaschen und nachfolgend mit Trypsin abgelöst (3-5min bei 37°C) wurden. Die Reaktion wurde mit Medium abgestoppt und die im Medium aufgenommenen Zellen auf frische Platten ausgesät. Für die Fluoreszenzmikroskopie vorgesehene Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Platten kultiviert und mit 4%Paraformaldehyd in PBS fixiert. Die Transfektion der HEK-Zellen erfolgte zwei Tage nach der letzten Passage durch Elektroporation. Hierzu wurde das DNA-Konstrukt in einer Elektroporationsküvette (0,4 cm; Biorad) mit $1,5 \cdot 10^7$ Zellen (trypsinisiert, PBS gewaschen, aufgenommen in 960µl Medium oder PBS) gemischt und für 5min bei RT oder 4°C inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 250µF und 450V im GenePulser (Biorad). Die elektroporierten Zellen wurden nach 5min bei 4°C auf eine 90mm Kulturschale ausplattiert.

6.6.3 Kultur von embryonalen Stammzellen

Die verwendeten ES-Zellen der R1-, V8.1 und CJ7-Linie wurden auf mitotisch inaktiven embryonalen Fibroblasten ($3\text{-}5 \times 10^6$ Zellen / 90mm Kulturschale) in Kulturschalen (Costar) kultiviert. HM1 Zellen wurden auf Gelatine beschichteten Platten (Costar) $3\text{-}5 \times 10^6$ Zellen / 90mm Kulturschale) kultiviert. Als Kulturbedingungen galten eine H₂O gesättigte Atmosphäre mit 4,8% CO₂ bei 37°C. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen passagiert, indem sie mit PBS gewaschen und nachfolgend mit Trypsin abgelöst (3-5min bei 37°C) wurden. Die Reaktion wurde mit Medium abgestoppt und die im Medium aufgenommenen Zellen auf frische Platten ausgesät. Für die DNA Präparation vorgesehene Zellen wurden auf Gelatine beschichteten Platten ohne Zugabe von LIF kultiviert, da hier die Differenzierung der Zellen ohne Einfluß auf die weitere Analyse ist.

Die Transfektion der ES-Zellen erfolgte zwei Tage nach der letzten Passage durch Elektroporation. Hierzu wurde das DNA-Konstrukt linearisiert und in 0,1x TE aufgenommen. 25µg linearisierte DNA in 20-80µl Volumen wurden in einer Elektroporationsküvette (0,4 cm; Biorad) mit $1,5 \cdot 10^7$ ES-Zellen (trypsinisiert, PBS gewaschen, aufgenommen in 800µl Medium oder PBS) gemischt und für 5min bei RT inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 500µF und 180-220V (R1, CJ7 und HM1) bzw. 25µF und 400V (V8.1) im GenePulser (Biorad). Neben 160µl unbehandelter Zellsuspension, als Kontrolle, wurden die elektroporierten ES-Zellen nach 10min bei 4 °C oder RT auf vier 90mm Kulturschalen mit embryonalen Fibroblasten bzw. Gelatine (HM1) ausplattiert.

6.6.4 Selektion potentiell positiver ES-Zell-Klone

Einen Tag nach der Elektroporation wurde das Medium bei den unbehandelten ES-Zellen und einer der mit elektroporierten Zellen besetzten Platten gegen G418-Medium ausgetauscht, während die anderen Platten jeweils GanC-Medium zur Selektion erhielten. Das Medium wurde täglich gewechselt, wobei die GanC-Selektion nach 5 Tagen beendet wurde und nachfolgend alle Platten mit G418-Medium versorgt wurden. Nach 9 bis 13 Tagen wurden die selektionsresistenten Klone makroskopisch sichtbar.

6.6.5 Isolation selektionierter ES-Zell-Klone

Von den auch mit GanC selektionierten Platten wurden Klone unter PBS mit einer sterilen Pippetenspitze einzeln abgelöst und für 5min in Trypsin auf einer 96-Loch-Platte vereinzelt. Die vereinzelt Klone wurden auf 96-Loch-Platten mit embryonalen Fibroblasten und Kulturmedium ausplattiert und nach 2-3 Tagen 50% auf eine 96-Loch-Platte (1x Gelatine beschichtet) verteilt. Die Zellen auf den gelatinebeschichteten Platten dienten der DNA-Präparation während die restlichen Zellen zur Kryokonservierung eingesetzt wurden.

6.6.6 Kryokonservierung von ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden bei Erreichen einer Dichte von ca. 10^7 Zellen pro 90mm Platte mit PBS gewaschen und nachfolgend trypsinisiert. Das Zellsediment wurde nach Abstoppen der Reaktion mit Medium und der Zentrifugation (RT; 500g; 5min) in 10ml Einfriermedium (Kulturmedium auf 20% FCS ergänzt mit 10% DMSO) aufgenommen und zu 1ml Aliquots bei -70°C in einer Styroporkiste eingefroren. Nachdem die Zellen vollständig eingefroren waren konnten sie im Gefrierschrank oder für eine längere Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Das Medium der in 96-Loch-Platten kultivierten in Suspension befindliche Zellen wurde direkt mit FCS und DMSO (s.o.) supplementiert auf $100\mu\text{l}$ mit Kulturmedium aufgefüllt und nach Überschichten mit Paraffinöl bei -70°C eingefroren.

6.6.7 Auftauen und Expansion positiver Zellklone

Klone mit nachgewiesenem homologem Einbau des Replacement-Vektors mußten zur weiteren Analyse, der transienten Cre-Expression und der Injektion aufgetaut und expandiert werden. Hierzu wurde die 96-Loch-Platte mit den positiven Klonen im Brutschrank bei 37°C angetaut und die Klone unter der sterilen Werkbank auf eine mit embryonalen Fibroblasten bestückten 24-Loch-Platte transferiert, von der aus die Klone bis auf 10x90mm Platten expandiert wurden. Klone in großen Volumina Einfriermedium wurden vor dem Ausplattieren auf Kulturschalen mit embryonalen Fibroblasten in mindestens 10ml Kulturmedium (ohne LIF) gewaschen und Präzipitiert (5min max1000g bei RT).

6.6.8 Transiente Cre-Expression

Die Vektoren pBS185, pIRESCreNLS und pPGKCrebpA kodieren die Cre Rekombinase unter der Kontrolle eines Promotors, der eine ubiquitäre Expression des Cre-Gens ermöglichen soll. Zur transienten Cre-Expression wurden homolog

rekombinierte ES-Zellen durch Elektroporation mit den nicht linearisierten Vektoren transfiziert. Nach dieser Elektroporation war keine Anreicherung mehr durch Selektionsmarker möglich, da diese das Ziel der Exzision waren. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Teil der Zellen in einer 24-Loch-Platte mit G418-Medium kultiviert. Für Zellklone die sich nicht in Kultur halten ließen, konnte man vermuten, dass bei ihnen eine Cre-Rekombination stattgefunden hat und das Gen für die Neomycinresistenz deletiert wurde. Nachweise für das Ereignis der Rekombination durch die CreRekombinase wurden mit den oben erwähnten Mitteln Southern blot, PCR und Sequenzierung durchgeführt.

6.6.9 Karyotypbestimmung

Die Karyotypbestimmung von ES-Zellen erfolgte nach dreimaliger Passage auf Gelantine beschichteten 90mm Kulturschalen (R1, CJ7 und V8.1).

Der Zellzyklus wurde durch Zugabe von 33µl Cholchicinlösung (Demecoline solution, Sigma) zu 5ml Medium und anschließender Inkubation bei 37°C für 50 min. erreicht. Danach wurden die Zellen drei mal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin von der Platte abgelöst. Nach mehrfachem waschen mit PBS und anschließender Präzipitation wurden die Zellen zur Osmolyse in 0,56% KCl aufgenommen. Hierbei wurde das Präzipitat vorsichtig abgelöst und 1ml KCl tropfenweise hinzugegeben. Nach Resuspension der Zellen wurden weitere 3ml KCl zugegeben. Nach 10 min. Inkubation bei RT wurde für 5min. bei 500g zentrifugiert und der Überstand abdekantiert.

Die Zellen wurden in der Restflüssigkeit vorsichtig resuspendiert und 3 mal mit je 2ml eiskalter Fixierlösung [Methanol/Eisessig(3:1)] durch tropfenweise Zugabe versetzt, anschließend bei 500g präzipitiert. Der Überstand wurde jeweils abgesaugt.

Hiernach wurde das Präzipitat in 0,5-1ml Fixierlösung aufgenommen und mit einer Pasteurpipette aus mindestens 30cm Höhe auf einen sauberen Objektträger getropft. Nach dem Eintrocknen konnte die Objektträger in Giemsa Färbelösung (Giemsa stain, GS-500 Sigma) gefärbt und anschließend mit H₂O gewaschen und luftgetrocknet werden. Nach dem Eindeckeln (Entellan NEU,

Merck) konnten bei 40facher Vergrößerung die Chromosomensätze der Zellen untersucht werden. Pro Zellklon wurden je 30 Chromosomensätze ausgezählt und statistisch gemittelt.

6.7 Methoden zur *in vivo* Mutagenese

Hier nicht aufgeführte Arbeitsvorgänge wurden nach Hogan et al. (Hogan, et al. 1986) durchgeführt.

6.7.1 Mäusezucht

Sowohl die die Mäuse der Wildtypstämme CD1 und C57Bl/6, als auch die Tiere der schon bestehenden CGT-defizienten und der weiteren transgenen Linien wurden bei einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus - von 5⁰⁰-19⁰⁰ (beleuchtet) und von 19⁰⁰-5⁰⁰ (Dunkelheit) - gehalten.

6.7.2 Blastozysteninjektion

Blastozysten wurden aus mindestens 4 Wochen alten Weibchen (C57/Bl6) gewonnen, indem ihnen die Uteri 3,5 Tage p.c. entfernt und mit DFH-Medium (DMEM; 10% FCS; 20mM HEPES) ausgespült wurden. Es wurden sowohl superovulierte Weibchen (2 Tage vor der Verpaarung 5U Gonadotropin nach 47h 5U humanes Chorio-Gonadotropin und Verpaarung) als auch unbehandelte Tiere (Einschätzung der Empfängnisbereitschaft durch Östruskontrolle) als Blastozysten-spender verwendet. 12 bis 18h nach der Verpaarung wurden die Weibchen auf das Vorkommen eines vaginalen Pfropfes hin als Spender ausgewählt. Nach der Isolation wurden die Blastozysten in DF Medium (DMEM; 10% FCS) bis zur Injektion im Brutschrank (37°C, 4,8% CO₂) aufbewahrt.

Die Injektion erfolgte in DFH-Medium, wobei jeweils ca. 20 ES-Zellklone auf die innere Zellmasse der Blastozysten abgelegt wurden. Die Operation wurde mittels Mikromanipulatoren (Leitz TypM) unter einem Mikroskop (Leitz Axiovert 10)

durchgeführt, wobei die Druckregulation in der Injektionskapillare durch Mineralölfüllung mit geringem Mediumspiegel und in der Haltekapillare durch ein luftgefülltes System mit geringem Mineralölstand erreicht wurde.

Nach der Injektion wurden die Blastozysten 1-2h in M16 Medium (16xEarle; 0,1M Pyruvat; 100xP/S; 37,5xNaHCO₃; 100mg BSA) gehalten und zu jeweils 5-10 in das Uterushorn einer scheinchwangeren Maus (2,5 Tage p.c.; verpaart mit einem vasktomierten Männchen) reimplantiert.

6.7.3 Mikroinjektion

Die DNA-Mikroinjektion in den männlichen Vorkern von befruchteten Eizellen, wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt(Hogan, et al. 1986). Als Oozytenspender dienten superovulierte Weibchen die 2 Tage vor der Verpaarung mit 5U Gonadotropin und nach 46-48h mit 5U humanem Chorio-Gonadotropin stimuliert und direkt verpaart wurden. Am folgenden Tag wurden die Weibchen auf das Vorkommen eines Vaginalpfropfes hin als Oocytenpender ausgewählt. Die Eier wurden aus der Ampulle des Eileiters präpariert und in M16-Medium (s.o.) bis zur Injektion im Brutschrank (37°C, 4,8% CO₂) aufbewahrt. Die Injektion erfolgte in M2-Medium (Sigma) an einem Mikromanipulatorstand (Leitz TypM) mit einem Mikroinjektor (Eppendorff Typ 5242, Kompressor Jun-Air Modell 6). Die injizierten Eier oder die Zweizellstadien (nach Kultivation über Nacht im Brutschrank) wurden unter dem Mikroskop (Wild/Heerburg) in das Infundibulum einer scheinchwangeren Maus (1Tag p.c.; verpaart mit einem vasktomierten Männchen) reimplantiert.

6.7.4 Herstellung von Haltekapillaren

Haltekapillaren (GC100 T-10, Clark) wurden mit einem Pipette Puller (Kopf Modell 720) gezogen. Für Haltekapillaren wurde für den Spannungswert 18,5 gewählt und die Magneteinstellung auf Null belassen. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde die Kapillare möglichst glatt und gerade gebrochen, so daß ihr Durchmesser dem

der Blastozysten oder Eizellen in etwa entsprach. Nachfolgend wurden die Kapillaren an ihren Spitzen durch anschmelzen um 30-45° gebogen.

6.7.5 Vasektomierte Männchen

Mindestens zwei Monate alte, zuvor nicht verpaarte Männchen wurden, wie in (Hogan, et al. 1986) beschrieben, vasektomiert und konnten nach ca. 14 Tagen Ruhe zur Verpaarung eingesetzt werden.

6.8 Computergestützte Sequenz-Auswertungen

Sequenzanalysen wurden mit Hilfe der Programme Chromas (Technelysium Pty Ltd) und des Wisconsin Sequence Analysis Package (Accelery's früher Genetics Computer Group Inc.) auf dem Unix Rechner GENDB des Rechenzentrums der Universität Köln durchgeführt. Benutzte Sequenzdatenbanken waren Swiss Prot, EMBL-Bank und GeneBank. Weiterhin wurden Sequenzanalysen mit den Programmen *MatInspector* (Quandt, et al. 1995), *PromoterInspector* (*Genomatix*) und *Swiss Modell Expasy* (Schwede, et al. 2003) durchgeführt. Strukturvorhersagen für die verschiedenen CGT Fragmente wurden mit SOUSI (http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui_submit.html) durchgeführt.

6.9 Material

Geräte

Brutschränke
DNA-Thermal-Cycler
ELISA-Reader EAR 400AT
Gene Pulser
Image Quant Software
Kühlzentrifuge J2HS
5417 R
Mikro Rapid/K
Laborzentrifuge Sorvall MC 12V
Biofuge A
Phosphorimager 445 SI
Photometer PMQII
Mikroskope Axiovert

sterile Werkbank Lamin Air HA 2448 GS
Wasserbäder
Laborwaage Basic
Feinwaage Mettler
Giessen

Medien, Antibiotika und Supplemente

Ampicillin
Bacto Trypton
LB-Medium

Chloramphenicol (CA)
Cymeven (Gancyclovir)
DMSO
DMEM
Doxyzyklin
ESGRO™ (LIF)
Foetales Kälberserum (FCS)
Gelatine
Geneticin G418
Glutamin
Kanamycin
2-Mercaptoethanol
Mitomycin C
Natriumpyruvat
Nicht essentielle Aminosäuren
Penicillin
Streptomycin
Tunicamycin

Zellkulturmaterial

Heraeus
Perkin Elmer
SLT Labinstruments
Biorad
Molecular Dynamics
Beckmann
Eppendorf
Hettich
DuPont
Heraeus Christ
Molecular Dynamics
Zeiss
Zeiss

Heraeus
Köttermann
Sartorius
Spoerhase AG

Serva
DIFCO
nach Sambrook et
al.
Merck
Syntex GmbH
Sigma
Biochrom
Sigma
GIBCO BRL
GIBCO BRL
Sigma
GIBCO BRL
Merck
Sigma
Sigma
Sigma
Biochrom
Biochrom
Biochrom
Biochrom
Sigma

Elektroporations-Küvetten 0,4cm	Biorad
Kulturschalen	Costar
Einfrierröhrchen	Nunc
Chamber Slides	Falcon
Hormone:	
Gonadotropin (GT)	Sigma
human Chorionic Gonadotropin (hCG)	Sigma
Antikörper:	
ECMA-7	R. Kemler, Freiburg
anti rat IgG FITC Konjugat	Sigma
anti mouse IgM FITC Konjugat	Sigma
anti rabbit IgG Cy3 Konjugat	Sigma
anti rabbit IgG alkalische Phosphatase(AP) Konjugat	Sigma
anti rabbit IgG Peroxidase Konjugat	Sigma
anti rat IgG Cy2	Sigma
anti mouse IgG Cy2	Sigma
anti mouse IgG FITC	Sigma
BIP(GRP glucose regulated Protein 78 - ER Marker)	BD Bioscience
P58	(Lahtinen, et al. 1999)
Isotope:	
[α - ³² P]dATP (3000 Ci/mmol, 0,02 μ Ci/ μ l)	Amersham
[α - ³² P]dCTP (3000 Ci/mmol, 0,02 μ Ci/ μ l)	Amersham
[¹⁴ C]Chloramphenicol	Amersham
[U- ¹⁴ C]UDP-Galaktose (309,6 mCi/mmol, 0,02 μ Ci/ μ l)	Amersham
L-[U - ¹⁴ C]Serin (151mCi/mmol, 0,05 μ Ci/ μ l)	Amersham
Molekularbiologische und biochemische Kits	
Ni NTA Superflow	Quiagen
NucleoSpin Extract 2 in 1	Macherey-Nagel
Quiaex Agarose Gel Extraction Kit	Quiagen
Random Primed DNA Labeling Kit	Boehringer Mannheim
Talon Metal affinity resin	Clontech Laboratories, Inc.
Enzyme	
Alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer Mannheim
Endoglykosidase F	Boehringer Mannheim
Klenow-Polymerase	Boehringer Mannheim
Lysozym (Hühnereiweiß)	Boehringer Mannheim
Proteinase K	Merck
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim
	GIBCO BRL
	Merck
	New England Biolabs
Ribonuklease A (RNase A)	Boehringer Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	GIBCO BRL
T ₄ -DNA-Ligase	Boehringer Mannheim

Trypsin

Life Technologies

Chromatographie-, Filter- und Filmmaterialien

Agarose für Elektrophoresen

Biogel P30

GeneScreenPlus™

X-OMAT AR Filme

SuperRX Fuji Safelight Glass No.8U

P81 Membranen

GIBCO BRL

Biorad

NEN

Kodak

Fujifilm

Whatman

Chemikalien

Acrylamid

Bisacrylamid

Bromphenolblau

Biorad

Biorad

Merck

Fluka

Pharmacia

Sigma

Merck

Gerbu

Fluka

Fluka

Gerbu

Paesel+Lorey GmbH

SIGMA

verschiedene

Dextransulfat

Ethidiumbromid

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

IPTG

Methylenblau

TEMED

x-Gal (2% in DMF)

Tris

Dithiothreitol (DTT)

andere Chemikalien (p.A. oder p.p.A.)

Nukleosiddtriphosphate

dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Boehringer Mannheim

Nukleinsäuren

Heringssperma -DNA

Molekülmassenmarker 1kb-Leiter

Boehringer Mannheim

GIBCO BRL

Vektoren

pBlueskript II SK+

pBS185

pBS246

pGem30

Stratagene

B. Sauer

B. Sauer

H. Gu und K.

Rajewsky

Genetisches Institut

Universität zu Köln

Invitrogen (TA-

Kloning-Kit)

Novagene

T. Genetisches Institut

Universität zu Köln

(Tybulewicz, et al.

pCR™2.1

pET 22b+

pPGKCrebpa

Promega

Invitrogen

pPNT

1991)

pGEM™3z

pcDNA3

pRc/CMV

Invitrogen

Organismen

Bakterienstämme:

DH5 α
BL21pLysS
BL21pLysSStar
294Cre

Laborpräparation
Novagene
Invitrogen
Laborpräparation

(Buchholz, et al. 1996)

Embryonale Stammzell-Linien:

MP111(129Sv)
R1(129/Jx129/SvCP)

A. Nagy, S. Lunenfeld
Research Inst.
Toronto
Rockefeller
University
New York
Memorec
T. Braun, Halle

CJ7(129/SvJ)

HM1(129P2/OlaHsd)
V8.1(129SvxFVB)

Die Nomenklatur des genetischen Hintergrundes der ES Zellen bezieht sich auf die Veröffentlichung von J.Corrigan(Corrigan 2003) auf den Seiten der Internetressourcen der Jackson Laboratories.

auf den Seiten der

Embryonale Fibroblasten (Feederzellen)

MTK3
Hek293 Zellen
Olineu Zellen

Laborpräparation
(Graham, et al. 1977)
J. Trotter, Heidelberg
(Trotter und

Schachner 1989)

Mäuse:

CD-1
C57Bl/6J

CHARLES RIVER
CHARLES RIVER

7 Anhang

7.1 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide CP1, CP4R, CP5, CP5R, CP7R, CP9, CP9R, CP14, CP14R, CP41, CP42R, CP32, CP34, CP34R wurden von D. Boison, S. Schulte und A. Bosio zur Sequenzierung der CGT-cDNA der Ratte und zur Sequenzierung des *targeting* Konstruktes hergestellt und in dieser Arbeit benutzt.

Für die Antikörpersynthese und die Sequenzierung der verschiedenen Konstrukte wurden folgende Oligonukleotide von der rnCGT-cDNA und den Subklonen pMCGT7 und pMCGT20 und anderen in den oben genannten Datenbanken verfügbaren Sequenzen abgeleitet. Die Bezeichnungen sense(s) und antisense(as) gelten in Bezug auf die Orientierung des jeweiligen Gens.

Name	Sequenz (5' - 3')	Herleitung	Lage
Exlas TM=67,2°C	CCCAGACCATACTATA TATGGGCTGGC	mcgt ExonI	741-713 bp 5' wärts des Transkriptionsstarts
Exls TM=62,8°C	GAAAAACACCTATTTG GGAACCTTATGACTA	mcgt ExonI	517-547bp 3' wärts des Transkriptionsstarts
5'NeoATG TM=74,3	AAGAACGGAGCCGGT TGCGCCTAC	Neobox aus pPNT	560-588 pPNT
3'Neos TM=80,3°C	GCGCATCGCCTTCTCT CGCCTTCTTGACG	Neobox aus pPNT	1324-1352 pPNT
pMCGT20as TM=65,4°C	CTCTAGAAGTAGTGGA TCCCCCGGG	mcgt IntronI	326-297 in pMCGT20T7.seq
cgtCterm3 TM=60,8°C	CTCGAGTTTTACCTTTT TTTCATGTTTAATATG	rnctg cDNA	1746-1714 in rnCGT.dat
cgtCterm5 TM=58,0°C	CATATGAAATTTATCTA TAGAAAAGTCAAAAAG	rnctg cDNA	1600-1631 in rnCGT.dat
3'XhoICGTtoTMH TM = 68,7°C	CTCGAGAAAATACTGA CAGAAGGAGATCTGAT G	rnctg cDNA	1513-1545 in rnCGT.dat
Ndecgtolok TM=61,9°C	CATATGAAAATCATCAT TGTGCCGCCA	rnctg cDNA	175-201 in rnCGT.dat
EGFPas TM= 72,2°C	GGTGAACAGCTCCTCG CCCTTGCTCACCAT	EGFP Sequenz	97-126 in pEGFP1
Ubi3sense TM= 64,9°C	GTAAATTGTCCGCTAA ATTCTGGCC	Humaner ubiquitin Promoter aus pUB6/V5-His	1181-1205 in pubiC
MBPAs TM=64,6°C	CCACGGTGAGGAATAA GATCTGGT	MBP Promoter	43-20 in MBPPromoter.seq
MBPs TM=67,2°C	TTCAAAGACAGGCCCT CAGAGTCC	MBP-Promoter	1286-1309 in MBPPromoter.seq
cgtExI3as TM=67,5°C	CTCCACAGGAGCATGA AATCTCGAG	m 5'utrl cgt	772-796 in 1CP14R_CP4R.rev
cgtIN5s TM=68,1°C	CTCGAGGTCGACGGT ATCGATAAGC	m 5'utrl cgt	29-53 in pMCGT7a
ExI3'asn TM=	CTCGAGAAAGACAACC AGAAAATGACTTAGAA C	m 5'utrl cgt	726-758in 1CP14R_CP4R.rev
cgt3kb3' TM=58,1°C	ATTCTGTAGAATTTTAC CTCACAGG	m 3'utrl cgt	608-632 in 2TAcgtpCR2M13-3.seq

cgt3kb5' TM=67,9°C	TTGCTCCAGCCTGGCC ATACATCCC	m 5'utrl cgt	1028-1052 in 2TAcgtM13RCp34.seq
Cgt3kb3xho TM=59,1°C	CTCGAGTATGTCTAAA TATAGTTTGTGTTG	m 5'utrl cgt	1094-1123 in 2TAcgtpCR2M13-3.seq
Cgt3kb5xho TM=79,5°C	CTCGAGTTGCTCCAGC CTGGCCATACATCCC	5'utrl cgt Maus	1022-1052 in 2TAcgtM13Cp34.seq
Cgt5utrlsn TM=69,5°C	GCAAAAGCCTTGTGGC ACAGGGGACAC	5'utrl cgt Maus	1381-1407 in cgt5utrl. seg
Cgt5utrl5asn TM=63,0°C	AAATGTTGGCTTGGGC ATTCTACC	5'utrl cgt Maus	1381-1405 in 2TAcgtpCR2M13-3.seq
CGTs TM = 53,2°C	GAAATTCACAAGGATC AACC	rncgt cDNA	1408-1427 in rncgt.dat
CGTas TM = 55,3°C	GTCCATTA ACTGTGCT ATGC	rncgt cDNA	1650-1669 in rncgt.dat
Cres TM =89,1°C	CCGCGGCCGCGTCGA CCATGGCCAATTTACT GACCGTA	T.Uschkureit(Usch kureit 2000)	pBS185
Creas TM =79,4°C	CTAGGGCCCCTAACTA GTATCGCCATCTTCCA GCAGGC	T.Uschkureit(Usch kureit 2000)	pBS185
EGFPs TM =77,9°C	TGACCTACGGCGTGCA GTGCTTCAGCC	pEGFP1	pEGFP1
EGFPas TM =77,9°C	ATGCCGAGAG TGATCCCGGCGGC	pEGFP1	pEGFP!
Ehoxcode-s TM = 65,6°C	AAGGAAAAGTTGAATG GTGGGAAGAC	af265350.mus	171-196 in af265350.mus
Ehoxcode-as TM = 71,1°C	GCAGAATCACTTCATC CGTGCAAGAGG	af265350.mus	588-563 in af265350.mus
Flk1s TM = 58,8°C	GATGCCXXCTCCCTT TGA	(Jackson, et al. 2002)	
Flk1as TM = 59,8°C	CGAAAGACCACACCAT XGCTCT	(Jackson, et al. 2002)	
GAPDHs TM = 62°C	GAGCTGAACGGGAAC CTCAC	m32599.mus	707-726 in m32599.mus
GAPDHas TM = 61,5°C	CACCACCCTGTTGCTG TAGC	m32599.mus	1015-996 in m32599.mus
GATA1s TM = 61,4°C	GTCAGAACCGGCCTCT CATC	(Jackson, et al. 2002)	
GATA1as TM = 58,8°C	CCATGGGCCTTCACTT TGG	(Jackson, et al. 2002)	
mcgtRTs TM = 55,9°C	ATGAAGTCTTACACTC CATATTC	x92122.mus	2053-2031 in x92122.mus
mcgtRTas TM = 53,1°C	TTTTTCATTTTACCTTC TTTTCATG	x92122.mus	2053-2031 in x92122.mus
Oct-4s TM = 61,9°C	GCAACTCAGAGGGAA CCTCCT	Oct-4gen X52437.mus	246-266 in X52437.mus
Oct-4as TM = 62°C	TCTCCA ACTTACAGGC ATTG	Oct-4gen X52437.mus	246-266 in X52437.mus
RTrtTAs TM = 62,2°C	AGAAGCTTGGTGTAGA GCAGCC	pUHG17-1	2411-2432 in induzCREantisnese.seq
RTrtTAas TM =65,8	ATCCTCGCGC CCCCTACCCA CC	pUHG17-1	1506-1527 in induzCREantisnese.seq
Sc1+ TM =55,9°C	GTCCAATTTA CTGACCGTAC AC	Neil Smyth	487-508 in CREgen.seq
Sc3- TM =66,6°C	CTGTC ACTTG GTCGTGGCAG C	Neil Smyth	793-813 in CREgen.seq

7.2 Abkürzungen:

aa	<i>amino acid</i>
AP	alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
β-Gal	β-Galactosidase
β-Geo	Fusionsprotein aus β-Galactosidase und Neomycin Phosphotransferase
CAT	Chloramphenicol Acyltransferase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIP	alkaline phosphatase from calf intestine
cpm	counts per minute
Cre	causes recombination Recombinase aus dem PhagenP1
DABCO	<i>1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
g	Erdbeschleunigung = $9,81 \text{ m/sec}^2$
GalC	Galactocerebroside
Ganc	Gancyclovir
(E)GFP	(enhanced) <i>green flourescent protein</i>
hCMV	<i>human Cytomegalovirus</i>
HFA-GalC	<i>α-hydroxy fatty acids</i> GalC
HEPES	2[-4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl(1)]-ethansulfonsäure
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
LIF	<i>Leukaemia inhibitory factor</i>
loxP	<i>locus of X over P1</i> , Cre Erkennungssequenz
M	Molar
min	Minute
mRNA	messenger RNA
neo	Neomycin Phosphotransferase
neo-box	Neomycin Phosphotransferase-Gen mit Promotor
NFA-GalC	<i>non-Hydroxylated fatty acids</i> GalC
NIS	<i>non immune serum</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
p	post natal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
p.c.	post coitum
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PNS	peripheres Nervensystem
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverser tet Transaktivator
SDS	<i>Sodium -n- dodecylsulfate</i>
sGalC	Sulfatide
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
tk	Thymidin Kinase
tk-box	Thymidin Kinase-Gen mit Promotor
Tris	tris-(Hydroxymethyl)-aminoethan
tTA	tet Transaktivator
U	Unit, Einheit für die Enzymaktivität
UDP	Uridin-di-Phosphat
ÜN	über Nacht
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.3 Sequenzen:

7.3.1 CGT Expressionsvektoren

Angegeben sind jeweils die codierenden Sequenzen in der multiple cloning site mit der zugehörigen Proteinsequenz im Einbuchstabencode (fett unterlegt)

7.3.1.1 C-term:

```

      XbaI                               NdeI
      |                                 |
5161 CCTCTAGAAATAAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATTTATCTATA 5220
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      GGAGATCTTTATTA AAAACAAATTGAAATTCTTCCTCTATATGTATACTTTAAATAGATAT
      S R N N F V * L * E G D I H M K F I Y R
      GAAAAGTCAAAAGtCTGTGTTCTAGGAGTACGCACAGCACAGTTAATGGACACTACCAAA
5221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5280
      CTTTTCAGTTTTTCaGACACAAGATCCTCATGCGTGTCTGTCGTCATTACCTGTGATGGTTT
      K V K S L C S R S T H S T V N G H Y Q N
      ATGGAATCCTCAATGGCAGATACAAAGGAAATGGTCATATTAACATGAAAAAAGGTAA
5281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5340
      TACCTTAGGAGTTACCGTCTATGTTTCCTTTACCAGTATAATTTGTACTTTTTTTCCATT
      G I L N G R Y K G N G H I K H E K K V K
      XhoI
      |
5341 AACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAG 5400
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TTGAGCTCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTACTCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTTTCCTTC
      L E H H H H H H * D P A A N K A R K E A

```

7.3.1.2 N-term:

```

      XbaI                               NdeI
      |                                 |
5161 CCTCTAGAAATAAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATCATTGTGCCGC 5220
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      GGAGATCTTTATTA AAAACAAATTGAAATTCTTCCTCTATATGTATACTAGTAACACGGCG
      S R N N F V * L * E G D I H M I I V P P
      CAATTATGTTTGAAAAGCCATTTGTACATTTTCAAGACACTAGCATCAGCCTTGCACGAGA
5221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5280
      GTTAATACAAACTTTTCGGTAAACATGTAAAAGTTCTGTGATCGTAGTCGGAACGTGCTCT
      I M F E S H L Y I F K T L A S A L H E R
      GAGGCCATCACACTGTGTTCCCTCCTCAGAAAGGCAGAGACATTGACCCATCTAATCACT
5281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5340
      CTCCGGTAGTGTGACACAAGGAGGAGAGTCTTCCGTCTCTGTAAC TGGGTAGATTAGTGA
      G H H T V F L L S E G R D I D P S N H Y
      ACAGCCTCCAGCGATACCCAGGGATCTTCAACAGTACCACCTCAGATGCTTTCCTGCAGT
5341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5400
      TGTCGGAGGTCGCTATGGGTCCCTAGAAGTTGTCTATGGTGGAGTCTACGAAAGGACGTCA
      S L Q R Y P G I F N S T T S D A F L Q S

```

CTAAAATGCGGAATATTTTCTCTGGAAGATTGACAGCAGTTGAACTGGTTGACATACTGG
 5401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5460
 GATTTTACGCCTTATAAAAAGAGACCTTCTAACTGTCGTCAACTTGACCAACTGTATGACC
K M R N I F S G R L T A V E L V D I L D
 ATCACTATACTAAGAATTGTGACATGATGGTTGGCAACCAAGCCCTAATCCAGGGTTTGA
 5461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5520
 TAGTGATATGATTCTTAACACTGTACTACCAACCGTTGGTTCGGGATTAGGTCCCAA
H Y T K N C D M M V G N Q A L I Q G L K
 AAAAAAGAAAAGTTTGACCTGCTACTGGTTGACCCCAATGATATGTGTGGATTTGTGATCG
 5521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5580
 TTTTCTTTTCAAACCTGGACGATGACCAACTGGGGTTACTATACACACCTAAACACTAGC
K E K F D L L L V D P N D M C G F V I A
 CTCATCTTTTAGGCGTTAAGTATGCTGTGTTTTCTACTGGCCTTTGGTATCCTGCTGAAG
 5581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5640
 GAGTAGAAAATCCGCAATTCATACGACACAAAAGATGACCGGAAACCATAGGACGACTTC
H L L G V K Y A V F S T G L W Y P A E V
 TCGGAGCGCCTGCTCCTTTAGCTTATGTCCAGAGTTTAACTCACTCCTCACAGACCGCA
 5641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5700
 AGCCTCGCGGACGAGGAAATCGAATACAGGGTCTCAAATGAGTGAGGAGTGTCTGGCGT
G A P A P L A Y V P E F N S L L T D R M
 TGAACCTCCTGGAAAAGGATGAAAATACAGGCGTTTACCTCATATCCAGAATGGGGGTTA
 5701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5760
 ACTTGAAGGACCTTTCTACTTTTTATGTCCGCAAATGGAGTATAGGTCTTACCCCAAT
N F L E R M K N T G V Y L I S R M G V S
 GCTTTCTGGTCTCTCCGAAATATGAAAAGATAATGCAGAAGTACAACCTGCTCCCTGCAA
 5761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5820
 CGAAAGACCAGAAAGGCTTTATACTTTCTATTACGTCTTCATGTTGGACGAGGGACGTT
F L V L P K Y E R I M Q K Y N L L P A K
 AGTCCATGTATGATTTGGTTCATGGGTCCAGCTTGTGGATGTTATGTACTGACGTAGCAC
 5821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5880
 TCAGGTACATACTAAACCAGTACCCAGGTCGAACaCCTACAATACATGACTGCATCGTG
S M Y D L V H G S S L W M L C T D V A L
 TGGAGTTTCCAAGGCCACCCTGCCTAACGtTGTATATGTTGgAGgAATCCTAACAAAGC
 5881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5940
 ACCTCAAAGGTTCCGGGTGGGACGGATTGCaACATATAACAACcTCcTTAGGATTGTTTCG
E F P R P T L P N V V Y V G G I L T K P
 CGGCCAGCCCAGTCCAgAAGATCTGCAgAGGTGGGTAGATGGTGTCTCAGGAGCATGGCT
 5941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6000
 GCCGGTCCGGGTGACGGTcTTCTAGACGTcTCCACCCATCTACCACGAGTCTCGTACCGA
A S P L P E D L Q R W V D G A Q E H G F
 TTGTCTGGTATCTTTTGgAGCTGGTGTCAAGTATCTGTGAGAAGACATTGCTAACAAAC
 6001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6060
 AACAGGACCATAGAAAACcTCGACCACAGTTCATAGACAGTCTTCTGTAACGATTGTTTG
V L V S F G A G V K Y L S E D I A N K L
 TGGCAGGAGCTCTGGGGAGATTGCCTCAGAAAGTGAATTTGGAGGTTTTCTGGAACCAAAC
 6061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6120
 ACCGTCCTCGAGACCCCTCTAACGGAGTCTTTCACTAAACCTCCAAAAGACCTTGGTTTG
A G A L G R L P Q K V I W R F S G T K P
 CAAAGAACCTAGGAAACAACACTAAGCTCATAGAATGGTTACCTCAAATGACCTGCTTG
 6121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6180
 GTTCTTGATCCTTTGTTGTGATTGAGTATCTTACCAATGGAGTTTTACTGGACGAAC
K N L G N N T K L I E W L P Q N D L L G
 GCCATTCAAACATCAGAGCCTTCTAAGCCATGGTGGTTTGAACAGTATATTTGAAACTA
 6181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6240
 CGGTAAGTTTGTAGTCTCGGAAGGATTCCGTACCACCAAACCTTGTCATATAAACTTTGAT
H S N I R A F L S H G G L N S I F E T M
 TGTATCATGGTGTCCCTGTAGTAGGAATCCCACTCTTGGAGACCATTATGATACTATGA
 6241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6300
 ACATAGTACCACAGGGACATCATCCTTAGGGTGAGAAACCTCTGGTAATACTATGATACT
Y H G V P V V G I P L F G D H Y D T M T

1501 AAAGCCATAA ATACATTA AAA AAACCCTAAA AAGCCATGTT TTTCTTTNCA
1551 AGGTTGACTG CTTATTTTAC CCTGTATAAAA CCTTGTAATT GGAGAAAAAT
1601 TCACTGTGGA AACAATGTTT CTTATAGATT TGTTTCTAAA TCTATGTAGT
1651 ATGCCAAGCA ACATTTAATG TTTATAACAT TTATAGAATG TACCATTTTT
1701 ATTTTGGGGG AGAGTAAGAG TGGAAACAGC TAAAAATACA GTATGTTTAT
1751 TTATTGGAAG AAGCCAGCTT ATTAAGCATA TGATTATTTT TGATTAATGC
1801 AGAGTTTAAA TATGGGGAAA GTATATTTGT TACAATTATA TTTAGATGGT
1851 GGAAATTTGG CTAAAGAATA TGGCTAGTAT ACAGTCATGA GCAAAAAGTAC
1901 ACAGGTGAAC CATTATTTGT CAAGTATGTC TAAATATAGT TTGTGTTGTT
1951 CTTGAAATC AAAGTGTTCA GTTTCTGTGC CAAACTCTC AGAATCTTTT
2001 TCTCTTTGGG GTCTAACCTA GAGCTTAGAT TAATTATATT GAATGACTT
2051 TGGTGTACAG CTACTACCTT TCCTACACAT AATGGTGTTT ATTTCTCACT
2101 AATGGGGGGG TAAGACTTGG TACTTAACCT GTTAACCAGA AAGGGTAGGA
2151 GAAATGTCTG TCTTGAAGTG TACATCCATA TGCCTTGAGG TTGATACTCT
2201 GGTGAAGGC AGCACATATA TAGTATGGTC TGGGACTTAC TCATTCACCA
2251 AATTCTTTTT TCAAGAGGCT ATTGGAGTTT CTTTTGAGAG TCATTCATTT
2301 AGATGATGCC CTGAATTAAC ACAATGCATA ACAAATAAAA TGTTGCATGA
2351 ATATAGACCA TCAGAATATT TAGTGTACTT AGTGATAAAA AACATAATA
2401 AAGGTAACCT TACCTGTGAG GTAAAATTCT ACAGAATTAT TGAAGTACTA
2451 CTTAATTTTT TTGAAGTGTG TCCTCACTTG GAAACCTTTA ATCACAATTT
2501 GGAATATTAC CACTAAATTA AAATGATTTA AGTAACAATT GTATACTGAT
2551 ATACCTGAAA ATTAATAATTG CCAATTTTCC TGGAATTAAC ATGACATTTA
2601 TTAAGAATAA GAATTTATTA GTACTGTTTC ATAGGTAGTA TTCAAAGAAG
2651 TGATATTAAG TGTCTTTAGG CTTTTTGGAA GTTATTGTCT GGGTAAAAAG
2701 TTTTCTTTTA CTGATAAAGT TATATATTTT CATATTGGTG TTAATATGCA
2751 TTATATATCA GTTTCTTCCA ATTCTATCCA TAATAATATT GTTGTTTTAT
2801 TTAAGTGACG CGTCTTTGGA ATACATATTA GGCTTATTTT TTTTAAAGA
2851 ATTGGATCAT TAGATATTTT AGAAAATAA CTATTTGCGA TTGTTTTGAA
2901 TGGCCACCCT CTATAATGTT CTAAGTCATT TTCTGGTTGT CTTTCTCGAG
2951 AAGCCGAATT CTGCAGATAT CCATCACACT GGCGGCCGCT CGAGCATGCA
3001 TCTAGAGGGC CCAATTCGCC CTATAGTGAG TCGTATTACA ATTC

8 Literatur

Amit, M., et al. (2004) Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells *Biol Reprod*, 70, 837-45. Epub 2003 Nov 19.

Araki, K., et al. (1995) Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 160-4.

Awatramani, R., et al. (2000) Gtx, an oligodendrocyte-specific homeodomain protein, has repressor activity *J Neurosci Res*, 61, 376-87.

Awatramani, R., et al. (1997) Evidence that the homeodomain protein Gtx is involved in the regulation of oligodendrocyte myelination *J Neurosci*, 17, 6657-68.

Bansal, R. und Pfeiffer, S.E. (1989) Reversible inhibition of oligodendrocyte progenitor differentiation by a monoclonal antibody against surface galactolipids *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6181-5.

Baron, U. und Bujard, H. (2000) Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances *Methods Enzymol*, 327, 401-21.

Baron, U., et al. (1997) Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential *Nucleic Acids Res*, 25, 2723-9.

Benjamins, J.A. und Dyer, C.A. (1990) Glycolipids and transmembrane signaling in oligodendroglia *Ann N Y Acad Sci*, 605, 90-100.

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.

Blesch, A. (2004) Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer *Methods*, 33, 164-72.

Bligh, E.G. und Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification *Can J Med Sci*, 37, 911-7.

Boggs, J.M. und Wang, H. (2001) Effect of liposomes containing cerebroside and cerebroside sulfate on cytoskeleton of cultured oligodendrocytes *J Neurosci Res*, 66, 242-53.

Bosio, A. (1997) UDP-Galactose: Ceramid-Galactosyl-Transferase Klonierung der Gene von Mensch und Maus, Erstellung eines Mausmodells durch homologe Rekombination und funktionelle Analyse der galactocerebroside im myelin des ZNS und PNS Dissertation,

Bosio, A., et al. (1998a) Composition and biophysical properties of myelin lipid define the neurological defects in galactocerebroside- and sulfatide-deficient mice *J Neurochem*, 70, 308-15.

Bosio, A., et al. (1996a) The human gene CGT encoding the UDP-galactose ceramide galactosyl transferase (cerebroside synthase): cloning, characterization, and assignment to human chromosome 4, band q26 *Genomics*, 34, 69-75.

Bosio, A., et al. (1996b) Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13280-5.

Bosio, A., et al. (1996c) Molecular cloning and characterization of the mouse CGT gene encoding UDP-galactose ceramide-galactosyltransferase (cerebroside synthetase) *Genomics*, 35, 223-6.

Bosio, A., et al. (1998b) Galactosphingolipids and axono-glia interaction in myelin of the central nervous system *Cell Tissue Res*, 292, 199-210.

Bou Khalil, M., et al. (2001) Polymorphic phases of galactocerebroside: spectroscopic evidence of lamellar crystalline structures *Biochim Biophys Acta*, 1512, 158-70.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem*, 72, 248-54.

Bradley, A., et al. (1984) Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines *Nature*, 309, 255-56.

Branda, C.S. und Dymecki, S.M. (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice *Dev Cell*, 6, 7-28.

Brodsky, J.L., et al. (1993) Reconstitution of protein translocation from solubilized yeast membranes reveals topologically distinct roles for BiP and cytosolic Hsc70 *J Cell Biol*, 120, 95-102.

Buchholz, F., et al. (1996) A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs *Nucleic Acids Res*, 24, 3118-9.

Buehr, M., et al. (2003) Rapid loss of Oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines *Biol Reprod*, 68, 222-9.

Burcin, M.M., et al. (1998) A regulatory system for target gene expression *Front Biosci*, 3, c1-7.

Burger, K.N., et al. (1996) Topology of sphingolipid galactosyltransferases in ER and Golgi: transbilayer movement of monohexosyl sphingolipids is required for higher glycosphingolipid biosynthesis *J Cell Biol*, 133, 15-28.

- Buschard, K., et al. (1994) Sulphatide in islets of Langerhans and in organs affected in diabetic late complications: a study in human and animal tissue *Diabetologia*, 37, 1000-6.
- Butters, T.D., et al. (2003) Small-molecule therapeutics for the treatment of glycolipid lysosomal storage disorders *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358, 927-45.
- Capecchi, M.R. (1989) Altering the genome by homologous recombination *Science*, 244, 1288-92.
- Capecchi, M.R. (1994) Gezielter Austausch von Genen Spektrum der Wissenschaft, 5, 44-52.
- Coetzee, T., et al. (1996a) Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability *Cell*, 86, 209-19.
- Coetzee, T., et al. (1996b) Molecular cloning, chromosomal mapping, and characterization of the mouse UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase gene *Genomics*, 35, 215-22.
- Costantino-Ceccarini, E. und Morell, P. (1973) Synthesis of galactosylceramide and glucosylceramide by mouse kidney preparations *J Biol Chem*, 248, 8240-6.
- Cubitt, A.B., et al. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins *Trends Biochem Sci*, 20, 448-55.
- Dalby, B., et al. (2004) Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications *Methods*, 33, 95-103.
- DePamphilis, M.L., et al. (1988) Microinjecting DNA into mouse ova to study DNA replication and gene expression and to produce transgenic animals *Biotechniques*, 6, 662-80.
- DeVries, G.H. und Norton, W.T. (1974) The fatty acid composition of sphingolipids from bovine CNS axons and myelin *J Neurochem*, 22, 251-7.
- Dittmer, J.C. und Lester, R.L. (1964) A Simple, Specific Spray for the Detection of Phospholipids on Thin-Layer Chromatograms *J Lipid Res*, 15, 126-7.
- Doerflinger, N.H., et al. (2003) Inducible site-specific recombination in myelinating cells *Genesis*, 35, 63-72.
- Dotevall, L., et al. (1988) The use of doxycycline in nervous system *Borrelia burgdorferi* infection *Scand J Infect Dis Suppl*, 53, 74-9.
- Dotevall, L. und Hagberg, L. (1989) Penetration of doxycycline into cerebrospinal fluid in patients treated for suspected Lyme neuroborreliosis *Antimicrob Agents Chemother*, 33, 1078-80.

- Dotevall, L., et al. (1999) Successful oral doxycycline treatment of Lyme disease-associated facial palsy and meningitis
Penetration of doxycycline into cerebrospinal fluid in patients treated for suspected Lyme neuroborreliosis
The use of doxycycline in nervous system *Borrelia burgdorferi* infection *Clin Infect Dis*, 28, 569-74.
- Duch, M., et al. (1990) Determination of transient or stable neo expression levels in mammalian cells *Gene*, 95, 285-8.
- Dyer, C.A. (1993) Novel oligodendrocyte transmembrane signaling systems. Investigations utilizing antibodies as ligands *Mol Neurobiol*, 7, 1-22.
- Dyer, C.A. und Benjamins, J.A. (1991) Galactocerebroside and sulfatide independently mediate Ca²⁺ responses in oligodendrocytes *J Neurosci Res*, 30, 699-711.
- Dymecki, S.M. (1996) Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6191-6.
- Eggan, K., et al. (2001) Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6209-14. Epub 2001 May 1.
- Elder, J.H. und Alexander, S. (1982) endo-beta-N-acetylglucosaminidase F: endoglycosidase from *Flavobacterium meningosepticum* that cleaves both high-mannose and complex glycoproteins *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 4540-4.
- Fujimoto, H., et al. (2000) Requirement of seminolipid in spermatogenesis revealed by UDP-galactose: Ceramide galactosyltransferase-deficient mice *J Biol Chem*, 275, 22623-6.
- Garbay, B. und Cassagne, C. (1994) Expression of the ceramide galactosyltransferase gene during myelination of the mouse nervous system. Comparison with the genes encoding myelin basic proteins, choline kinase and CTP:phosphocholine cytidyltransferase *Brain Res Dev Brain Res*, 83, 119-24.
- Gieselmann, V., et al. (2003) Gene therapy: prospects for glycolipid storage diseases *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358, 921-5.
- Gimenez, E., et al. (2004) A Transgenic Mouse Model with Inducible Tyrosinase Gene Expression Using the Tetracycline (Tet-on) System Allows Regulated Rescue of Abnormal Chiasmatic Projections Found in Albinism *Pigment Cell Res*, 17, 363-70.
- Golzio, M., et al. (2004) In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression *Methods*, 33, 126-35.
- Gossen, M. und Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5547-51.

Gossen, M. und Bujard, H. (1993) Anhydrotetracycline, a novel effector for tetracycline controlled gene expression systems in eukaryotic cells *Nucleic Acids Res*, 21, 4411-2.

Gossen, M. und Bujard, H. (2002) Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation *Annu Rev Genet*, 36, 153-73. Epub 2002 Jun 11.
Gossen, M., et al. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells *Science*, 268, 1766-9.

Graham, F.L., et al. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5 *J Gen Virol*, 36, 59-74.

Gu, H., et al. (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting [see comments] *Science*, 265, 103-6.

Guex, N. und Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling *Electrophoresis*, 18, 2714-23.

Haas, N.S. und Shipley, G.G. (1995) Structure and properties of N-palmitoleoylgalactosylsphingosine (cerebroside) *Biochim Biophys Acta*, 1240, 133-41.

Hakomori, S. (1990) Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions *J Biol Chem*, 265, 18713-6.

Hanks, M., et al. (1995) Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2 [see comments] *Science*, 269, 679-82.

Hasty, P., et al. (1991) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells *Mol Cell Biol*, 11, 5586-91.

Hendershot, L.M. (2004) The ER Function BiP Is a Master Regulator of ER Function *Mt Sinai J Med*, 71, 289-97.

Hoess, R., et al. (1984) The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site loxP *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 49, 761-8.

Hoess, R.H. und Abremski, K. (1984) Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 1026-9.

Hoess, R.H. und Abremski, K. (1985) Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system *J Mol Biol*, 181, 351-62.

Hogan, B., et al. (1986) Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. New York.

Honke, K., et al. (2002) Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 4227-32.

Huang, C.J., et al. (1999) Expression of green fluorescent protein in oligodendrocytes in a time- and level-controllable fashion with a tetracycline-regulated system Mol Med, 5, 129-37.

Hucho, F. (1982) Einführung in die Neurochemie Weinheim.

Jackson, M., et al. (2002) Cloning and characterization of Ehox, a novel homeobox gene essential for embryonic stem cell differentiation J Biol Chem, 277, 38683-92. Epub 2002 Jun 26.

Jenkins, S.M. und Bennett, V. (2002) Developing nodes of Ranvier are defined by ankyrin-G clustering and are independent of paranodal axoglial adhesion Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 2303-8.

JS, O.B. und Rouser, G. (1964) The fatty acid composition of brain sphingolipids: sphingomyelin, ceramide, cerebroside, and cerebroside sulfate J Lipid Res, 5, 339-42.

Karkkonen, K., et al. (2001) Follow-up of patients treated with oral doxycycline for Lyme neuroborreliosis Scand J Infect Dis, 33, 259-62.

Karlsson, M., et al. (1996) Concentrations of doxycycline and penicillin G in sera and cerebrospinal fluid of patients treated for neuroborreliosis Antimicrob Agents Chemother, 40, 1104-7.

Karlsson, M., et al. (1994) Comparison of intravenous penicillin G and oral doxycycline for treatment of Lyme neuroborreliosis Neurology, 44, 1203-7.

Kemler, R. (1980) Analysis of mouse embryonic cell differentiation Progress in Development Biology,

Kilby, N.J., et al. (1993) Site-specific recombinases: tools for genome engineering Trends Genet, 9, 413-21.

Kimura, M., et al. (1989) Restoration of myelin formation by a single type of myelin basic protein in transgenic shiverer mice Proc Natl Acad Sci U S A, 86, 5661-5.

Klenk, E. (1935) Über die Natur der Phosphatide und anderer Lipide des Gehirns und der Leber bei der Niemann-Pickschen Krankheit. Z.Physiol.Chem., 235, 24-36.

Kolter, T. und Sandhoff, K. (1998) Recent advances in the biochemistry of sphingolipidoses Brain Pathol, 8, 79-100.

Koponen, J.K., et al. (2003) Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2S-M2 shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo Gene Ther, 10, 459-66.

- Koske, D. (1995) Diplomarbeit, Untersuchungen zur Biosynthese der UDP-Galactose: Ceramid-Galaktosyltransferase, University of Cologne.
- Koul, O. und Jungalwala, F.B. (1986) UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase of rat central nervous system myelin during development *Neurochem Res*, 11, 231-9.
- Koul, O., et al. (1988) Synthesis and transport of cerebrosides and sulfatides in rat brain during development *J Neurochem*, 50, 580-8.
- Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs *Nucleic Acids Res*, 15, 8125-48.
- Kuhn, R., et al. (1995) Inducible gene targeting in mice *Science*, 269, 1427-9.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose *J Biochem Biophys Methods*, 10, 203-9.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature*, 227, 680-5.
- Lahtinen, U., et al. (1999) Mapping of structural determinants for the oligomerization of p58, a lectin-like protein of the intermediate compartment and cis-Golgi *Eur J Biochem*, 260, 392-7.
- Lasko, M., et al. (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 6232-6.
- Lazzarini, R.A. (2004) *Myelin Biology and Disorders*
- Ledeen, R.W. und Yu, R.K. (1982) Gangliosides: structure, isolation, and analysis *Methods Enzymol*, 83, 139-91.
- Lewandoski, M. (2001) Conditional control of gene expression in the mouse *Nat Rev Genet*, 2, 743-55.
- Lindeberg, J., et al. (2002) Timing the doxycycline yields different patterns of genomic recombination in brain neurons with a new inducible Cre transgene *J Neurosci Res*, 68, 248-53.
- Liscum, L., et al. (1983) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase: a transmembrane glycoprotein of the endoplasmic reticulum with N-linked "high-mannose" oligosaccharides *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 7165-9.
- Liu, X., et al. (1997) Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission *Dev Dyn*, 209, 85-91.

Lullmann-Rauch, R., et al. (2001) Lysosomal sulfoglycolipid storage in the kidneys of mice deficient for arylsulfatase A (ASA) and of double-knockout mice deficient for ASA and galactosylceramide synthase *Histochem Cell Biol*, 116, 161-9.

Ma, H., et al. (2004) Mouse embryonic stem cells efficiently lipofected with nuclear localization peptide result in a high yield of chimeric mice and retain germline transmission potency *Methods*, 33, 113-20.

Magin, T.M., et al. (1992) A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency *Nucleic Acids Res*, 20, 3795-6.

Mao, X., et al. (2001) Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain *Blood*, 97, 324-6.

Mao, X., et al. (1999) Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5037-42.

Marcus, J., et al. (2000) Effects of galactolipid elimination on oligodendrocyte development and myelination *Glia*, 30, 319-28.

Matthieu, J.M., et al. (1981) Similarities and dissimilarities between two myelin deficient mutant mice, Shiverer and mld *Brain Res*, 214, 219-22.

Meinzinger, S. (1998) Konditionierte Genausschaltung der UDP-Galaktose: Ceramid-Galaktosyltransferase durch homologe Rekombination, Universität zu Köln.

Meinzinger, S. (2004) persönliche Beobachtung

Miura, M., et al. (1989) The promoter elements of the mouse myelin basic protein gene function efficiently in NG108-15 neuronal/glial cells *Gene*, 75, 31-8.

Mizuguchi, H., et al. (2003) Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing the rtTA and tTS expression cassettes in separate genome regions *Hum Gene Ther*, 14, 1265-77.

Monge, M., et al. (1988) Regional and developmental estimations of UDP galactose: ceramide galactosyltransferase activity in the rat brain *Dev Neurosci*, 10, 43-6.

Monteggia, L.M., et al. (2004) Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 10827-32. Epub 2004 Jul 12.

Morell, P. und Radin, N.S. (1969) Synthesis of cerebroside by brain from uridine diphosphate galactose and ceramide containing hydroxy fatty acid *Biochemistry*, 8, 506-12.

Nagy, A., et al. (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8424-8.

- Nave, K.A. und Milner, R.J. (1989) Proteolipid proteins: structure and genetic expression in normal and myelin-deficient mutant mice *Crit Rev Neurobiol*, 5, 65-91.
- Neskovic, N.M., et al. (1981) UDPgalactose: ceramide galactosyltransferase from rat brain *Methods Enzymol*, 71 Pt C, 521-36.
- Neskovic, N.M., et al. (1986) UDPgalactose:ceramide galactosyltransferase of rat brain: a new method of purification and production of specific antibodies *J Neurochem*, 47, 1412-8.
- Neskovic, N.M., et al. (1973) Subcellular and submicrosomal distribution of glycolipid-synthesizing transferases in young rat brain *J Neurochem*, 20, 1419-30.
- Neskovic, N.M., et al. (1974) Purification and Properties of UDP-Galactose:Ceramide Galactosyltransferase from Rat Brain Microsomes *Biochimica et Biophysica Acta*, 334, 309-15.
- Neskovic, N.M., et al. (1976) Brain UDPgalactose: ceramide galactosyltransferase Purification of a catalytically active protein obtained after proteolytic digestion *Biochim Biophys Acta*, 429, 342-51.
- Newburg, D.S. und Chaturvedi, P. (1992) Neutral glycolipids of human and bovine milk *Lipids*, 27, 923-7.
- Nichols, J., et al. (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 *Cell*, 95, 379-91.
- Niemand, C. (1995) Diplomarbeit, UDP-Galaktose: Ceramid-Galaktosyltransferase Heterologe Expression und biochemische Analyse, University of Cologne.
- Niwa, H., et al. (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3 *Genes Dev*, 12, 2048-60.
- Niwa, H., et al. (2002) Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells *Mol Cell Biol*, 22, 1526-36.
- Niwa, H., et al. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells *Nat Genet*, 24, 372-6.
- No, D., et al. (1996) Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3346-51.
- Ogawa, K., et al. (2004) A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells *Genes Cells*, 9, 471-7.
- Olive, M., et al. (1997) A dominant negative to activation protein-1 (AP1) that abolishes DNA binding and inhibits oncogenesis *J Biol Chem*, 272, 18586-94.

- Orban, P.C., et al. (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice Proc Natl Acad Sci U S A, 89, 6861-5.
- Otterbach, B. und Stoffel, W. (1995) Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease) Cell, 81, 1053-61.
- Pascher, I., et al. (1992) Crystal structures of membrane lipids Biochim Biophys Acta, 1113, 339-73.
- Paulson, J.C. und Colley, K.J. (1989) Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type- specific glycosylation J Biol Chem, 264, 17615-8.
- Pease, S., et al. (1990) Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF) Dev Biol, 141, 344-52.
- Perea, J., et al. (2001) Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A Hum Mol Genet, 10, 1007-18.
- Pesce, M., et al. (1998a) In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ
Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation Bioessays, 20, 722-32.
- Pesce, M. und Scholer, H.R. (2001) Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development Stem Cells, 19, 271-8.
- Pesce, M., et al. (1998b) Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation Mech Dev, 71, 89-98.
- Platt, F.M., et al. (2003) Substrate reduction therapy in mouse models of the glycosphingolipidoses Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 358, 947-54.
- Platt, S.G. und Yang, N.S. (1987) Dot assay for neomycin phosphotransferase activity in crude cell extracts Anal Biochem, 162, 529-35.
- Poliak, S., et al. (2001) Localization of Caspr2 in myelinated nerves depends on axon-glia interactions and the generation of barriers along the axon J Neurosci, 21, 7568-75.
- Quandt, K., et al. (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data Nucleic Acids Res, 23, 4878-84.
- Raeber, A.J., et al. (1998) Transgenic and knockout mice in research on prion diseases Brain Pathol, 8, 715-33.

- Raff, M.C., et al. (1978) Galactocerebroside is a specific cell-surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture *Nature*, 274, 813-6.
- Rajewsky, K., et al. (1996) Conditional gene targeting *J Clin Invest*, 98, 600-3.
- Raz, R., et al. (1999) Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2846-51.
- Robbins, J. (1993) Gene targeting. The precise manipulation of the mammalian genome *Circ Res*, 73, 3-9.
- Robertson, E.J. (1991) Using embryonic stem cells to introduce mutations into the mouse germ line *Biol Reprod*, 44, 238-45.
- Sakai, N., et al. (2002) Inducible and brain region-specific CREB transgenic mice *Mol Pharmacol*, 61, 1453-64.
- Sambrook, J., et al. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York.
- Sandhoff, K. (1977) The biochemistry of sphingolipid storage diseases *Angew Chem Int Ed Engl*, 16, 273-85.
- Sandhoff, K. und Klein, A. (1994) Intracellular trafficking of glycosphingolipids: role of sphingolipid activator proteins in the topology of endocytosis and lysosomal digestion *FEBS Lett*, 346, 103-7.
- Sauer, B. (1993) Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase *Methods Enzymol*, 225, 890-900.
- Sauer, B. und Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1 *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 5166-70.
- Sauer, B. und Henderson, N. (1989) Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome *Nucleic Acids Res*, 17, 147-61.
- Schaeren-Wiemers, N., et al. (1995) The UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase: expression pattern in oligodendrocytes and Schwann cells during myelination and substrate preference for hydroxyceramide *J Neurochem*, 65, 2267-78.
- Schagger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa *Anal Biochem*, 166, 368-79.
- Scholer, H.R., et al. (1990) New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4 *Nature*, 344, 435-9.

Schulte, S. und Stoffel, W. (1993) Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 10265-9.

Schwede, T., et al. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server Nucleic Acids Res, 31, 3381-5.

Shimomura, O., et al. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea J Cell Comp Physiol, 59, 223-39.

Siegrist, H.P., et al. (1979) Ceramide-galactosyltransferase and cerebroside-sulphotransferase localisation in Golgi membranes isolated by a continuous sucrose gradient of mouse brain microsomes J Neurochem, 33, 497-504.

Skarjune, R. und Oldfield, E. (1979a) Physical studies of cell surface and cell membrane structure. Determination of phospholipid head group organization by deuterium and phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy Biochemistry, 18, 5903-9.

Skarjune, R. und Oldfield, E. (1979b) Physical studies of cell surface and cell membrane structure. Deuterium nuclear magnetic resonance investigation of deuterium-labelled N- hexadecanoylgalactosylceramides (cerebroside) Biochim Biophys Acta, 556, 208-18.

Skarjune, R. und Oldfield, E. (1982) Physical studies of cell surface and cell membrane structure. Deuterium nuclear magnetic resonance studies of N-palmitoylglucosylceramide (cerebroside) head group structure Biochemistry, 21, 3154-60.

Smith, A.G., et al. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides Nature, 336, 688-90.

Sommer, I. und Schachner, M. (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system Dev Biol, 83, 311-27.

Sprong, H., et al. (1998) UDP-Galactose:Ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum [In Process Citation] J Biol Chem, 273, 25880-8.

Stahl, N., et al. (1994) Isolation, characterization, and expression of cDNA clones that encode rat UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase J Neurosci Res, 38, 234-42.

Stoffel, W. (2001) unveröffentlichte Ergebnisse

Stoffel, W. und Bosio, A. (1997) Myelin glycolipids and their functions Curr Opin Neurobiol, 7, 654-61.

Suwabe, N., et al. (1998) GATA-1 regulates growth and differentiation of definitive erythroid lineage cells during in vitro ES cell differentiation *Blood*, 92, 4108-18.

Swiatek, P.J. und Gridley, T. (1993) Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene *Krox20* *Genes Dev*, 7, 2071-84.

Tadano-Aritomi, K., et al. (2000) Kidney lipids in galactosylceramide synthase-deficient mice. Absence of galactosylsulfatide and compensatory increase in more polar sulfoglycolipids *J Lipid Res*, 41, 1237-43.

te Riele, H., et al. (1992) Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5128-32.

Torres, M. (1998) The use of embryonic stem cells for the genetic manipulation of the mouse *Curr Top Dev Biol*, 36, 99-114.

Towbin, H., et al. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.

Tremblay, P., et al. (1998) Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 12580-5.

Trotter, J. und Schachner, M. (1989) Cells positive for the O4 surface antigen isolated by cell sorting are able to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes *Brain Res Dev Brain Res*, 46, 115-22.

Tybulewicz, V.L., et al. (1991) Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the *c-abl* proto-oncogene *Cell*, 65, 1153-63.

Uschkureit, T. (2000) Struktur-Funktionsanalyse der Myelinmembran von Axonen des zentralen Nervensystems durch gen-Ablation mittels homologer Rekombination *Dissertation*,

van der Bijl, P., et al. (1996) Synthesis of non-hydroxy-galactosylceramides and galactosyldiglycerides by hydroxy-ceramide galactosyltransferase *Biochem J*, 317, 589-97.

van der Putten, H., et al. (1985) Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 6148-52.

van Deursen, J. und Wieringa, B. (1992) Targeting of the creatine kinase M gene in embryonic stem cells using isogenic and nonisogenic vectors *Nucleic Acids Res*, 20, 3815-20.

van Echten, G. und Sandhoff, K. (1989) Modulation of ganglioside biosynthesis in primary cultured neurons *J Neurochem*, 52, 207-14.

- van Echten, G. und Sandhoff, K. (1993) Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation J Biol Chem, 268, 5341-4.
- van Meer, G. und Lisman, Q. (2002) Sphingolipid transport: rafts and translocators J Biol Chem, 277, 25855-8.
- Vogel, R., et al. (2004) A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain Hum Gene Ther, 15, 157-65.
- von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites Nucleic Acids Res, 14, 4683-90.
- von Hoch, L. (2003) Struktur und Funktionsanalyse des Myelin Oligodendrozyten Glykoproteins durch Gen-Ablation mittels homologer Rekombination, Universität zu Köln.
- Voss, A.K., et al. (1997) Germ line chimeras from female ES cells Exp Cell Res, 230, 45-9.
- Wall, R.J. (2001) Pronuclear microinjection Cloning Stem Cells, 3, 209-20.
- Watts, R.W. (2003) A historical perspective of the glycosphingolipids and sphingolipidoses Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 358, 975-83.
- Wegner, M. (2001) Expression of transcription factors during oligodendroglial development Microsc Res Tech, 52, 746-52.
- Wood, S.A., et al. (1993) Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimeras Nature, 365, 87-9.
- Wood, S.A., et al. (1993) Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 4582-5.
- Wunderlich, T. (2004) Generation of inducible Cre systems for conditional gene inactivation in mice, Universität zu Köln.
- Yahi, N., et al. (1992) Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells J Virol, 66, 4848-54.
- Yahi, N., et al. (1994) Interferon-gamma decreases cell surface expression of galactosyl ceramide, the receptor for HIV-1 GP120 on human colonic epithelial cells [published erratum appears in Virology 1995 Feb 20;207(1):343] Virology, 204, 550-7.
- Yamaguchi, T.P., et al. (1993) flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors Development, 118, 489-98.

Yamamoto, M., et al. (2003) Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain J Neurosci, 23, 6759-67.

Yamanaka, S., et al. (1994) Targeted disruption of the Hexa gene results in mice with biochemical and pathologic features of Tay-Sachs disease Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 9975-9.

Yoneda, Y. (1997) How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus J Biochem (Tokyo), 121, 811-7.

Zimmer, A. (1992) Manipulating the genome by homologous recombination in embryonic stem cells Annu Rev Neurosci, 15, 115-37.

Zumbansen, M. unveröffentlichte Ergebnisse

Zumbansen, M. (2001) Biochemische und molekularbiologische Studien zur Charakterisierung der murinen neutralen Sphingomyelinase in vitro und in vivo, University of Cologne.

Zumbansen, M. und Stoffel, W. (2002) Neutral sphingomyelinase 1 deficiency in the mouse causes no lipid storage disease Mol Cell Biol, 22, 3633-8.

Kurzzusammenfassung

Galaktocerebroside sind, wie durch konventionelle Genablation gezeigt wurde, eine entscheidende Lipidkomponente, die für die Funktion der Myelinmembran essentiell ist. Das für die konditionierte Genausschaltung modifizierte Schlüsselenzym ihrer Synthese, die UDP Galaktose: Ceramid Galaktosyltransferase, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch einen *replacement* Vektor mittels *gene targeting* in embryonale Stammzellen eingeführt. Diese Zellen führten trotz des Nachweises ihrer Pluripotenz nicht zu einer Keimbahntransmission in den aus ihnen erstellten chimären Tieren.

Durch Mikroinjektion wurde eine transgene Mauslinie für einen myelinspezifischen, Cre-Rekombinase codierenden Vektor auf der Basis des „tet on“ Systems geschaffen. Die Analyse durch den ROSA26 β geo Reporter Mausstamm zeigte, dass das System auf der Ebene des reversen Transaktivators nicht zur gewünschten Transkription führt und somit für den neurospezifischen Ansatz nicht geeignet ist.

Die Untersuchung der murinen 3kb5' des Transkriptionsstarts gelegenen untranslatierten CGT Sequenz konnte diesem Bereich keine genregulatorische Funktion zuweisen, was dessen alternative Benutzung für die transkriptionelle Kontrolle, z.B. in der Cre Expression, ausschloss.

Es wurden in Kaninchen zwei unterschiedliche, gegen das CGT Protein gerichtete polyklonale Antikörper generiert und als spezifisch charakterisiert.

Die Analyse von überexprimierenden, glykosylierungsdefizienten und trunkierten rnCGT Mutanten in HEK293 Zellen zeigte, dass alle drei putativen N-Glykosylierungsstellen genutzt werden und für die Aktivität des Enzyms notwendig sind. Weiterhin ist die C-terminal gelegene Proteindomäne, die das ER Retentionssignal trägt, nicht für die Aktivität und korrekte subzelluläre Lokalisierung nötig. Die nicht membrangebundene N-terminale Domäne ist nicht stabil und hat keine Aktivität.

Weitere Einflüsse der CGT auf die Funktion und Aufrechterhaltung der Myelinmembran müssen in weiterführenden Experimenten, wie der konditionierten Genablation, überprüft werden.

Abstract

Galactocerebrosides are, as was recently shown by conventional gene ablation, an essential lipid component for the function and maintenance of the myelin sheath. The UDP Galactose: Ceramide Galactosyltransferase, the enzyme catalysing synthesis of galactocerebrosides, was modified for conditional gene ablation and inserted by the use of a replacement vector into embryonic stem cells. These cells did not reveal any germ line transmission in chimerical males, although their pluripotency was tested before.

During this work a transgenic mouse line bearing a cre-recombinase coding vector on the basis of the "tet on" system and the myelin specific mbp promoter, was established by microinjection. Analysis by crossbreeding with the ROSA26 β geo reporter mouse strain demonstrates that this approach did not lead to the expected transcription and is therefore not suitable for this purpose.

The investigation of the murine 3kb5' untranslated region did not reveal any generegulatory function and so excluded the use of this region for transcriptional control.

Two distinct polyclonal antibodies against two CGT domains were generated in rabbits and specifically characterized.

The analysis of mutant rnCGT over expressing HEK293 cells was performed with clones deficient in glycosylation and protein domains. This experiment showed that each of the three putative glycosylation sites is used and necessary for enzyme activity. Additionally the C-terminal protein domain bearing the ER retention signal is not required for enzyme activity and proper subcellular localization. The N-terminal domain expressed without the transmembrane helix is not stable and has no detectable activity.

Further influences of CGT on function and maintenance of the myelin membrane will be examined by the following conditional gene ablation experiments.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die von mir angelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel betreut worden.

Stefan Meinzinger

Köln, den 10.12.2004

Lebenslauf

Name/Vorname:	Meinzinger, Stefan
Geburtsdatum/-ort:	10.11.1972, Leverkusen-Opladen
Eltern :	Gisela Meinzinger geb. Ross Werner Meinzinger
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbildung:	
08/1979 - 07/1985	Montanus-Grundschule in Burscheid
08/1985- 07/1992	Landrat Lucas Gymnasium Leverkusen
Mai 1992	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst	
06/1992 – 10/1993	Mobiler Sozialer Hilfsdienst beim Arbeiter Samariter Bund in Burscheid/Rheinland
Hochschulbildung:	
10/1993 - 01/1998	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
02/1998 - 11/1998	Diplomarbeit im Institut für Biochemie / Laboratorium für molekulare Neurowissenschaften (Med. Fakultät) der Universität zu Köln unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Dr. hc. W. Stoffel
12/1998 - 02/2005	Promotionsarbeit im Institut für Biochemie / Laboratorium für molekulare Neuro-wissenschaften (Med. Fakultät) der Universität zu Köln unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Dr. hc. W. Stoffel
03/2001 - 12/2004	Leitung der Gesamttierhaltung der Abteilung von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel

Köln, im November 2004