

**Beeinflussung der Genregulation durch
Rekombinasen in der Entwicklung von
*Xenopus laevis***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Biologie und Geografie

an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von Magdalena Roose
aus Königshütte in Oberschlesien

Juni 2008

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg Essen; Standort Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerhart Ryffel

2. Gutachter: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

3. Gutachter: Prof. Dr. Helmut Esche

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Ann Ehrenhofer-Murray

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 β	1
1.2	Die Nierenentwicklung in <i>Xenopus laevis</i>	4
1.3	<i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus	6
1.4	Konditionale Kontrolle von Zielgenen	8
1.5	Durch Restriktionsendonuclease und durch <i>I-SceI</i> Meganuclease vermittelte Transgenese in <i>Xenopus laevis</i>	11
1.6	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Chemikalien, Puffer und Enzyme	15
2.2	Molekularbiologische Standardmethoden	15
2.3	Plasmide	15
2.3.1	FLP-Expressionsvektoren	15
2.3.2	Cre-Expressionsvektoren	16
2.3.3	Expressionsvektoren für rot fluoreszierende Proteine DsRedExpress und tdTomato	17
2.4	Herstellung transgener <i>Xenopus laevis</i> Stämme	18
2.4.1	REMI-Methode	18
2.4.2	<i>I-SceI</i> -Methode	20
2.5	PCR-Analyse genomischer DNA	21
2.6	Induktion der Rekombinase-Expression durch Hitze-Schock	24
2.7	Immunfluoreszenz der Pronephri in <i>Xenopus laevis</i> Larven	24
2.8	Statistische Auswertung	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Strategie	26
3.2	Etablierung von tdTomato als roter Fluoreszenzmarker bei der Transgenese	28
3.3.	Durch <i>I-SceI</i> Meganuklease vermittelte Transgenese im <i>Xenopus</i> <i>laevis</i>	34

3.4	Herstellung der Aktivator-Stämme	38
3.4.1	Herstellung der FLP-Aktivator-Stämme	38
3.4.2	Herstellung der Cre-Aktivator-Stämme	43
3.5	Charakterisierung des HSPCre1-Aktivator-Stamms	47
3.6	Herstellung der Effektor-Stämme	51
3.6.1	Herstellung des Effektor-Stamms <i>263ins-6</i>	53
3.7	Durch Hitze-Schock induzierbare Überexpression von HNF1 β -wt sowie der Mutanten P328L329del und Ains263GG	54
3.7.1	Durch Hitze-Schock induzierbare Überexpression von Ains263GG	55
3.7.2	Durch Hitze-Schock induzierbare Überexpression von HNF1 β -wt	56
3.7.3	Durch Hitze-Schock induzierbare Überexpression von P328L329del	58
4	Diskussion	66
4.1	Die Expression roter Fluoreszenzproteine in <i>Xenopus laevis</i> Embryonen	66
4.2	Durch <i>I-SceI</i> -Meganuklease vermittelte Transgenese im <i>Xenopus laevis</i>	68
4.3	Stabile Integration von konditional aktiven Rekombinasen in <i>Xenopus laevis</i>	71
4.3.1	Stabile Integration der FLP-Rekombinase	71
4.3.2	Stabile Integration der Cre-Rekombinase und Cre-vermittelte Rekombination in <i>Xenopus</i> Larven	73
4.4	Durch Hitze-Schock induzierbare Überexpression von HNF1 β -wt sowie der Mutanten Ains263GG und P328L329del	77
4.4.1	Durch Hitze-Schock induzierbare Rekombination der Effektor-DNA im ins263-6 und wt2-Stamm	78
4.4.2	Durch Hitze-Schock induzierbare Rekombination der Effektor-DNA im 328del-4-Stamm	80
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	88
7	Danksagung	97

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
DMSO	Dimethylsulfoxid
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
DsRed	Discosoma Red Fluorescent Protein
ECFP	Enhanced Cyan Fluorescent Protein
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
F0	elterliche Generation
F1	erste Tochter-Generation
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
HS	Hitze-Schock
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
MMR	Marc's Modified Ringer
MODY	Maturity onset diabetes of the young
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS-222	Tricain Methansulfonat
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
REMI	Restriction Enzyme Mediated Integration
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
U	Units (Einheit für Enzymaktivität)

1 Einleitung

1.1 Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 β

Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF (Hepatocyte Nuclear Faktor) 1 β wurde zuerst in dedifferenzierten Ratten-Hepatoma-Zelllinien durch Bindung an den Albuminpromotor entdeckt (Cereghini et al., 1988) und gehört zusammen mit dem eng verwandten HNF1 α zu der Familie der POU-Transkriptionsfaktoren. Bis heute gehören dreizehn Homeodomän-Proteine zu dieser Familie. Sie alle haben die POU-Domäne gemeinsam (Lu et al., 2007). Die Abb. 1a zeigt die schematische Darstellung der Domänenstruktur von HNF1 β sowie der HNF1 β -Mutanten A263insGG und P328L329del.

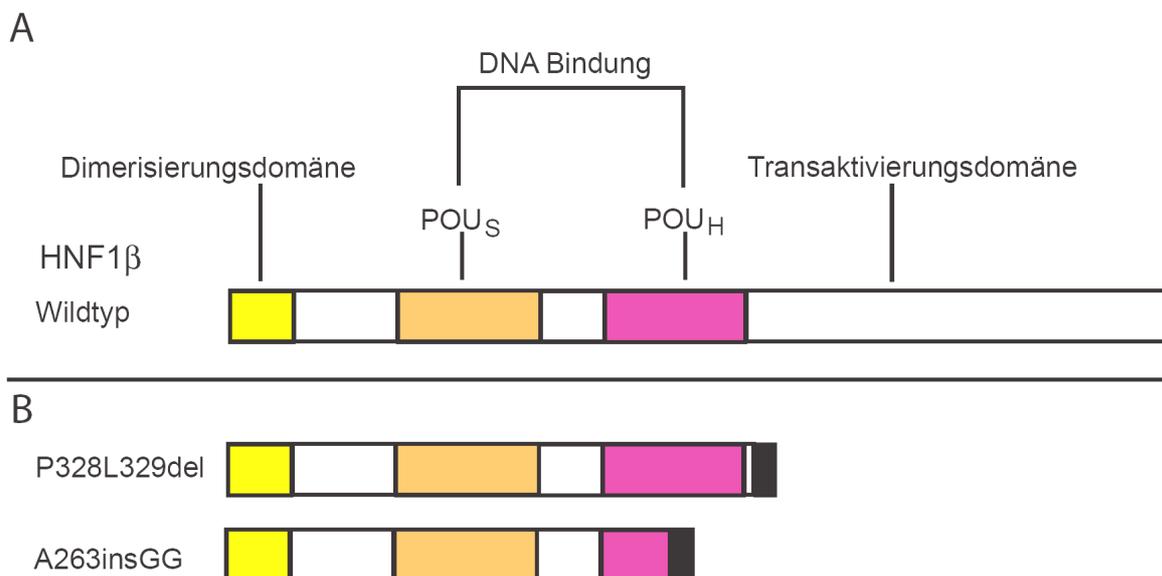


Abb.1: Schematische Darstellung der Tertiärstruktur von HNF1 β

A: Tertiärstruktur von HNF1 β Wildtyp. POU_S ist die POU-spezifische Domäne, POU_H ist die POU-Homeodomäne.

B: Tertiärstruktur von zwei HNF1 β -Mutanten. Der durch die Leserahmenverschiebung verursachte Austausch von Aminosäuren ist durch eine schwarze Box gekennzeichnet.

N-Terminal befindet sich die Dimerisierungsdomäne, die durch vier α -Helices gebildet wird. Mit der Dimerisierungsdomäne kann HNF1 β sowohl Homo- als auch

Heterodimäre mit HNF1 α bilden. HNF1 β und - α binden ausschließlich als Dimere an die DNA, wogegen andere POU-Transkriptionsfaktoren auch als Monomere an die DNA binden können (Ryan et al., 1997; Phillips & Luisi, 2000). Die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne besteht aus der POU_H- (Homeodomäne) und der POU_S-Domäne (spezifische-Domäne) (Rosenfeld, 1991). Die POU_H-Domäne besteht aus 60 Aminosäuren (AS), die drei α -Helices bilden, von denen die dritte als DNA-Erkennungs-Helix fungiert. Bei der POU_S-Domäne bilden 75 AS ein α -helicales Motiv, das mit der POU_H-Domäne interagiert und die DNA-Bindungsaffinität und Spezifität erhöht. Die DNA-Bindungsdomäne von HNF1 β und - α unterscheidet sich von den Bindungsdomänen der übrigen POU-Transkriptionsfaktoren. Die POU_S-Domäne weist N-Terminal eine zusätzliche α -Helix auf, und darüber hinaus ist die zweite Helix und der darauf folgende Loop der POU_H-Domäne um 21 AS länger, was zu einer extensiven Verbindung der beiden POU-Domänen führt (Lu et al., 2007). C-Terminal befindet sich die Transaktivierungsdomäne, die ungefähr die Hälfte des Proteins darstellt (Tronche & Yaniv, 1992).

HNF1 β ist vom Zebrafisch bis zum Menschen hoch konserviert (Frain et al., 1989; Demartis et al., 1994; Deryckere et al., 1995; Sun & Hopkins, 2001). Seine wichtigsten Synthesorte sind die Leber, die Niere, der Magen-Darm-Trakt und die Lunge (Cereghini, 1996). Darüber hinaus wird dieser Transkriptionsfaktor auch in der Bauchspeicheldrüse, den Eierstöcken, den Hoden, den Thymus und dem Neuralrohr, der ersten Entwicklungsstufe des zentralen Nervensystems der Chordatiere exprimiert (Coffinier et al., 1999).

Heterozygote Mutationen von HNF1 β verursachen in Menschen ein breites klinisches Spektrum. Sie werden vor allem mit der autosomal dominant vererbaren Form von Diabetes, die als MODY5 (maturity onset diabetes of the young) bezeichnet wird, in Verbindung gebracht (Horikawa et al., 1997). Weitere Auswirkungen von Mutationen in HNF1 β sind Fehlbildungen im Genitaltrakt, eine abnorme Leberfunktion und verschiedene Fehlentwicklungen in der Niere. Bekannte Nierenanomalien sind das Fehlen der Niere, renale Hypoplasie und Dysplasie, hyperurikämische Nephropathie sowie Zystenbildung (Edghill et al., 2006). Darüber hinaus verursachen Mutationen von HNF1 β Bauchspeicheldrüse-Hypoplasie, Atrophie sowie genetisch bedingte Pankreatitis, die zu einer exokrinen Insuffizienz führen kann (Bellane-Chantelot et al., 2004; Haumaitre et al., 2006, Maestro et al., 2007).

Die kritische Rolle von HNF1 β bei der Regulation des Transkriptionsnetzwerks, das die Spezifikation, die Differenzierung und das Wachstum der embryonalen Bauchspeicheldrüse steuert wurde auch in Mausstudien bestätigt (Maestro et al., 2007). Im Mausmodell wurde auch gezeigt, dass das Fehlen von HNF1 β zur Zystennieren (Gresh et al., 2004), zum Fehlen der Bauchspeicheldrüse (Haumaitre et al., 2004) zu fehlerhafter Insulin-Sekretion (Wang et al., 2004) sowie zu fehlerhafter Galle-Entwicklung und Fehlfunktion der Niere (Coffinier et al., 2002) führt.

Im Zebrafisch wurden HNF1 β -Mutationen als Ursache für Nierenzysten gefunden (Sun et al., 2004), außerdem wurde gezeigt, dass HNF1 β eine Rolle bei der Entwicklung des Nachhirns spielt (Sun und Hopkins, 2001). Im Modellorganismus *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von HNF1 β und der Mutante P328L329del zu einer signifikanten Reduktion der Pronephrosgröße führt, wohingegen die Überexpression der Mutante A263insGG eine Vergrößerung des Pronephros zur Folge hat (Bohn et al., 2003; Wild et al., 2000). In Abb. 1B ist die Domänenstruktur der P328L329del- und der A263insGG-Mutante schematisch dargestellt. P328L329del und A263insGG sind natürlich vorkommende Mutationen in HNF1 β , die in Patienten mit Nierendefekten gefunden worden sind. Bei Patienten mit der Mutation P328L329del wurde die zystische Nieren-Dysplasie diagnostiziert (Bingham et al., 2000) wohingegen A263insGG Zysten in den Nieren verursacht (Nishigori et al., 1998). Beide Mutationen führen aufgrund der Nierendefekte zum Ausbruch von MODY5. Bei der Mutante P328L329del wird ein Protein synthetisiert, welches eine verkürzte Transaktivierungsdomäne aufweist. Die Dimerisierungsdomäne und die DNA-Bindungsdomäne sind jedoch intakt. In transfizierten Zellen zeigt die Mutante P328L329del ein verändertes Transaktivierungspotential gegenüber Wildtyp HNF1 β (Wild et al., 2000; Thomas et al., 2004). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass die C-terminale Domäne von HNF1 β für die Aktivierung des PKHD1-Promotors benötigt wird (Hiesberger et al., 2005). Die Expression einer HNF1 β -Proteinvariante mit deletierter C-terminaler Domäne, ähnlich der Mutante P328L329del, wirkt hingegen dominant-negativ auf den PKHD1-Promotor. Die Mutante A263insGG besitzt keine Transaktivierungsdomäne und nur eine verkürzte DNA-Bindungsdomäne und kann somit nicht mehr an die DNA binden (Senkel et al., 2005). Sie kann jedoch Dimere bilden und wirkt dadurch dominant-negativ gegenüber der nativen HNF1 β -Form (Bai et al., 2002; Hiesberger et al.,

2004).

All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass HNF1 β ein sehr breites Funktionsspektrum hat. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle von HNF1 β in der Mesoderm- und Endoderm-Differenzierung sowie in der Genese unterschiedlicher Organe, wie zum Beispiel des Gehirns, der Niere oder des Magen-Darm-Trakts zu untersuchen. Das Mausmodell ist für die Untersuchung der Funktion von HNF1 β nicht optimal. Da eine heterozygote Deletion von HNF1 β keinen Einfluss auf die Entwicklung hat (Coffinier et al., 1999; Dukes et al., 1998; Pontoglio et al., 2000), wogegen eine homozygote Deletion bereits vor der Gastrulation letal ist. Erst durch eine konditionale Deletion kann die Funktion von HNF1 β in der Maus näher untersucht werden (Gresh et al., 2004; Wang et al., 2004). Für die Untersuchung der Funktion von HNF1 β während der Nierenentwicklung wurde ein binäres System benutzt. Dafür wurde ein Stamm generiert, in dem das HNF1 β -Gen durch Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase (loxP) flankiert wurde, dadurch konnte das HNF1 β durch die Rekombinase deletiert werden. Die Cre-Rekombinase wurde unter die Kontrolle des Ksp-cadherin-Promotors gestellt, der in dem Sammelrohr und den proximalen Nierenkanälchen aktiv ist. Da der Ksp-cadherin-Promotor erst ab einem Stadium aktiv ist, in dem ersten Schritte der Nierenentwicklung bereits abgeschlossen sind, konnten nur Ereignisse in der späten Nierenentwicklung untersucht werden. Nach einer solchen konditionalen Deletion von HNF1 β entwickelten die Mäuse Zystennieren (Gresh et al., 2004). Im *Xenopus laevis* kann die HNF1 β -Expression bereits von Beginn der Embryonalentwicklung an manipuliert werden, dadurch ist der Frosch ein guter Modellorganismus, um das Funktionsspektrum von HNF1 β zu untersuchen.

1.2 Die Nierenentwicklung in *Xenopus laevis*

Bei der Nierenentwicklung höherer Vertebraten werden drei Entwicklungsstadien durchlaufen: Pronephros, Mesonephros und Metanephros. Der Pronephros ist die einfachste Form der Niere in Vertebraten und ein funktionelles Organ in der *Xenopus*-Larve, welches, in der späteren Entwicklung durch den Mesonephros ersetzt wird. In höheren Vertebraten entwickelt sich der Pronephros nur als ein

rudimentäres Organ, und die erste funktionelle Niere ist der Mesonephros, der durch den Metanephros ersetzt wird (Vize et al., 2003). Da die gleichen Regulatoren für die Entwicklung des Pronephros beim Frosch und der Niere bei höheren Vertebraten verantwortlich sind, ist der Pronephros ein gutes Modell, um die molekularen Ereignisse der Nierenentwicklung zu studieren (Ryffel 2003; Jones 2005).

Beim *Xenopus laevis* entwickelt sich auf beiden Seiten des Embryos der Pronephros innerhalb von fünf Tagen aus dem intermediären Mesoderm und kann in drei Bereiche, die in der Abb. 2 schematisch dargestellt sind, unterteilt werden: den Glomus, die Nierenkanälchen (Tubulus) und das Sammelrohr (Ductus). Der Glomus ist eine vasculäre Filtrationseinheit, die die filtrierte Substanzen aus dem Blut in das Zoelom abgibt. Dort werden sie über Nephrostome in drei Nierenkanälchen weitergeleitet. Jedes dieser Kanälchen ist über ein eigenes Nephrostom mit dem Zoelom verbunden. Die Nierenkanälchen haben verschiedene proximale und distale Segmente. Das proximale Segment dient der Resorption von wichtigen Molekülen und der Abfall-Exkretion, wohingegen das distale Segment Wasser resorbiert. Vom distalen Bereich der Nierenkanälchen wird der Urin durch das Sammelrohr zur Kloake transportiert und ausgeschieden (Vize et al., 1997).

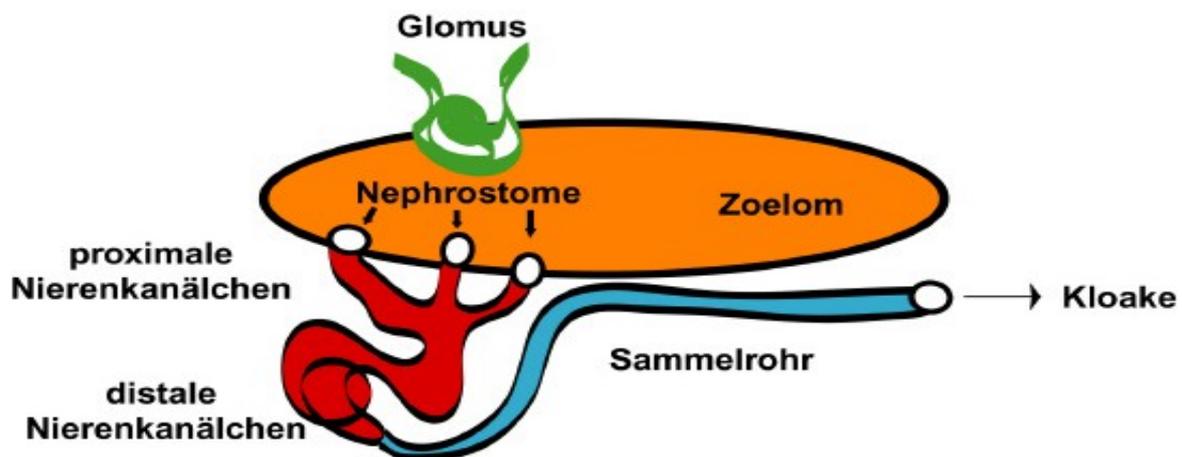


Abb. 2: Anatomie des Pronephros von *Xenopus laevis*

Die Grundstruktur des Pronephros ist schematisch dargestellt. Glomus (grün), Nierenkanälchen (rot) und Sammelrohr (blau) sind eingezeichnet (Modifiziert nach Ryffel, 2003).

Während der Pronephrosentwicklung konnte die Expression wichtiger Schlüsselmoleküle in den einzelnen Komponenten identifiziert werden. Die Transkriptionsfaktoren Osr1 und Osr2 sind die ersten Gene, die in der

Pronephrosanlage detektiert werden können. Sie induzieren die Expression von HNF1 β , lim1 und Pax8 (Tena et al., 2007). Diese drei Transkriptionsfaktoren werden bereits in der späten Gastrula (Stadium 11/12; Niewkoop & Faber, 1975) in der Pronephrosanlage exprimiert. Ab der späten Neurula, Stadium 20/21, können erste Anzeichen zellulärer Differenzierung beobachtet werden. Das Mesoderm unter den Somiten drei und fünf beginnt sich zu verdicken. Ab diesem Stadium werden die Transkriptionsfaktor Pax2, Id2 und POU2 sowie Proteine des Notch-Signalweges (delta1 und Notch1) und des Wnt-Signalweges (Wnt4 und frizzeld3) exprimiert. Ab der späten Neurula wird auch der Wilms-Tumorfaktor 1 (Wt1) in einem Bereich, aus dem sich später der Glomus entwickelt, exprimiert. Der Glomus selbst wird erst im Stadium 30 aus dem viszeralem Mesoderm gebildet (Bernardini et al., 1999), während auf der anderen Seite des Zoeloms die Nierenkanälchen und das Sammelrohr entstehen. Ab diesem Stadium werden schließlich Moleküle exprimiert, die für die Reabsorptionsfunktion des Pronephros notwendig sind. Dazu gehören die Natrium-Kalium-ATPasen sowie der Glukose-Cotransporter SGLT-1L und der Chlorid-Ionenkanal CLC-K. Im Stadium 38 ist der Pronephros ausdifferenziert (Ryffel 2003; Jones 2005).

1.3 *Xenopus laevis* als Modellorganismus

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist ein attraktives Modell, um die frühe Entwicklung von Vertebraten auf molekularer und zellulärer Ebene zu untersuchen. Das Weibchen kann alle drei Monate durch Injektion des Hormons Choriongonadotropin in den dorsalen Lymphsack zur Ablage von ca. 2000 Eiern stimuliert werden. Die Eier lassen sich leicht mit einem isolierten Hoden *in vitro* befruchten. Die Embryonen sind sehr robust und entwickeln sich außerhalb des Muttertiers in einer einfachen Salzlösung oder im Wasser, dadurch sind sie unproblematisch und leicht zu manipulieren. Aufgrund der Transparenz der Larven kann die Organogenese mit ihren zahlreichen morphologischen Veränderungen gut beobachtet werden. Eine einfache Methode der Manipulation der Embryonalentwicklung ist die Injektion von RNA (Sive et al., 2000). Dadurch wird eine kurzzeitige Überexpression des Proteins erzeugt. Auf diese Weise kann die

Funktion des Proteins in der frühen Embryonalentwicklung charakterisiert werden. Umgekehrt wird durch die Injektion synthetisch hergestellter Morpholino-Oligonukleotide die Expression von Genen spezifisch gehemmt. Die injizierte Menge von Nukleinsäure unterscheidet sich jedoch von einem Embryo zum anderen und auch eine präzise Injektion in einen bestimmten Bereich des Embryos ist sehr schwierig. Dies führt zu großen Unterschieden in den Phänotypen bei den so manipulierten Larven (Bohn et al., 2003). Darüber hinaus ist die injizierte Nukleinsäure nicht stabil und wird kurze Zeit nach der Injektion wieder abgebaut, sodass nur Auswirkungen auf die frühe Embryonalentwicklung untersucht werden können. Eine bessere Methode zur gezielten Untersuchung der Funktion von Proteinen bietet die stabile Integration eines Transgens in das Genom (Kroll & Amaya 1996). Um eine erfolgreich Transgenese detektieren zu können sind Markerproteine notwendig. Bei der Transgenese in *Xenopus laevis* werden unterschiedliche Proteine als Marker benutzt, wie zum Beispiel β -Galaktosidase oder Fluoreszenzproteine. Die β -Galaktosidase kann erst *in siuto* nachgewiesen werden und ist somit für die Herstellung von transgenen Stämmen unbrauchbar. Die Fluoreszenzproteine können in den transparenten Larven schnell und effizient mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden ohne diese vorher töten zu müssen. Es gibt Fluoreszenzproteine unterschiedliche Farben, in *Xenopus laevis* werden vor allem das grün fluoreszierende Protein (EGFP), das blau fluoreszierende Protein (ECFP), das gelb fluoreszierende Protein (EYFP) und das rot fluoreszierende Protein (DsRedExpress) verwendet. Durch die stabile Integration des Transgens in das Genom wird eine räumliche und zeitliche Kontrolle des produzierten Proteins ermöglicht. Wird das Transgen unter die Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors gestellt, so wird die Expression auf bestimmte Bereiche des Embryos beschränkt (Amaya & Kroll, 1999; Göttgens et al., 2002; Ryffel & Lingott, 2000; Beck & Slack, 1999). Eine zeitliche Kontrolle kann durch den Einsatz von induzierbaren Promotoren erzielt werden, wie z. B. dem Hitze-Schock-Promotor (Wheeler et al., 2000; Fu et al., 2002; Beck et al., 2003; Buchholz et al., 2004) oder dem Tetrazyklin-induzierbaren Promotor (Das and Brown, 2004; Ridgway et al., 2000). Auf diese Weise kann die Transgen-Expression zu einem beliebigen Zeitpunkt induziert werden, sodass auch Ereignisse in der späten Embryonalentwicklung untersucht werden können. Da bei der Transgenese die Gene in unterschiedlicher Kopienzahl und an unterschiedlichen chromosomalen *Locus* integriert werden, ergibt sich auch hier eine

gewisse Variabilität in der Expressionsstärke. Durch das Etablieren von stabilen Stämmen, in denen das Transgen auf die nächste Generation weitergegeben wird, kann dieses Problem eliminiert werden. Durch den Gebrauch von stabilen Stämmen können in einem Versuch hunderte F1-Larven, in denen das Transgen in gleicher Stärke exprimiert wird, untersucht werden. Um gleichzeitig eine räumliche und zeitliche Kontrolle eines Transgens zu erzielen, wurden binäre Systeme mit Aktivator- und Effektor-Stämmen etabliert (Hartley et al., 2002; Chae et al., 2002; Ryffel et al., 2003; Waldner et al., 2006). Die konditionale Kontrolle von Genen unter Verwendung binärer Systeme ist im nächsten Kapitel näher beschrieben.

1.4 Konditionale Kontrolle von Zielgenen

Eine gute Methode Zielgene konditional zu steuern, ist die Verwendung eines binären Systems mit so genannten Aktivator- und Effektorstämmen. Man unterscheidet zwei Arten binärer Systeme: 1. Steuerung des Zielgens durch transkriptionelle Aktivierung und 2. Steuerung des Zielgens durch Rekombination. Ein Beispiel für die transkriptionelle Aktivierung ist das GAL4/UAS System, das auch in *Xenopus* etabliert worden ist (Hartley et al., 2002; Chae et al., 2002). Hier aktiviert der Transkriptionsfaktor GAL4 durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen (UAS) in der Promotorregion des Effektorgens dessen Transkription (Ornitz et al., 1991). Durch Fusion der GAL4-DNA-Bindungsdomäne an die modifizierte Liganden-Bindungsdomäne des Progesteronrezeptors und die transkriptionelle Aktivierungsdomäne des Herpes-Simplex-Virus VP16 kann die Aktivierung induzierbar gemacht werden. Das resultierende chimäre Konstrukt bindet an die Hitze-Schock-Proteine HSP70 und HSP90 und wird dadurch in dem Zytoplasma zurückgehalten. Durch die Zugabe der synthetischen Steroide RU486 oder ZK98.734 wird diese Verbindung gelöst und das chimäre Konstrukt gelangt in den Zellkern, wo es an die UAS-Sequenz bindet, um die Transkription des Effektorgens zu aktivieren. Wird das Steroid abgesetzt, binden die Hitze-Schock-Proteine erneut an das chimäre Konstrukt und sind wieder dauerhaft in dem Zytoplasma lokalisiert (Wang et al., 1997). Weitere binäre Systeme, die eine reversible Genaktivierung ermöglichen, sind die Tetracyclin-abhängigen Systeme tTA und rtTA, die auf dem *tet*-Operator-

Repressor-System basieren (Gossen & Bujard, 1992; Gossen et al., 1995), und das IPTG-abhängige *lac*-Operator-Repressor-System (Cronin et al., 2001). Diese Systeme finden vor allem Anwendung in der Maus und wurden noch nicht in *Xenopus laevis* etabliert.

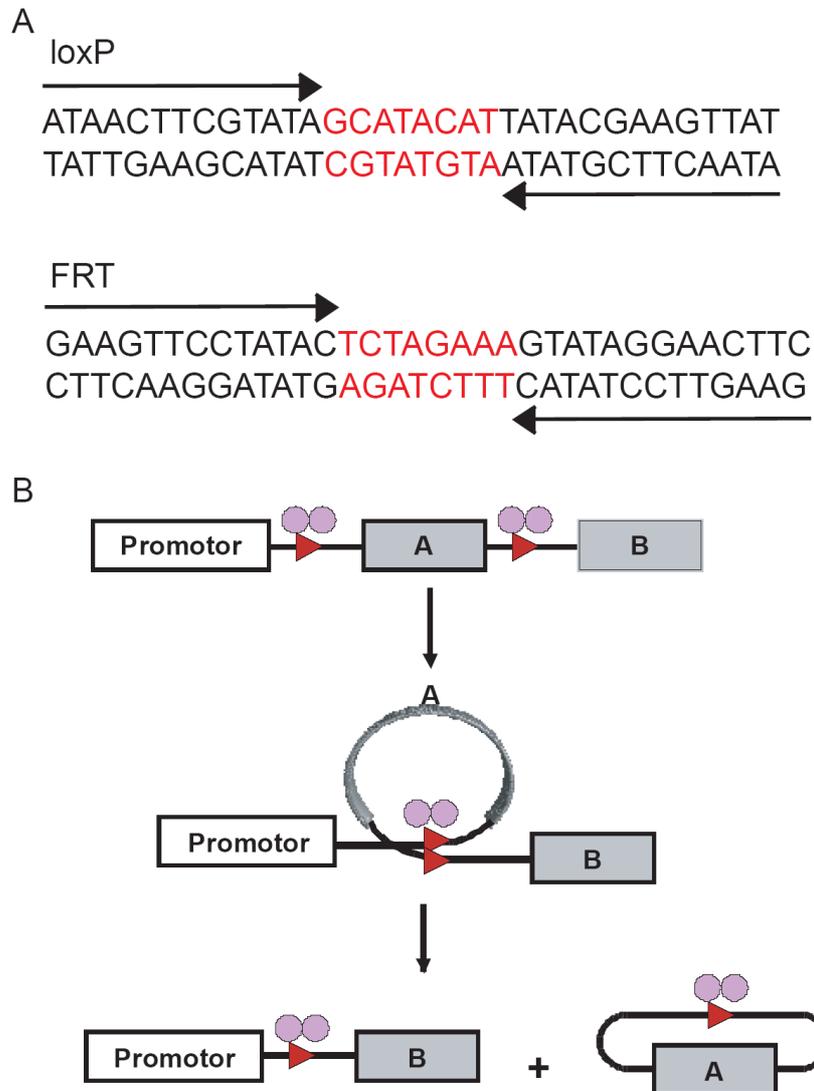


Abb.3: Durch Rekombinase kontrollierte Genexpression

A: 34 bp lange loxP- und FRT-Sequenz. Die 8 bp lange Kernsequenz (rot) wird durch zwei zueinander invers gerichteten 13 bp langen Sequenzen (schwarz) flankiert. Die Kernsequenz ermöglicht eine Orientierung der gesamten Sequenz, die durch einen Pfeil oberhalb der Sequenz gekennzeichnet ist.

B: Cre- oder FLP-Dimere (violette Kreise) katalysieren Rekombination zwischen zwei loxP- oder FRT-Sequenzen (rote Dreiecke), was in der Bildung einer synaptischen Struktur resultiert. Innerhalb dieser Struktur werden die Sequenz A ausgeschnitten und der Promotor und die Sequenz B nebeneinander ligiert (Modifiziert nach Lewandoski, 2001).

Im Gegensatz zu der transkriptionellen Aktivierung ist die Genaktivierung durch sequenzspezifische Rekombination irreversibel. Hier finden vor allem die Enzyme Cre aus dem Bakteriophagen P1 und FLP aus *Saccharomyces cerevisiae*

Verwendung. Beide Enzyme zählen zu den sequenzspezifischen Rekombinasen der Integrase-Familie und katalysieren konservative DNA-Umlagerungen zwischen zwei Erkennungssequenzen (Stark et al., 1992; Kilby et al., 1993). Die 34 Basenpaare (bp) großen Erkennungssequenzen von Cre (loxP) und FLP (FRT) sind in Abbildung 3A dargestellt. Sie bestehen aus zwei 13 bp großen palindromischen Sequenzen, die invers zueinander gerichtet sind, und einer 8 bp großen Kernsequenz, die eine Orientierung der Sequenz gibt. Beide Rekombinasen können Sequenzen, die sich zwischen zwei Erkennungssequenzen befinden, ausschneiden. Der Mechanismus einer Cre- oder FLP-vermittelten Rekombination ist in Abb. 3B schematisch dargestellt. Cre- oder FLP-Dimere binden an die Erkennungssequenzen, was zur Bildung eines synaptischen Komplexes führt. Innerhalb des Komplexes wird die DNA geschnitten und religiert. Dabei wird die flankierte DNA-Sequenz A entfernt und der Promotor und die Sequenz B werden nebeneinander ligiert. Anschließend werden die einzelnen Komponenten freigesetzt (Lewandoski, 2001). Obwohl der Mechanismus beider Enzyme ähnlich ist, unterscheiden sie sich in ihrer Kinetik und Thermostabilität. Cre besitzt *in vitro* sein Temperaturoptimum zwischen 37 °C und 40 °C. Das Temperaturoptimum von FLP liegt bei 23-30 °C (Buchholz et al., 1996). Die Variante FLPe, bei der vier Aminosäuren ausgetauscht worden sind, hat eine erhöhte Thermostabilität. In *E.coli* ist die FLPe-Variante bei 37 °C viermal aktiver als die Wildtyp FLP (Buchholz et al., 1998), und auch in der Maus zeigt sie eine erhöhte Reaktionsaktivität, welche vergleichbar mit der von Cre ist (Rodriguez et al., 2000). Bei der durch Rekombinase vermittelten Aktivierung von Transgenen enthält der Effektorstamm ein Konstrukt, in dem die Expression des Zielgens durch ein Stopp-Signal blockiert ist. Dieses Stopp-Signal ist zwischen dem Promotor und dem Zielgen lokalisiert und wird durch rekombinasespezifische Erkennungssequenzen flankiert. Ausgehend von der schematischen Darstellung in Abb. 3B, wäre in einem Effektor-Konstrukt die Sequenz A das Stopp-Signal, während die Sequenz B für das Zielgen kodieren würde. Nach Kreuzung mit einem Aktivatorstamm, in dem die Rekombinase exprimiert wird, und erfolgreicher Rekombination wird das Stopp-Signal entfernt und das Zielgen aktiviert. Durch Verwendung spezieller Promotoren kann die Aktivierung des Zielgens entweder ubiquitär oder gewebespezifisch stattfinden (Ryffel et al., 2003; Waldner et al., 2006). Ein Nachteil bei der Verwendung von Cre-Rekombinase ergibt sich aus ihrer Zytotoxizität, die vor allem bei hohen Konzentrationen auftritt. Bei Mäusen wurden in Verbindung mit Cre-assoziiierter Toxizität Schädigungen im

Gehirn und Sterilität festgestellt (Pfeifer et al., 2001; Schmidt et al., 2000). Für beide Enzyme wurde nachgewiesen, dass diese an degenerierten Erkennungssequenzen, so genannten pseudo-loxP/FRT-Sequenzen, mit geringer Effizienz aktiv sind (Thyagarajan et al., 2000). Im Mausgenom wurden solche pseudo-loxP-Sequenzen nachgewiesen (Thyagarajan et al., 2000). Durch den Einsatz von induzierbaren Systemen kann die Konzentration der Rekombinase in der Zelle minimiert und gleichzeitig der Zeitpunkt der Rekombination reguliert werden. Im Maussystem werden ligandenregulierte Rekombinasen verwendet. Ähnlich wie bei dem oben beschriebenen GAL4/UAS-System wird hier die Rekombinase an die modifizierte Ligandenbindungsdomäne des Progesteron- oder Östrogenrezeptors fusioniert und nach der Expression im Zytoplasma festgehalten. Durch Zugabe des synthetischen Steroids kann die Rekombinase in den Zellkern gelangen und die Rekombination vermitteln (Danielian et al., 1998; Kellendonk et al., 1999). In *Xenopus laevis* ist der Einsatz von induzierbaren Promotoren, wie z. B. dem HSP70-Promotor (Wheeler et al., 2000; Fu et al., 2002; Beck et al., 2003; Buchholz et al., 2004) oder dem Tetrazyklin-induzierbaren Promotor (Das und Brown, 2004; Ridgway et al., 2000), gut etabliert, jedoch wurde bis heute noch kein induzierbares Rekombinase-System beschrieben. Der Einsatz des HSP-70-Promotors in *Xenopus* bietet viele Vorteile. Dieser Promotor kann ohne Gebrauch von Chemikalien einfach durch das Erhöhen der Wassertemperatur auf 34 °C über einen kurzen Zeitraum aktiviert werden (Wheeler et al., 2000). Der HSP-70-Promotor ist ubiquitär aktiv und steuert eine starke Expression, vergleichbar der des CMV-Promotors (Fu et al., 2002). Dadurch ist er sehr attraktiv für die konditionale Überexpression von Genen.

1.5 Durch Restriktionsendonuclease und durch *I-SceI* Meganuclease vermittelte Transgenese in *Xenopus laevis*

Die ersten Versuche, transgene Frösche herzustellen, wurden 1984 von Etkin et al. durchgeführt. Dabei wurde linearisierte Plasmid-DNA in befruchtete *Xenopus*-Eier injiziert. Die Plasmid-DNA wurde nur selten in das Genom integriert, was zu einer mosaikartigen Expression des Transgens und einer fehlerhaften räumlichen und

zeitlichen Regulation der injizierten Gene führte. Auch die Herstellung einer transgenen Linie erwies sich als nicht möglich. Zwölf Jahre später entwickelten Kroll und Amaya (1996) eine verbesserte Methode zur Herstellung transgener *Xenopus laevis* Linien, die auf durch Restriktionsendonuklease vermittelter Integration (REMI) transgener DNA in *Xenopus*-Spermienkerne beruht. In dieser Methode werden permeabilisierte Spermienkerne mit linearisierter Plasmid-DNA, einem Restriktionsenzym, dem Eiextrakt und MgCl₂ inkubiert und in unbefruchtete *Xenopus*-Eier injiziert. Der Eiextrakt enthält Nukleoplasmin, das bewirkt, dass das Spermienchromatin teilweise dekondensiert. Das Restriktionsenzym verursacht Brüche im Chromatin. Beides soll die Integration der Plasmid-DNA in das Genom erleichtern. Andererseits werden die Spermienkerne durch Wirkung des Nukleoplasmins und des Restriktionsenzym äußerst fragil, was zur fehlerhaften Teilung und schließlich zum Tod der Embryonen führen kann. Sparrow et al. haben 2000 gezeigt, dass man sowohl auf die Zugabe von Eiextrakt als auch des Restriktionsenzym verzichten kann, ohne die Transgeneseeffizienz zu verringern. Ein großer Nachteil der REMI-Methode ist die hohe Sterberate. Nur 5 % der befruchteten Embryonen entwickeln sich bis zum Schwanzknospenstadium normal, davon hat ein Drittel das Transgen stabil in das Genom aufgenommen. Die transgenen Tiere enthalten zwischen 5 bis 35 Genkopien pro Zelle, die als einzelne Kopien oder als eine Kette von 2 bis 6 Kopien an 4 bis 8 chromosomalen *Locus* integriert werden (Kroll und Amaya 1996). Die unterschiedliche Anzahl der integrierten Kopien führt zur Variabilität im Expressionslevel des Transgens. Da die Plasmid-DNA bereits vor der ersten Zellteilung in das Genom integriert wird, ist die Expression des Transgens jedoch homogen und stabil. Die Embryonen zeigen eine fehlerfreie räumliche und zeitliche Regulation des Transgens. Die Tiere vererben das Transgen auf die F1-Generation, was die Herstellung transgener Linien ermöglicht (Marsh-Armstrong et al., 1999). Die homogene und stabile Expression des Transgens sowie die Weitergabe des Transgens auf die F1-Generation sind die größten Vorteile der REMI-Methode.

Im Jahr 2006 haben Pan et al. eine Methode zur Herstellung transgener *Xenopus laevis* verwendet, die zuerst von Thermes et al. (2002) für Medakafisch beschrieben worden ist, die durch *I-SceI*-Meganuclease vermittelte Integration einer Plasmid-DNA in das Genom. Die *I-SceI*-Meganuclease gehört zur Familie der Endonucleasen und wurde aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert. *I-SceI* schneidet aufgrund

ihrer 18 bp langen Erkennungssequenz nur sehr selten. Statistisch betrachtet, kommt eine so lange Sequenz nur einmal innerhalb einer zufälligen 7×10^{10} bp langen DNA-Sequenz vor. In der durch *I-SceI*-Meganuclease vermittelten Integration einer Plasmid-DNA in das Genom werden der Promotor und das Reportergen zwischen zwei *I-SceI*-Erkennungssequenzen in ein Plasmid kloniert. Das Plasmid wird mit der Meganuclease inkubiert. Anschließend wird das Plasmid-Enzym-Gemisch in Einzell-Stadium-Embryonen innerhalb einer Stunde nach Befruchtung injiziert (Pan et al., 2006). Anders als bei der REMI-Methode schneidet die *I-SceI*-Meganuclease die genomische DNA nicht, sondern verdaut lediglich die injizierte Plasmid-DNA, der genaue Mechanismus ist jedoch nicht bekannt. Die Konzentration der Meganuclease sollte jedoch 8×10^{-3} Units pro Embryo nicht überschreiten, da es ansonsten zu einer fehlerhaften Gastrulation und schließlich zum Tod des Embryos kommen kann (Pan et al., 2006). Der größte Vorteil dieser Methode liegt in der Befruchtung der Eier mit isolierten Hoden. Dies kommt der natürlichen Befruchtung sehr nahe und erhöht die Überlebensrate der injizierten Embryonen. Von Pan et al. (2006) konnte eine Überlebensrate von 50 % erzielt werden. Von den normal entwickelten Embryonen haben 2 % das Transgen stabil in das Genom aufgenommen. Die transgenen Tiere enthalten zwischen 1 bis 8 Genkopien pro Zelle. Wie bei der REMI-Methode wird auch hier die Plasmid-DNA bereits vor der ersten Zellteilung in das Genom integriert. Dies führt zu einer homogenen und stabilen Expression des Transgens sowie zur Vererbung desselben auf die F1-Generation. Aufgrund der guten Resultate von Pan et al. (2006) sollte in der vorliegenden Arbeit die durch *I-SceI*-Meganuclease vermittelte Transgenese ausgetestet und gegeben falls etabliert werden.

1.6 Zielsetzung

Eine gute Methode, Gene konditional zu steuern, ist die Verwendung eines binären Systems mit so genannten Aktivator- und Effektorstämmen. In der vorliegenden Arbeit sollte ein binäres System im *Xenopus laevis* etabliert werden, in dem die Steuerung des Gens durch Rekombination erfolgt.

Im ersten Teil der Arbeit soll ein Aktivator-Stamm in *Xenopus laevis* generiert werden. Als Aktivator soll die sequenzspezifische DNA-Rekombinase Cre aus dem Bakteriophagen P1 oder FLP aus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet werden. Eine induzierbare Aktivität soll erreicht werden, indem die Rekombinasen unter die Kontrolle des Hitze-Schock-Promotors HSP-70 gestellt werden. Um das Aktivator-Gen in lebenden Larven detektieren zu können, soll zusätzlich ein rot fluoreszierendes Protein als Marker verwendet werden. Zur Herstellung des Aktivator-Stamms sollen die HSP-70-kontrollierte Rekombinase und das Marker-Protein als ein Transgen in das Genom stabil integriert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll das Potential des entwickelten Aktivator-Stamms getestet werden. Dazu soll die Expression der Rekombinase durch Hitze-Schock aktiviert und die Fähigkeit zur Umlagerung transgener DNA zuerst in einem Reporter-Stamm analysiert werden.

Im dritten Teil der Arbeit soll der Aktivator-Stamm mit dem bereits vorhandenen Effektor-Stamm, in dem das HNF1 β durch Rekombination aktiviert werden kann, gekreuzt werden. Die Expression der Rekombinase soll durch Hitze-Schock aktiviert und die Fähigkeit zur Umlagerung transgener DNA in dem Effektor-Stamm analysiert werden. Schließlich soll ein Zeitfenster bestimmt werden, in dem das HNF1 β eine wichtige Rolle in der Nierenentwicklung hat.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Puffer und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Lösungen und Puffer, deren Zusammensetzung nicht anders vermerkt ist, wurden nach Protokollen der Methodensammlung von Sambrook et al. (1989) hergestellt. Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme für DNA stammten von den Firmen Biolabs (Schwalbach), Invitrogen (Karlsruhe), Pharmacia (Freiburg) und Roche (Mannheim).

2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Techniken wie Anzucht von Bakterien, Plasmid-DNA-Präparationen, Modifikation von DNA und Gelelektrophoresen wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Aufreinigung großer Mengen Plasmid-DNA erfolgte mit dem „Plasmid Maxi Kit“ von Qiagen.

2.3 Plasmide

2.3.1 FLP-Expressionsvektoren

pCSHSP:Flp

Das Aktivator-Plasmid pCSHSP:FLP wurde hergestellt, indem zuerst in die HindIII-Schnittstelle des pCSFLP-Plasmids (Werdien et al., 2001) der Bsp-Linker (5'-AGCTGCTCCGGACGGA-3') mit einer BspEI-Schnittstelle eingebaut wurde. Anschließend wurde der CMV-Promotor als Sall/BspEI-Fragment entfernt und durch

den HSP-Promotor, der als Sall/Agel-Fragment aus dem CGHG-Plasmid (Fu et al., 2002) ausgeschnitten worden war, ersetzt.

Zur Herstellung von transgenen *Xenopus laevis* wurde das pCSHSP:FLP mit NotI und Sall restringiert, die Transgen-DNA wurde durch Gel-Elektrophorese von dem bakteriellen Teil getrennt und das gereinigte HSP:FLP-Fragment in die Eier injiziert.

pBSHSP:FLP;CMV:tdTomato

Das Aktivator-Plasmid wurde hergestellt, indem das HSP:FLP aus dem PCSHSP:FLP-Plasmid als Sall/KpnI-Fragment und das CMV:tdTomato aus dem pCSCMV:tdTomato-Plasmid als Sall/EcoRI-Fragment in dem pBlueSkript IISK+ kloniert wurde.

Zur Herstellung von transgenen *Xenopus laevis* wurde das pCSHSP:FLP mit NotI restringiert, die Transgen-DNA wurde durch Gel-Elektrophorese von dem bakteriellen Teil getrennt und das gereinigte HSP:FLP;CMV:tdTomato-Fragment in die Eier injiziert.

pBSHSP:FLP;CMV:tdTomato-SceI

Für die Herstellung dieses Plasmids wurde das HSP:FLPCMV:tdTomato als EcoRI/KpnI-Fragment aus dem pBSHSP:FLP;CMV:tdTomato Plasmid ausgeschnitten und in das I-SceI-pBlueSkript IISK+ (Thermes et al., 2002) kloniert.

Zur Herstellung transgener *Xenopus laevis* wurde das pBSHSP:FLP;CMV:tdTomato-SceI-Plasmid mit I-SceI-Meganuklease inkubiert und das Plasmid-Enzym-Gemisch in die Eier injiziert.

2.3.2 Cre-Expressionsvektoren

pCSHSP:Cre

Das Aktivator-Plasmid pCSHSP:Cre wurde hergestellt, indem zuerst in die HindIII-Schnittstelle des pCSCre-Plasmids (Werdien et al., 2001) der Bsp-Linker eingebaut wurde. Anschließend wurde der CMV-Promotor als Sall/BspEI-Fragment entfernt und durch den HSP-Promotor, der als Sall/Agel-Fragment aus dem CGHG-Plasmid (Fu et al., 2002) ausgeschnitten worden war, ersetzt.

Zur Herstellung von transgenen *Xenopus laevis* wurde das pCSHSP:Cre mit NotI und

Sall restringiert, die Transgen-DNA wurde durch Gel-Elektrophorese von dem bakteriellen Teil getrennt und das gereinigte HSP:Cre-Fragment in die Eier injiziert.

pBSHSP:Cre;CMV:tdTomato

Das Aktivator-Plasmid wurde hergestellt, indem das HSP:Cre aus dem PCSHSP:Cre-Plasmid als Sall/KpnI-Fragment und das CMV:tdTomato aus dem pCSCMV:tdTomato Plasmid als Sall/EcoRI-Fragment in dem pBlueSkript IISK+ kloniert wurden.

Zur Herstellung von transgenen *Xenopus laevis* wurde das pBSHSP:Cre;CMV:tdTomato mit NotI restringiert, die Transgen-DNA wurde durch Gel-Elektrophorese von dem bakteriellen Teil getrennt und das gereinigte HSP:Cre;CMV:tdTomato-Fragment in die Eier injiziert.

pBSHSP:Cre;CMV:tdTomato-Scel

Für die Herstellung dieses Plasmids wurde das HSP:CreCMV:tdTomato als EcoRI/KpnI Fragment aus dem pBSHSP:Cre;CMV:tdTomato Plasmid ausgeschnitten und in das I-Scel-pBlueSkript IISK+ (Thermes et al., 2002) kloniert.

Zur Herstellung transgener *Xenopus laevis* wurde das pBSHSP:FLP;CMV:tdTomato-Scel Plasmid mit I-Scel-Meganuklease inkubiert und das Plasmid-Enzym-Gemisch in die Eier injiziert.

2.3.3 Expressionsvektoren für rot fluoreszierende Proteine DsRedExpress und tdTomato

pLHSP:Cre;CMV:DsRedExpress

Das Aktivator-Plasmid wurde hergestellt, indem das ECFP(loxP)(FRT)-Fragment aus dem pLCMV:ECFP(loxP)(FRT)DsRedExpress-Plasmid (Rafael Bordes-Alonso, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen) mit HindIII und SmaI entfernt wurde. Anschließend wurde das CMV:DsRedExpress als NotI-Fragment ausgeschnitten und in das pCSHSP:Cre-Plasmids kloniert.

Zur Herstellung von transgenen *Xenopus laevis* wurde das pBSHSP:Cre;CMV:DsRedExpress mit KpnI und Sall restringiert, die Transgen-DNA wurde durch Gel-Elektrophorese von dem bakteriellen Teil getrennt und das

gereinigtes HSP:Cre;CMV:DsRedExpress-Fragment in die Eier injiziert.

pCSCMV:tdTomato

Das pCSCMV:tdTomato Plasmid wurde hergestellt, indem das tdTomato als BamHI/EcoRI-Fragment aus dem Plasmid pRSET-BtdTomato (Shaner et al., 2004) ausgeschnitten und in pBlueSkript IISK+ kloniert wurde. Anschließend wurde in dem Plasmid pCSGFP2 (Ryffel et al., 2000) das GFP2 als BamHI/XhoI-Fragment durch das tdTomato ersetzt.

Zur Herstellung von transgenen *Xenopus laevis* wurde das pCSCMV:tdTomato mit Sall restringiert, die Transgen-DNA wurde durch Gel-Elektrophorese von dem bakteriellen Teil getrennt und das gereinigte CMV:tdTomato-Fragment in die Eier injiziert.

pCS γ Cry:DsRedExpress

Das pCS γ Cry:DsRedExpress-Plasmid wurde hergestellt, indem der γ -Kristallin-Promotor als HindIII/BamHI-Fragment aus dem 2,2 γ -CryGFP3-Plasmid (Offield et al., 2000) ausgeschnitten und in das pLCMV:ECFP(loxP)(FRT)DsRedExpress-Plasmid (Rafael Bordes-Alonso, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen) kloniert wurde. Das γ CryDsRedExpress wurde dann als HindIII/KpnI-Fragment in pBlueSkript IISK+ kloniert.

Zur Herstellung von transgenen *Xenopus laevis* wurde das pCS γ Cry:DsRedExpress mit NotI und Sall restringiert, die Transgen-DNA wurde durch Gel-Elektrophorese von dem bakteriellen Teil getrennt und das gereinigte γ Cry:DsRedExpress-Fragment in die Eier injiziert.

2.4 Herstellung transgener *Xenopus laevis* Stämme

2.4.1 REMI-Methode

Zur Herstellung transgener *Xenopus laevis* mit der REMI-Methode wurde zuerst die Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und die

Transgen-DNA von dem bakteriellen Teil durch Gel-Elektrophorese getrennt. Die Transgen-DNA wurde mit dem „QIAquick Gel Extraktions Kit“ (Qiagen) gereinigt und in Wasser eluiert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt, die DNA auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

Die Spermienkerne wurden nach der Methode von Kroll und Amaya (1996) präpariert. Allerdings wurde für die Permeabilisierung der Spermien Digitonin anstelle von Lysolecithin verwendet (Huang et al., 1999). Die Spermienkerne wurden in 200 µl Glycerinpuffer resuspendiert, gezählt und auf 100 Kerne/µl verdünnt. Danach wurden die Kerne entweder sofort zur Herstellung von Transgenen verwendet oder aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Adulte Weibchen wurden durch Injektion von 200-500 Einheiten humanem Chorion-Gonadotropin (hCG) Pregnesin (Sigma Aldrich) in die dorsalen Lympfsäcke zur Eiablage gebracht. Nach ca. 12 Stunden konnte durch gezielte Massage des Rückens und Bauches eine spontane Eiablage induziert werden. Die Gallerthülle wurde durch eine 2- bis 4-minütige Inkubation in 2%igem Cystein-Hydrochlorid (Fluka) pH 8 entfernt, anschließend wurde mehrmals mit 1 x MMR gewaschen. Bis zur Injektion wurden die Eier in 1 x MMR bei 14 °C aufbewahrt. Die Entwicklungsstadien wurden nach Nieuwkoop und Faber (1975) bestimmt.

Für die Injektion wurden 4 µl Spermienkern-Suspension mit 2,5 µl linearisierte DNA bei Raumtemperatur für 15 Min. inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 22,5 µl SDB-Puffer wurde die Suspension vorsichtig mit einer abgeschnittenen Spitze gemischt. 5 µl des Kern-DNA-Gemischs wurden mit 150 µl SDB-Puffer verdünnt und mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 10 nl/sec in unbefruchtete Xenopus-Eier injiziert. Die Injektionsnadel mit einer Spitze von 0,05 mm Durchmesser wurde aus 100µl-Kapillaren (BLAZBRAND intraMARK; BRANDWertheim/Main) gezogen. Um ein Auslaufen der Eier zu verhindern, wurde die Injektion in 0,4 x MMR mit 6 % Ficoll durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 10 nl/Ei. Nach der Injektion wurden die Eier bis Stadium 9 bei 14 °C gehalten. Eier, die sich normal geteilt hatten, wurden anschließend in 0,1 x MMR überführt, und die Temperatur wurde schrittweise bis auf Raumtemperatur erhöht.

Transgene Larven wurden ab Stadium 40 in Plastikcontainern gehalten und dreimal täglich mit Sera micron (Sera, Heinsberg) gefüttert. Die Larven entwickelten sich in etwa 2 Monaten zu Jungfröschen. Diese wurden in ein Aquarium umgesetzt, mit Tubifex (Futterhaus, Essen) und Regenwürmern (Superwurm e.K.) gefüttert und

innerhalb 10-12 Monaten zu geschlechtsreifen Fröschen aufgezogen.

Für Kreuzungen wurden transgene Weibchen mit einer Injektion von 50-100 U hCG zur Eiablage stimuliert. Transgene Männchen wurden mit stimulierten Weibchen zusammengesetzt, um eine natürliche Befruchtung zu erreichen. Konnte keine natürliche Befruchtung erreicht werden, so wurden die transgenen Männchen getötet, der Hoden entnommen und die Eier *in vitro* befruchtet. Dazu wurde ein Stück des Hodens abgeschnitten und mit der Schnittfläche über die Eier gerieben. Der Rest des Hodens wurde in Holtfreter-Lösung bei 4 °C bis zu eine Woche lang gelagert. 5 Min. nach der Befruchtung wurden die Eier mit Wasser überschichtet und bei Raumtemperatur gehalten. Eier, die sich normal geteilt hatten, wurden nach 5-6 Stunden aussortiert und anschließend wie Eier nach der Injektion behandelt.

Glycerinpuffer:

250 mM Sucrose; 15 mM HEPES (pH 7,7); 1 mM EDTA; 0,5 mM Spermidin; 0,2 mM Spermin; 1 mM Dithiothreitol; 0,3 mM BSA; 30 % Glycerin

1 x MMR:

0,1 M NaCl; 2 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 2 mM CaCl₂; 5 mM HEPES ; 0,1 mM EDTA (pH 7,8)

SDB:

250 mM Sucrose; 75 mM KCl; 0,5 mM Spermidin; 0,2 mM Spermin; pH 7,5

Holtfreter-Lösung:

60 mM NaCl; 0,6 mM KCl; 0,9 mM CaCl₂; 0,2 mM NaHCO₃

2.4.2 I-Scel-Methode

Zur Herstellung transgener *Xenopus laevis* mit der Scel-Methode wurde, falls nicht anders angegeben, ein Restriktionsansatz aus 320 ng Plasmid-DNA und 8 U I-Scel-Meganuklease (Biolabs) in 1 x I-Scel-Puffer in 20 µl Gesamtvolumen angesetzt und 40 Min bei 37 °C inkubiert.

Adulte Weibchen wurden auf die gleiche Weise wie bei der REMI-Methode zur

Eiablage stimuliert. Das Männchen wurde getötet und der Hoden entnommen. Ein Stück des Hodens wurde abgeschnitten und die Qualität der Spermien wurde aufgrund ihrer Beweglichkeit mikroskopisch bestimmt. Der Hoden wurde mit der Schnittfläche über die Eier gerieben und diese so befruchtet. Nach 5 Min. wurden die Eier mit Wasser überschichtet und bei Raumtemperatur gehalten. Nach 15 Min. wurde die Gallerthülle durch eine 2- bis 4-minütige Inkubation in 2%igem Cystein-Hydrochlorid (Fluka) pH 8 entfernt und die Eier danach mehrmals mit 0,1 x MMR gewaschen. Anschließend wurden die Eier in 0,1 MMR mit 2 % Ficoll überführt und bis zu Injektion bei 12,5 °C gehalten.

Das Gemisch aus Plasmid-DNA und I-SceI-Meganuklease wurde innerhalb einer Stunde nach der Befruchtung in Eier, die sich noch nicht geteilt hatten, mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 10 nl/sec injiziert. Die Injektionsnadel mit einer Spitze von 0,02 mm Durchmesser wurde aus 100µl-Kapillaren (BLAZBRAND intraMARK; BRANDWertheim/Main) gezogen. Das Injektionsvolumen betrug 10 nl/Ei. Nach der Injektion wurden die Eier bis zum Achtzell-Stadium bei 12,5 °C gehalten. Eier, die sich normal geteilt hatten, wurden anschließend in 0,1 x MMR überführt und die Temperatur wurde schrittweise bis auf Raumtemperatur erhöht.

Transgene Larven wurden wie bei der REMI-Methode behandelt.

2.5 PCR-Analyse genomischer DNA

Die genomische DNA wurde mit dem „Blood & Tissue Kit“ (Qiagen) aus einem ganzen Embryo oder aus der Schwanzspitze nach den Angaben des Herstellers präpariert, indem die Proben mit Proteinase K lysiert, die Lysate mit RNase A inkubiert und anschließend auf Zentrifugationssäulen aufgetragen wurden. Die DNA wurde durch Zentrifugation an die Silicagel-Partikel der Säule gebunden, gewaschen, mit 60 µl AE-Puffer (Quiagen) eluiert und bei -20 °C gelagert. Für die anschließende PCR-Analyse wurden 5 µl der DNA-Lösung eingesetzt.

Die verwendeten PCR-Programme waren nach dem gleichen Muster, wie es in Tabelle 1 dargestellt ist, aufgebaut, wobei jeweils die 1. Elongations-Dauer sowie die Temperatur für die Primerhybridisierung unterschiedlich waren. Beide Werte sind in der Tabelle 3 angegeben. In der Tabelle 3 sind weiterhin die verwendeten Primer und

deren Sequenzen aufgelistet. Nur die FLP-PCR wurde nach einem speziellen Programm, das in Tabelle 2 dargestellt ist, durchgeführt.

	Dauer	Temperatur [°C]	Zahl der Zyklen
Denaturierung	15 Min.	95	1
Denaturierung	30 Sek.	95	35
Primerhybridisierung	45 Sek.	Y	
1. Elongation	X	72	
2. Elongation	7 Min.	72	1
Kühlung	∞	4	

Tabelle 1: Allgemeines Muster der verwendeten PCR-Programme

	Dauer	Temperatur [°C]	Zahl der Zyklen
Denaturierung	15 Min.	95	1
Denaturierung	30 Sek.	95	8
1. Primerhybridisierung	30 Sek.	67*	
1. Elongation	45 Sek.	72	
Denaturierung	30 Sek.	95	35
2. Primerhybridisierung	30 Sek.	60	
2. Elongation	45 Sek.	72	
3. Elongation	7 Min.	72	1
Kühlung	∞	4	

Tabelle 2: Das FLP-PCR-Programm

*: Die Temperatur der 1. Primerhybridisierung wurde pro Zyklus um 1 °C verringert.

PCR			Primer		Verwendung
Name	Bedingungen		Name	Sequenz	
	X	Y			
FLP	Tab.2	Tab.2	FLP1	5'-TTGGAAGACATTTGATGACCTCA-3'	Überprüfung der Präsenz der FLP-Rekombinase
			FLP2	5'-GGCCACGGCAGAAGCAC-3'	
Cre	2 Min.	54°C	Cre vor	5'-CGCTCCGGACCGATATGTCCAATTTACTGA-3'	Überprüfung der Präsenz der Cre-Rekombinase
			Cre rev	5'-CGCGAATTCTCACTATAGTTCTAGAGAACC-3'	
Effektor	3 Min.	55°C	CMVK	5'-TGCCCATTCATATCCGTTCT-3'	Überprüfung der Umlagerung der Effektor-DNA
			HNF1 β -3rev	5'-CCGGGAAGTTCCTATACTTT-3'	
Reporter	2 Min.	54°C	Cas1	5'-CACCATGGTGGCGATGGATC-3'	Überprüfung der Umlagerung der Reporter-DNA
			Cas2	5'-GTGGCGATGGATCTCCTAGG-3'	

Tabelle 3: PCR-Analyse genomischer DNA

X: Dauer der 1. Elongation; Y: Temperatur für die Primerhybridisierung

2.6 Induktion der Rekombinase-Expression durch Hitze-Schock

Der Hitze-Schock wurde in einem 2-Liter-Becherglas mit abgestandenem Wasser, das im Wasserbad auf die gewünschte Temperatur von 34 °C gebracht worden war, durchgeführt. Die Larven wurden in einem Netz in das warme Wasser für die gewünschte Zeit gehalten und anschließend in 22 °C warmes Wasser überführt. Larven der F0-Generation wurden im Stadium 45 für 5 Min. und nach 24 Stunden für eine weitere Stunde Hitze geschockt. Larven der nachfolgenden Generationen wurden bis zum gewünschten Stadium aufgezogen und eine Stunde lang Hitze geschockt.

2.7 Immunfluoreszenz der Pronephri in *Xenopus laevis* Larven

Die Larven wurden im Stadium 40 in MEMFA fixiert, in Methanol dehydriert und bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Immunfluoreszenz wurden die injizierten und fixierten Larven mit PBS rehydriert und mit PBT/10% Ziegen Serum für 1 Stunde bei RT geblockt. Danach wurde mit dem Gemisch der beiden Erst-Antikörper, 3G8, 1:40 verdünnt und 4A6, 1:4 verdünnt in PBT/10% Ziegen Serum über Nacht bei 4 °C inkubiert. 3G8 ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, der gegen die terminalen Differenzierungsmarker der Pronephroskanälchen und der Nephrostome gerichtet ist (Vize et al., 1995). 4A6 ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, der gegen die terminalen Differenzierungsmarker des Pronephrosganges und der Nephrostome gerichtet ist (Vize et al., 1995).

Nach fünfmaligem Waschen für je 1,5 Stunden in PBT bei RT erfolgte die Inkubation mit dem 1:1000 in PBT/10% Ziegen Serum verdünnten Cy3-gekoppelten Ratte-Anti-Maus-Zweit-Antikörper (Codennr. 415-166-166, Jackson ImmunoResearch) bei 4 °C über Nacht im Dunkeln. Dann erfolgte erneutes Waschen mit PBT bei RT und die Auswertung am Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Leica, Köln).

MEMFA:

0,1 M MOPS; 2 mM EGTA; 1 mM MgSO₄; 3,7 % Formaldehyd; pH 7

PBT:

PBS; 2 mg/ml BSA (bovine serum albumin, Fraktion 5); 0,1 % Triton X-100

Erst-Antikörper:

Die Antikörper 3G8 und 4A6 wurden freundlicherweise von Dr. E. A. Oliver-Jones (Warwick University, Coventry, England) zur Verfügung gestellt.

2.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde von den immunfluoreszierenden Larven eine Größenbestimmung des Pronephroskanals und des proximalen Abschnittes des Pronephrosanges durchgeführt. Diese Strukturen wurden mithilfe des Computerprogramms AxioVision von Zeiss vermessen. Um die Daten auf signifikante Unterschiede zu testen (p-Wert), wurde der t-Test benutzt. Es wurden jeweils die Daten von Cre-positiven und Cre-negativen Larven, die zum gleichen Zeitpunkt Hitze geschockt wurden, miteinander verglichen.

Die statistische Auswertung der Vererbungsraten bei den transgenen Tieren wurde mit dem chi²-Test (<http://graphpad.com/quickcalcs/chisquared1.cfm>) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Strategie

In Rahmen dieser Arbeit wurde in *Xenopus laevis* ein System entwickelt, mit dem man Gene konditional überexprimieren kann. Dazu wurde ein binäres System mit Aktivator- und Effektor-Stämmen etabliert.

Als Aktivator wurden die Cre- und die FLP-Rekombinase gewählt. Um eine kontrollierte Aktivität zu erreichen, wurden die Rekombinasen unter die Kontrolle des induzierbaren Hitze-Schock-Promotors HSP-70 gestellt. Der konditional aktive HSP-70 ist bei einer Temperatur von 20 °C, bei der *Xenopus laevis* typischerweise gehalten wird, nicht aktiv. Durch Erhöhung der Wassertemperatur auf 34 °C, und somit auch der Körpertemperatur der wechselwarmen Tiere, wird der Promotor aktiv und die Rekombinase wird exprimiert (Wheeler et al., 2000). Sinkt die Temperatur wieder auf 20 °C, wird der Promotor erneut inaktiv. Durch den Gebrauch von HSP-70 können die Rekombinasen zu einem beliebigen Zeitpunkt in der Entwicklung aktiviert werden. Um eine erfolgreiche Transgenese detektieren zu können, wurde gleichzeitig ein zweites Transgen, das für ein rot fluoreszierendes Protein unter der Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV) Promotors kodiert, verwendet. Frühere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass nicht in allen Gründertieren, die die Rekombinase als Transgen enthalten, diese auch aktiv ist. Erst durch Kreuzung mit einem so genannten Reporter-Stamm konnte die Aktivität der Rekombinase in der F1-Generation überprüft werden (Waldner et al., 2006). Dies ist jedoch sehr langwierig, da die Gründertiere erst nach acht bis zwölf Monaten geschlechtsreif sind. Um dieses Problem zu umgehen, wurden für die Herstellung der Aktivator-Stämme Spermien des bereits etablierten Reporter-Stamms C5 benutzt (Ryffel et al., 2003). Der heterozygote C5-Stamm enthält als Transgen das CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP-Konstrukt. Die Abb. 4A zeigt dieses Konstrukt in nativen und rekombinierten Zustand und die Abb. 4B zeigt die einzelnen Schritte der Herstellung der Aktivator-Stämme.

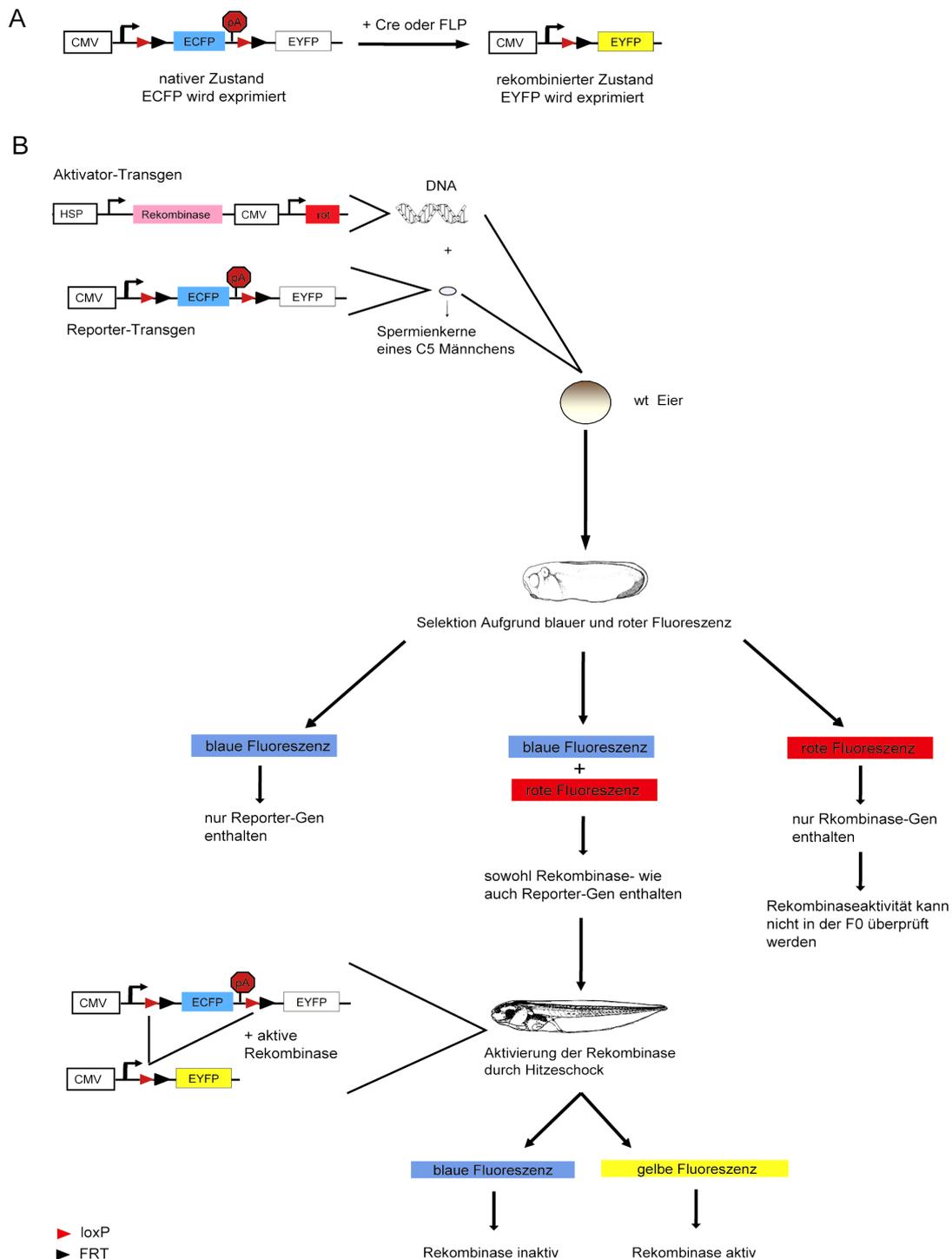


Abb. 4: Herstellung der Aktivator-Stämme.

A: Schematische Darstellung des Reporter-Konstrukts in nativem und rekombiniertem Zustand.

B: DNA, die für das Aktivator-Transgen kodiert, wird mit Spermienkernen eines C5-Reporter-Männchens in Wildtyp Eier injiziert. Im Schwanzknospen-Stadium werden die Larven aufgrund blauer (Reporter-Transgen) und roter (Aktivator-Transgen) Fluoreszenz selektiert. Larven mit blauer und roter Fluoreszenz werden als freischwimmende Larven Hitze geschockt. Dadurch wird die Expression der Rekombinase aktiviert. Die Rekombinase schneidet in dem Reporter-Transgen das ECFP-Gen und das Terminationsstopp aus, wodurch das EYFP-Gen unter die Kontrolle des CMV-Promotors gestellt wird. Larven, die nach dem Hitze-Schock gelb fluoreszieren, enthalten somit aktive Rekombinase und werden bis zur Geschlechtsreife aufgezogen. Larven mit nur roter Fluoreszenz werden bis zur Geschlechtsreife aufgezogen und die Rekombinase-Aktivität wird in der F1-Generation getestet.

In den Reporter-Stamm steuert der ubiquitär aktive CMV-Promotor die Expression des blau fluoreszierenden Proteins (ECFP). Die Expression von ECFP detektiert gleichzeitig die Präsenz des Transgens. Da der C5-Stamm in dem Transgen heterozygot ist, ist das ECFP-Gen nur in der Hälfte der Nachkommen vorhanden. Stromabwärts des ECFP-Gens ist ein Terminationsstopp integriert, der die Expression des gelb fluoreszierenden Proteins (EYFP) verhindert. Das ECFP-Gen und der Terminationsstopp sind sowohl durch Erkennungssequenzen der Cre- (loxP) wie auch der FLP-Rekombinase (FRT) flankiert und können durch beide Rekombinasen ausgeschnitten werden. Dadurch wird das vorher inaktive EYFP-Gen exprimiert. Freischwimmende Larven, die sowohl rot (Rekombinase-Gen enthalten) wie auch blau (Reporter-Transgen enthalten) fluoreszieren, werden Hitze geschockt. Larven, die nach einem Hitze-Schock gelb fluoreszieren, enthalten somit ein aktives Rekombinase-Gen. Larven, die nur rot fluoreszieren, enthalten nur das Rekombinasegen. Die Aktivierbarkeit der Rekombinase kann in diesen Larven nicht direkt getestet werden. Solche Larven müssen wie in vorherigen Untersuchungen erst bis zur Geschlechtsreife aufgezogen werden und die Rekombinaseaktivität muss durch Kreuzung mit dem Reporter-Stamm in der F1-Generation überprüft werden. Larven, die nur blau fluoreszieren, enthalten nur das Reporter-Transgen und können für die Herstellung von Aktivator-Stämmen nicht benutzt werden. Durch den Gebrauch des C5-Stamms für die Herstellung der Aktivator-Stämme kann die Aktivität der Rekombinase in Larven, die sowohl das Rekombinase-Gen wie auch das Reporter-Transgen enthalten, direkt in den Gründertieren, bereits eine Woche nach Befruchtung, getestet werden.

3.2 Etablierung von tdTomato als roter Fluoreszenzmarker bei der Transgenese

Da in dem C5-Reporter-Stamms sowohl das blau wie auch das gelb fluoreszierende Protein exprimiert werden, konnte für die Herstellung der Aktivator-Stämme entweder das grün oder das rot fluoreszierende Protein benutzt werden. Die Emissionsmaxima von EGFP, ECFP und EYFP liegen sehr nahe beieinander, dadurch wird die Differenzierung der einzelnen Proteine in einem Mehrfachfluoreszenzexperiment sehr

schwierig. Aus diesem Grund sollte für die Herstellung der Aktivator-Stämme das rote Fluoreszenzprotein DsRedExpress als Marker benutzt werden. Die einzelnen Schritte der Herstellung der Aktivator-Stämme sind schematisch in Abb. 4B dargestellt. Das Konstrukt HSP:Cre-CMV:DsRedExpress wurde zusammen mit Spermienkernen eines C5-Männchens in Xenopus Eier injiziert. Das HSP:Cre-CMV:DsRedExpress-Konstrukt enthält ein Gen das für die Cre-Rekombinase kodiert und durch den konditional aktiven HSP-70-Promotor reguliert wird und stromabwärts das DsRedExpress-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Im Schwanzknospen-Stadium wurden die Larven entsprechend ihrer Fluoreszenz selektiert. Larven, die aufgrund der DsRedExpress Expression rot fluoreszierten, enthielten gleichzeitig das Rekombinase-Gen. Blau fluoreszierende Larven enthielten das C5-Transgen, mit dem die Aktivierbarkeit der Rekombinase überprüft werden kann. Larven, die sowohl rot wie auch blau fluoreszierten, enthielten beide Konstrukte.

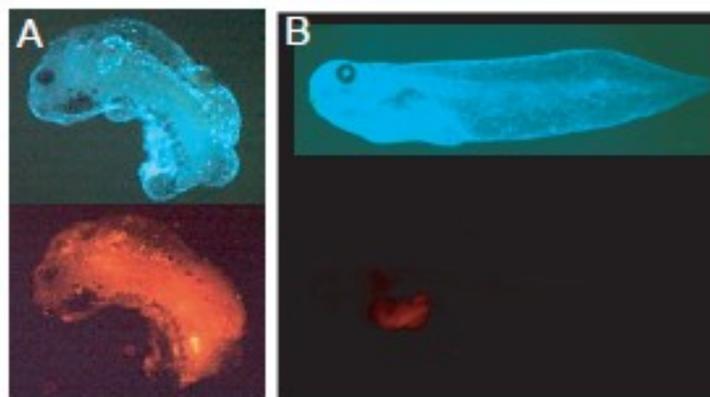


Abb. 5: Freischwimmende Larven nach der Injektion von HSP:Cre-CVM:DsRedExpress und C5-Spermienkernen

Oben: Larven unter dem blauen Fluoreszenz-Filterset; Unten: Larven unter dem roten Fluoreszenz-Filterset.

A: Larve mit blauer (ECFP Expression) und roter (DsRedExpress Expression) Fluoreszenz. Die Larve weist abnorme Entwicklung auf.

B: Normal entwickelte Larve mit nur blauer Fluoreszenz.

Das HSP:Cre-CMV:DsRedExpress-Konstrukt wurde in 14780 Eier injiziert. Bis zum Schwanzknospen-Stadium haben sich 76 Embryonen entwickelt. Da der C5-Stamm in seinem Transgen heterozygot ist, wurde die blaue Fluoreszenz in der Hälfte der Larven erwartet. Das ECFP wurde in 37 (48,7 %) Embryonen exprimiert, dies entspricht den Erwartungen. Das DsRedExpress wurde in 21 Embryonen detektiert, davon wiesen 15 zusätzlich die blaue Fluoreszenz auf. Alle rot fluoreszierenden Larven hatten Missbildungen, entwickelten sich langsamer im Vergleich zu nicht

fluoreszierenden Larven und starben eine Woche nach der Injektion. In Abb. 5A ist eine rot und blau fluoreszierende Larve im Stadium 41 mit Ödemen zu sehen. Als Vergleich ist in Abb. 5B eine normal entwickelte Larve im gleichen Stadium mit nur blauer Fluoreszenz zu sehen. Da die DsRedExpress Expression eine normale Larvenentwicklung behinderte, war es nicht gelungen, einen DsRedExpress exprimierenden adulten Frosch aufzuziehen.

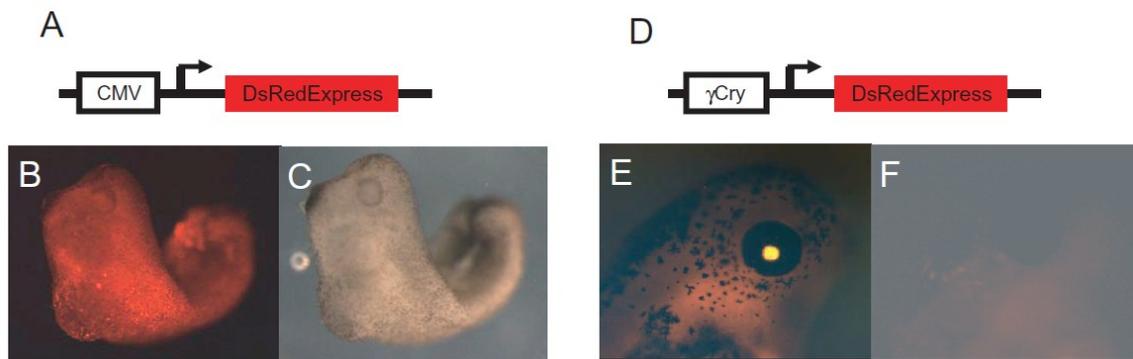


Abb. 6: Expression von DsRedExpress

A: Schematische Darstellung des Konstrukts CMV:DsRedExpress. Der ubiquitär aktive CMV-Promotor kontrolliert die Expression des rot fluoreszierenden Proteins DsRedExpress

B und C: Larve mit CMV-Promotor kontrollierter DsRedExpress Expression unter dem roten Fluoreszenz-Filterset (B) und unter Normallicht (C). Die Larve weist Missbildungen auf.

D: Schematische Darstellung des Konstrukts γ Cry:DsRedExpress. Der gewebespezifische γ -Krystallin-Promotor kontrolliert die Expression des rot fluoreszierenden Proteins DsRedExpress

E: Larve mit γ -Krystallin-Promotor kontrollierter DsRedExpress Expression unter dem rotem Fluoreszenz-Filterset. Die rote Fluoreszenz ist auf die Augenlinse beschränkt.

F: Wildtyp-Larve unter dem roten Fluoreszenz-Filterset. Es ist keine rote Fluoreszenz in der Augenlinse detektierbar.

Um sicherzustellen, dass nur die Expression von DsRedExpress und nicht die Koexpression von DsRedExpress und ECFP in die Entwicklung der Larven interferiert, wurden transgene Tiere hergestellt, die nur das DsRedExpress enthielten. Dazu wurde das DsRedExpress unter die Kontrolle zweier unterschiedlicher Promotoren gestellt. In dem CMV:DsRedExpress-Konstrukt (Abb. 6A) kontrolliert der ubiquitär aktive CMV-Promotor die Expression des rot fluoreszierenden Proteins. Um die Expression auf einen kleinen Bereich der Larve zu beschränken und somit die Missbildungen zu minimieren, wurde in dem zweiten Konstrukt, γ Cry:DsRedExpress (Abb. 6D), der nur im Auge aktive γ -Kristallin-Promotor verwendet. Die Konstrukte wurden zusammen mit Spermienkernen eines Wildtyp-Männchens in Xenopus Eier injiziert. Das CMV:DsRedExpress-Konstrukt wurde in 4100 Eier injiziert. 36 Larven haben sich bis zum Stadium 40 entwickelt, davon wiesen 10 eine rote Fluoreszenz

auf. Alle 10 Larven sind aufgrund diverser Missbildungen innerhalb einer Woche nach der Injektion gestorben. Die Abb. 6B zeigt eine abnorme Larve im Schwanzknospens-Stadium unter dem roten Fluoreszenz-Filterset und Abb. 6C unter Durchlicht. Das γ Cry:DsRedExpress-Konstrukt wurde in 4100 Eier injiziert. 91 Larven haben sich bis zum Stadium 40 entwickelt, davon wiesen 16 eine rote Fluoreszenz im Auge auf. Von den fluoreszierenden Larven konnten zwei geschlechtsreife Frösche aufgezogen werden. Die Abb. 6E zeigt eine Larve aus der F0-Generation, die das DsRedExpress im Auge exprimiert und die Abb. 6F eine Wildtyp-Larve. Somit interferiert eine ubiquitäre Expression von DsRedExpress in eine normale Larvenentwicklung, während die Expression im Auge keinen Einfluss auf eine normale Entwicklung hat.

Der γ -Kristallin-Promotor ist erst ab dem Stadium 38 in der Linse aktiv (Brakenhoff et al., 1991). Da jedoch Ereignisse in der frühen Embryonalentwicklung untersucht werden, ist es wichtig, das Markerprotein so früh wie möglich detektieren zu können. Somit kann der γ -Kristallin-Promotor in diesen Ansatz nicht benutzt werden. Der CMV-Promotor bietet gegenüber dem γ -Kristallin-Promotor einen Vorteil, da er bereits zu Beginn der zygotischen Gen-Transkription aktiv ist.

Ein weiteres rot fluoreszierendes Protein ist das tdTomato. Es ist ein DsRed-Derivat, das die Mutation Q66M enthält. Der C- und N-Terminus wurde verändert, was die Fusion mit anderen Proteinen an beide Termini im Vergleich zur DsRed erleichtert. Durch die Fusion von zwei dTomato-Proteinen zu tandem dTomato (tdTomato) konnte die Leuchtkraft im Vergleich zur DsRed um 60 % erhöht werden (Shaner et al., 2004). Das tdTomato wurde unter die Kontrolle des CMV-Promotors gestellt und das CMV:tdTomato-Konstrukt in 5000 Eier injiziert. 20 Larven haben sich bis zum Stadium 40 entwickelt, davon zeigten 10 eine homogene rote Fluoreszenz auf. Von den fluoreszierenden Larven konnten drei geschlechtsreife Frösche aufgezogen werden, die als Tom1 bis Tom3 benannt worden sind. Die rote Fluoreszenz des tdTomatos konnte bereits ab der Neurula, Stadium 19, eindeutig detektiert werden. Die Abb. 7A zeigt eine rot fluoreszierende Larve im Neurula-Stadium und die Abb. 7B eine freischwimmende Larve der F0-Generation mit einer homogenen roten Fluoreszenz. Durch Kreuzung mit einem Wildtyp-Frosch konnte gezeigt werden, dass das Tom3-Tier tdTomato auf 50 % seiner Nachkommen vererbt. Die Abb. 7C zeigt ein Beispiel einer freischwimmenden Larve aus der F1-Generation des Tom3-Stamms.

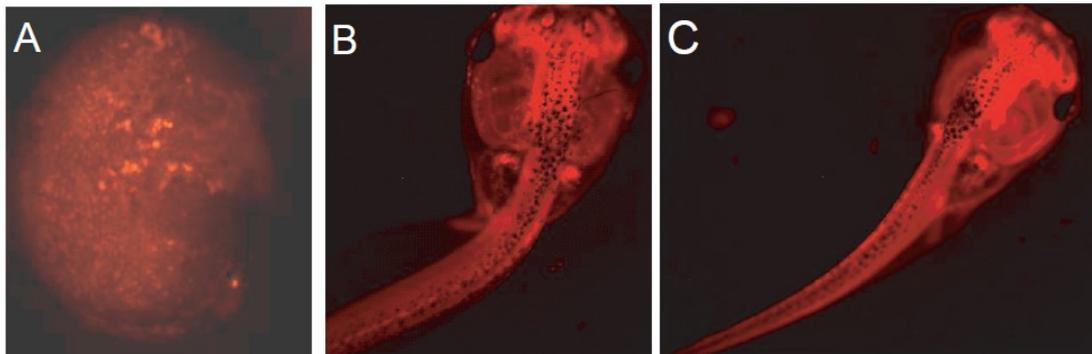


Abb.7: Expression von tdTomato

Homogene CMV-Promotor kontrollierte Expression von tdTomato in einer Larve in der Neurula, Stadium 19 (A), in freischwimmender Larve, Stadium 45 (B) und in freischwimmender Larve, Stadium 45, der F1-Generation des Tom-3-Stamms (C).

Da berichtet wurde, dass der CMV-Promotor im adulten Tier vermindert aktiv ist (Gross et al., 2006), wurde ein geschlechtsreifes Männchen aus der Tom3-F1-Generation getötet und seine Organe auf rote Fluoreszenz untersucht. In der Abb. 8 sind die einzelnen Organe des Tom3-Männchens (rechte Seite) sowie eines Kontroll-Frosches (linke Seite) im Durchlicht sowie unter dem roten Fluoreszenz-Filterset zu sehen. Sowohl die Epidermis wie auch alle untersuchten Organe zeigten eine starke und homogene rote Fluoreszenz. Demzufolge ist der CMV-Promotor in dem Tom3-Stamm auch in adulten Tieren aktiv.

Es wurde gezeigt, dass eine ubiquitäre Expression des rot fluoreszierenden Proteins DsRedExpress unter der Kontrolle des CMV-Promotors in eine normale Larvenentwicklung interferiert. Minimiert man die Expression auf die Augenlinse, so entwickelten sich die Larven normal. Eine normale Larvenentwicklung wurde auch bei der, durch den CMV-Promotor kontrollierten Expression von tdTomato beobachtet. Da eine starke Fluoreszenz im adulten Frosch beobachtet wurde, ist der CMV-Promotor auch im adulten Tier stark aktiv.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das tdTomato-Protein bei weiterer Transgenese als Markerprotein für die Herstellung der Aktivator-Stämme benutzt.

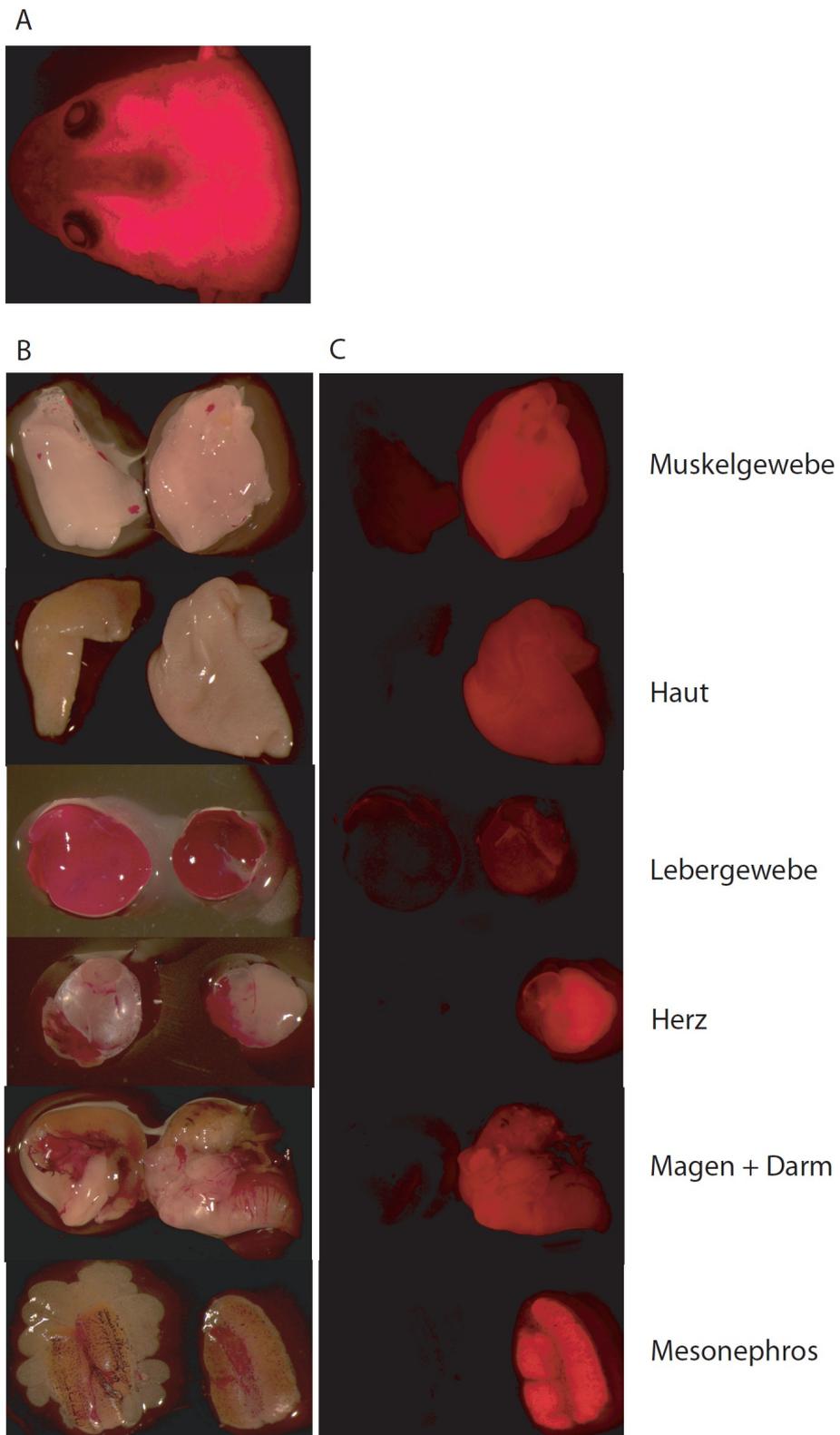


Abb.8: Expression von tdTomato im adulten Tom3-Frosch

A: Kopf eines adulten Tom3-Frosches unter dem roten Fluoreszenz-Filterset. Die rote Fluoreszenz kann auch im adulten Frosch eindeutig detektiert werden.

B und C: Sezierte Organe eines adulten Tom3-Frosches (rechte Seite) und eines Kontroll-Frosches (linke Seite) unter Normallicht (B) und unter rotem Fluoreszenz-Filterset (C). Alle untersuchten Organe des Tom3-Frosches wiesen homogene rote Fluoreszenz auf.

3.3. Durch *I-SceI* Meganuklease vermittelte Transgenese im *Xenopus laevis*

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Pan et al. 2006 beschriebene Methode transgene Frösche zu generieren, die durch *I-SceI*-Meganuklease vermittelte Transgenese, getestet.

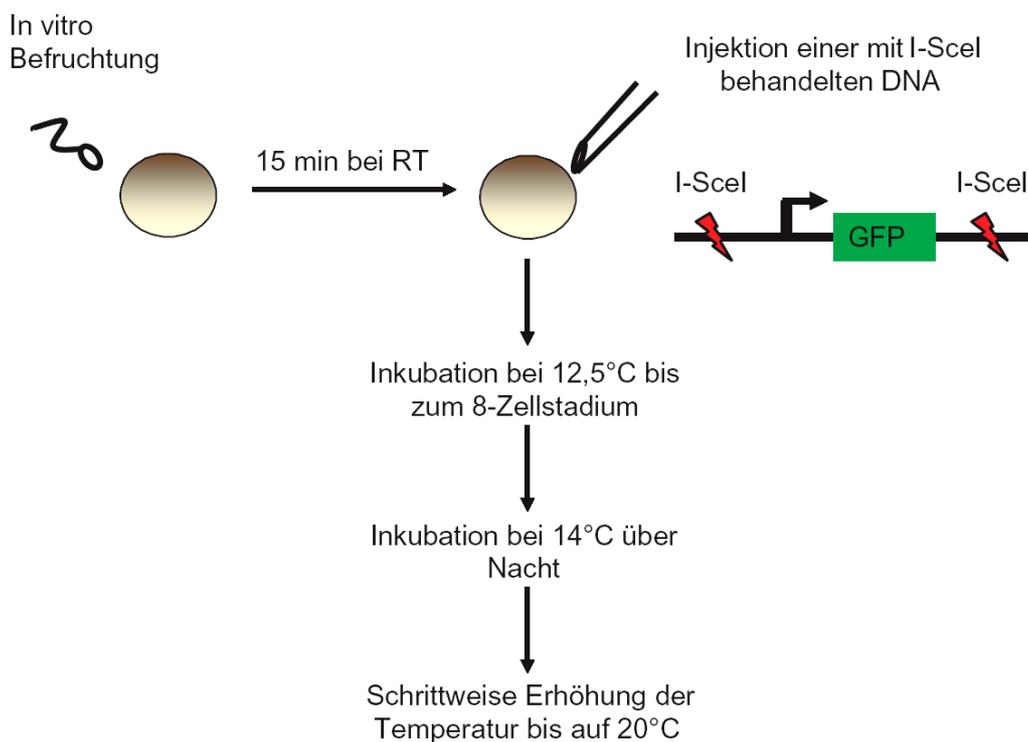


Abb.9: *I-SceI*-Meganuclease vermittelten Transgenese

Die *Xenopus* Eier werden *in vitro* befruchtet und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wird ein Restriktionsansatz aus Plasmid DNA und der *I-SceI*-Meganuklease in unbefruchtete Eizelle injiziert. Die Embryonen werden bis zum Achtzell-Stadium bei 12,5 °C gehalten, dann wird die Temperatur schrittweise bis auf 20°C erhöht.

Die einzelnen Schritte der durch *I-SceI*-Meganuclease vermittelten Transgenese sind in Abb. 9 schematisch dargestellt. Die *Xenopus* Eier wurden *in vitro* befruchtet und 15 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde ein Restriktionsansatz aus Plasmid-DNA und der *I-SceI*-Meganuklease in Embryonen in Einzellstadium injiziert. Die Embryonen wurden bis zum Achtzell-Stadium bei 12,5 °C gehalten, dann wurde die Temperatur schrittweise bis auf 20 °C erhöht.

Für die Tests wurde das Reportergen in einem Vektor zwischen zwei *I-SceI*-

Erkennungssequenzen kloniert. Es wurden zwei unterschiedliche Konstrukte getestet: das von Pan zur Verfügung gestellte SKA:EGFP-Scel-Konstrukt und das CMV:tdTomato-Scel-Konstrukt. Das SKA:EGFP-Scel-Konstrukt ist schematisch in Abb. 11A dargestellt, es enthält den zytoskeletalen Aktin-Promotor des *Xenopus borealis*, der die Expression des grün fluoreszierenden Proteins steuert. Das CMV:tdTomato-Scel-Konstrukt ist in Abb. 11C dargestellt, es beinhaltet das rot fluoreszierende Protein unter der Kontrolle des CMV-Promotors, wie es bereits zur Herstellung des Tom3-Stammes verwendet wurde.

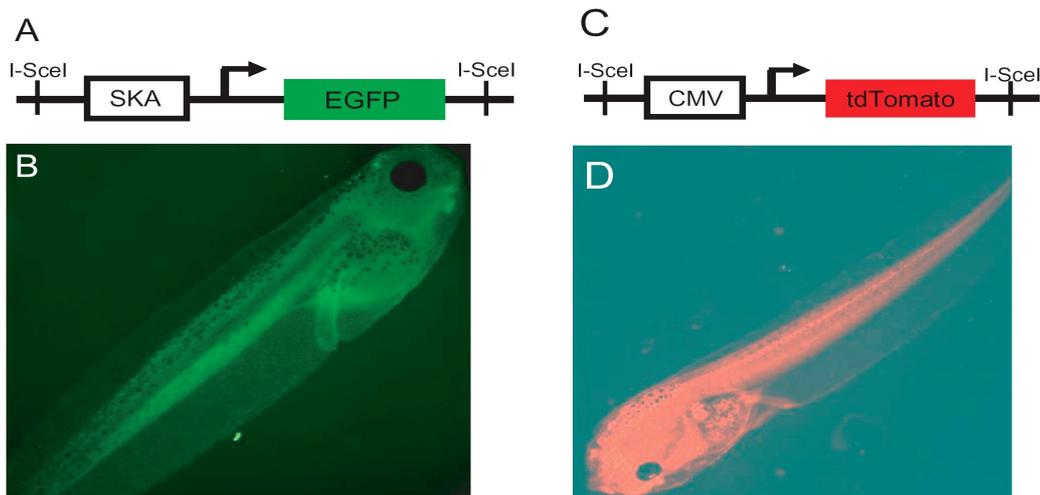


Abb. 11: Expression von EGFP und tdTomato nach I-SceI-Meganuklease vermittelter Transgenese

- A: Das SKA:EGFP-Scel-Konstrukt. I-SceI: Position der Meganuklease-Erkennung-Sequenzen
 B: Freischwimmende Larve mit homogener grüner Fluoreszenz unter dem grünen Fluoreszenz-Filterset.
 C: Das CMV:tdTomato-Scel-Konstrukt. I-SceI: Position der Meganuklease-Erkennung-Sequenzen
 D: Freischwimmende Larve mit homogener roter Fluoreszenz unter dem roten Fluoreszenz-Filterset.

Je Embryo wurden 0,1 ng Plasmid-DNA mit 0,001 U *I-SceI*-Meganuklease injiziert. Das SKA:EGFP-Scel-Konstrukt wurde in 3200 Eier injiziert. 247 Larven (7,7 %) haben sich bis zum Stadium 40 entwickelt, davon wiesen 136 (4,3 %) grüne Fluoreszenz auf. Bei 23 Larven (0,7 %) konnte eine homogene Expression des Transgens beobachtet werden. Damit wurde eine siebenfach höhere Transgeneserate als bei der REMI-Methode erreicht. Die Abb. 11B zeigt ein Beispiel einer freischwimmenden Larve mit einer homogenen grünen Fluoreszenz.

Das CMV:tdTomato-Scel-Konstrukt wurde in 1500 Eier injiziert. 93 Larven (6,2 %) haben sich bis zum Stadium 40 entwickelt, davon wiesen 10 (0,7 %) rote Fluoreszenz auf. Bei 4 Larven (0,3 %) konnte eine homogene Expression des Transgens beobachtet werden. In Abb. 11D ist beispielhaft eine freischwimmende

Larve mit homogener roter Fluoreszenz dargestellt. Bei diesem Konstrukt konnte eine Verdreifachung der Transgeneserate gegenüber der REMI-Methode erreicht werden. In Abb. 12 sind die einzelnen Überlebens- und Transgeneseraten im Vergleich zur REMI-Methode grafisch dargestellt. Mit der durch *I-SceI*-Meganuklease vermittelten Transgenese wurden für unterschiedliche Konstrukte unterschiedliche Transgeneseraten erreicht.

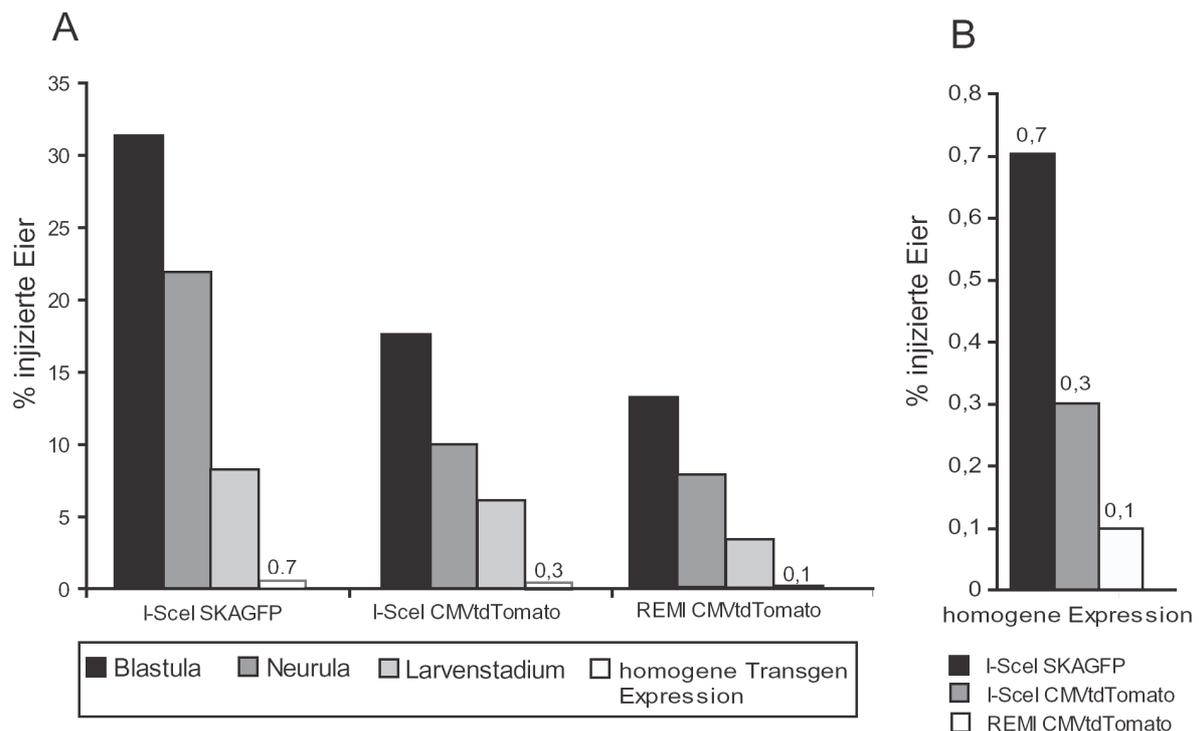


Abb. 12: Vergleich der Überlebens- und Transgeneseeffizienz zwischen der *I-SceI*-Meganuklease vermittelten Transgenese und REMI

Gezeigt sind die Überlebensraten nach Injektion der unten aufgeführten Konstrukte nach der *I-SceI*-Meganuklease vermittelten Transgenese oder nach der REMI-Methode. Dargestellt ist die Prozentzahl der sich normal entwickelten Embryonen in dem Blastula-, Neurula und Larvenstadium bezogen auf die Anzahl der injizierten Eier. Die homogene Transgen-Expression ist als Transgeneseeffizienz zu verstehen.

Um die Methode weiter zu optimieren, wurden unterschiedliche Plasmid- und Enzymkonzentrationen ausgetestet. Zu diesem Zweck wurden zwei Konstrukte benutzt: das HSP:Cre-CMV:TdTomato-*SceI* und das HSP:Flp-CMV:tdTomato-*SceI*. Die Konstrukte enthalten die Cre- oder Flp-Rekombinase unter der Kontrolle des durch Hitze-Schock aktivierbaren HSP-70 und als Selektionsmarker das tdTomato unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Beide Konstrukte wurden bei weiteren Versuchen für die Herstellung der Aktivator-Stämme verwendet. Es wurden 80, 160 oder 200 pg DNA zusammen mit entweder 0,004 oder 0,001 U *I-SceI* pro Ei injiziert.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Bei beiden Konstrukten wurden die besten Ergebnisse bei der Injektion von 160 pg Plasmid-DNA und 0,004 U *I-SceI* per Embryo erreicht. Bei diesen Bedingungen konnte eine homogene Expression des tdTomato bei 1,2 % für das HSP:Flp-CMV:tdTomato-SceI-Konstrukt und 3,4 % für das HSP:Cre-CMV:tdTomato-SceI-Konstrukt der injizierten Embryonen erreicht werden. Der Vergleich der Überlebens- und der Transgeneserate zwischen der REMI-Methode und der durch *I-SceI* Meganuklease vermittelten Transgenese aus der Injektion von 160 pg Plasmid-DNA und 0,004 U *I-SceI* per Embryo ist in Abb. 13 grafisch dargestellt. Damit wurde die Effizienz der Transgenese um das Zehn- bzw. Dreißigfache im Vergleich zur REMI-Methode erhöht.

Konstrukt	DNA pg pro Embryo	I-SceI U pro Embryo	Injizierte Eier N	Überlebensrate		Transgen Expression	
				N	(%)	N	(%)
HSP:Flp-CMV:tdTomato-SceI	80	0,004	443	23	5,2	1	0,2
	160	0,004	686	90	13,1	8	1,2
	200	0,004	627	43	6,9	3	0,5
HSP:Cre-CMV:tdTomato-SceI	80	0,001	461	28	6,1	1	0,2
	160	0,001	570	148	26,0	1	0,2
	200	0,001	535	3	0,6	2	0,4
HSP:Flp-CMV:tdTomato-SceI	80	0,004	416	12	2,9	2	0,5
	160	0,004	386	53	13,7	13	3,4
	200	0,004	745	36	4,8	5	0,7
	80	0,001	386	14	3,6	3	0,8
	160	0,001	311	5	1,6	2	0,6
	200	0,001	496	5	1,0	2	0,4

Tabelle 4: Optimierung der durch *I-SceI*-Meganuklease vermittelten Transgenese

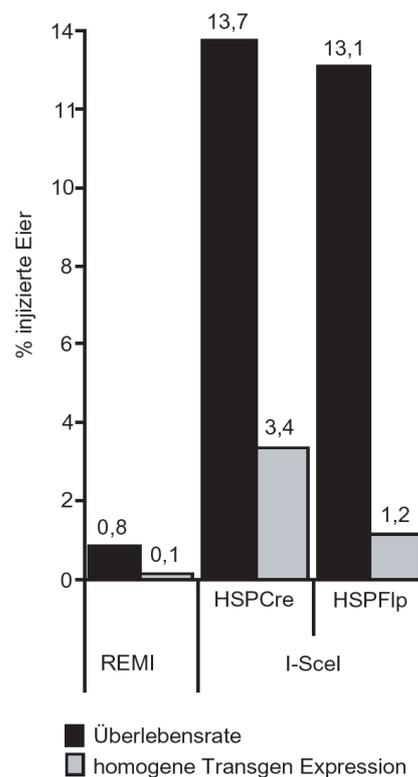


Abb. 13: Vergleich der Überlebens- und Transgeneseffizienz zwischen der optimierten *I-SceI*-Meganuklease vermittelten Transgenese und REMI

Gezeigt sind die Überlebensraten nach Injektion der unten aufgeführten Konstrukte nach der *I-SceI*-Meganuklease vermittelten Transgenese oder nach der REMI-Methode. Dargestellt ist die Prozentzahl der sich normal entwickelten Embryonen im Larvenstadium bezogen auf die Anzahl der injizierten Eier. Die homogene Transgen Expression ist als Transgeneseffizienz zu verstehen.

3.4 Herstellung der Aktivator-Stämme

3.4.1 Herstellung der FLP-Aktivator-Stämme

Für die Herstellung der FLP-Aktivator-Stämme wurde die FLP-Rekombinase unter die Kontrolle des induzierbaren HSP-70-Promotors gestellt. Als Transgenesemarker wurde das tdTomato-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors verwendet. Es wurden drei unterschiedliche Ansätze gemacht. Zuerst wurden die Konstrukte HSP:FLP und CMV:tdTomato verwendet. Da sich hier die beiden Transgene auf zwei unterschiedlichen DNA-Fragmenten befanden, konnten Larven entstehen, die entweder nur die Rekombinase oder nur das rot fluoreszierende Protein enthielten.

Damit war die rote Fluoreszenz alleine als Transgenesemarker für die Rekombinase nicht ausreichend. Das Vorhandensein der FLP-Rekombinase musste zusätzlich durch Genotypisierung aus der Schwanz-DNA bestätigt werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurden beide Gene in ein Plasmid kloniert und es wurde bei nachfolgenden Injektionen das Konstrukt HSP:FLP-CMV:tdTomato verwendet. Bei diesen zwei Ansätzen wurden die Konstrukte mit der REMI-Methode in die Eier injiziert. Als dritter Ansatz wurde das Konstrukt HSP:FLP-CMV:tdTomato-Scel mit der I-SceI-Methode in die Eier injiziert. Bei allen drei Ansätzen wurden für die Befruchtung Spermien eines heterozygoten C5-Männchens, das das Konstrukt CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP enthielt, benutzt. Die Präsenz dieses Reporter-Konstrukts wird durch blaue Fluoreszenz (ECFP) markiert, und durch die Induktion der gelben Fluoreszenz (EYFP) kann die Aktivität der Rekombinase nachgewiesen werden (siehe oben).

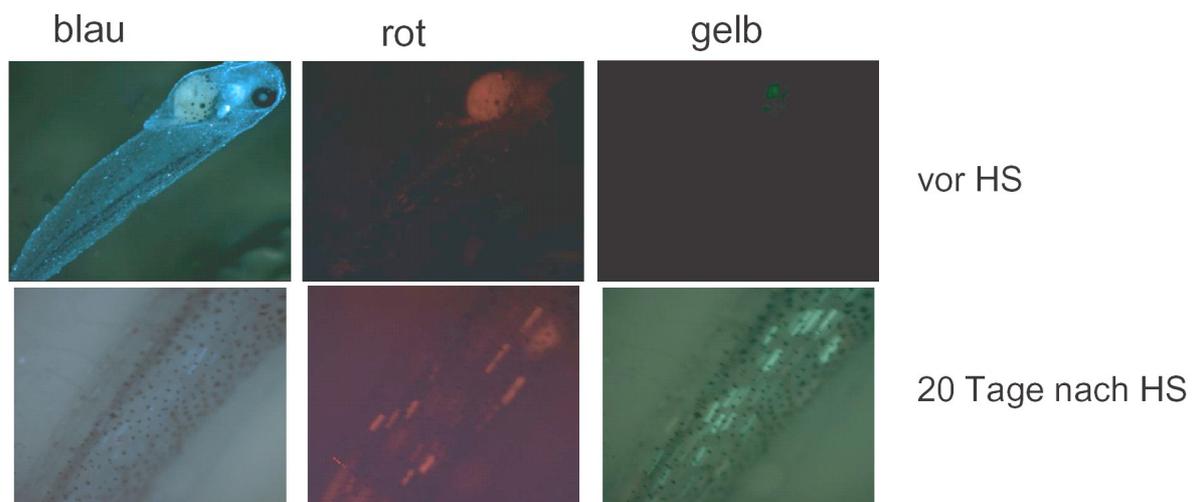


Abb. 14: Überprüfung der Rekombinaseaktivität in dem HSPFLP1-Gründertier

Die Larve ist dargestellt unter blauen, roten und gelben Fluoreszenz-Filterset vor dem Hitze-Schock (oben) und 20 Tage nach dem Hitze-Schock (unten). Die Larve enthält das Reporter-Transgen CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP, angezeigt durch homogene blaue Fluoreszenz und das Aktivator-Transgen HSP:FLP+CMV:tdTomato, angezeigt durch rote Fluoreszenz. Die rote Fluoreszenz konnte nur in wenigen Muskelpaketen im Schwanz detektiert werden. Die Larve weist durch Hitze-Schock induzierbare Rekombinaseaktivität auf, angezeigt durch gelbe Fluoreszenz, die in einzelnen Muskelpaketen im Schwanz detektiert werden kann. HS: Hitze-Schock

Die Konstrukte HSP:FLP und CMV:tdTomato wurden in insgesamt 13100 Eier injiziert. 71 Larven haben sich bis zum Stadium 40 entwickelt, davon wiesen 7 blaue und rote Fluoreszenz, 12 eine rote Fluoreszenz und 19 eine homogene blaue

Fluoreszenz auf. Da sich die beiden Konstrukte auf zwei DNA-Fragmenten befanden, konnte das HSP:FLP-Konstrukt alleine, ohne das rot fluoreszierende Protein, in das Genom integriert worden sein. Aus diesem Grund wurden für die Überprüfung der Rekombinase-Aktivität alle blauen Larven im Stadium 45 Hitze geschockt. Bei einer Larve konnte die Expression des gelb fluoreszierenden Proteins beobachtet werden. Diese Larve wies sowohl rote wie auch blaue Fluoreszenz auf. Die Abb. 14 zeigt diese Larve vor und nach dem Hitze-Schock. Es ist deutlich zu sehen, dass das CMV:tdTomato nur in wenigen Zellen exprimiert wurde und, obwohl die Larve eine homogene blaue Fluoreszenz zeigte, beschränkte sich die gelbe Fluoreszenz auch nur auf wenige Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die Rekombinase nur in wenigen Zellen exprimiert wurde. Diese Larve wurde Gründertier HSPFlp1 genannt, bis zur Geschlechtsreife aufgezogen und mit einem Wildtyp-Männchen gekreuzt. Durch PCR-Analyse der Schwanz-DNA konnte gezeigt werden, dass das HSP:FLP-Transgen auf 10 von 24 der Nachkommen weitergegeben wurde, wogegen das CMV:tdTomato-Transgen nicht weiter vererbt wurde, da keine der 24 Larven rote Fluoreszenz zeigte. Von den zehn HSP:FLP-positiven Larven enthielten sechs zusätzlich das Reporter-Transgen (blaue Fluoreszenz). Nach dem Hitze-Schock konnte bei keiner dieser Larven eine Aktivierung des gelb fluoreszierenden Proteins beobachtet werden. Somit wurde das HSP:FLP-Transgen bei dem HSPFLP1-Stamm auf die F1-Generation weitergegeben, die Expression des gelb fluoreszierenden Proteins konnte aber nicht durch einen Hitze-Schock induziert werden.

Von den nur rot fluoreszierenden Larven wurde eine durch Genotypisierung als HSP:FLP-positiv getestet. Diese Larve wurde als Gründertier HSPFlp2 benannt und bis zur Geschlechtsreife aufgezogen. Da bei diesem Frosch das Reporter-Transgen nicht präsent war (Fehlen der blauen Fluoreszenz), wurde er für die Überprüfung der Rekombinaseaktivität mit einem C5-Weibchen gekreuzt. Dabei wurde die rote Fluoreszenz auf 27 von 62 der Nachkommen weitergegeben. Durch PCR-Analyse konnte gezeigt werden, dass alle rot fluoreszierende Larven HSP:Flp positiv waren. Larven, die sowohl blau als auch rot fluoreszierten, wurden im Stadium 45 Hitze geschockt. Bei keiner dieser Larven konnte eine Aktivierung des gelb fluoreszierenden Proteins beobachtet werden. Die Abb. 15 zeigt ein Beispiel einer freischwimmenden Larve aus der F1-Generation des HSPFLP2-Stamms vor und nach dem Hitze-Schock. Wie bei dem HSPFLP1-Stamm wurde auch in diesem Fall das HSP:FLP-Transgen auf die F1-Generation weitergegeben, die Expression des gelb

fluoreszierenden Proteins konnte aber nicht durch einen Hitze-Schock induziert werden.

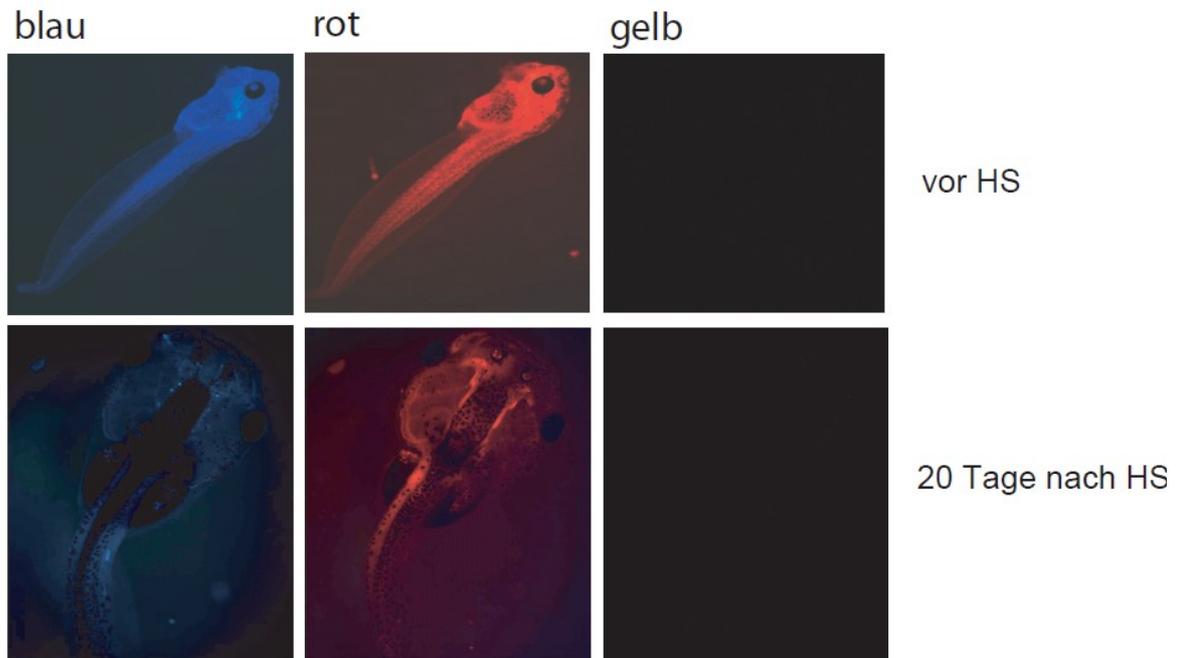


Abb. 15: Überprüfung der Rekombinaseaktivität des HSPFLP2-Stamms in der F1-Generation

Larve aus der Kreuzung von HSPFLP2-Gründertier mit einem C5-Weibchen. Die Larve ist gezeigt unter blauen, roten und gelben Fluoreszenz-Filterset vor dem Hitze-Schock (oben) und 20 Tage nach dem Hitze-Schock (unten). Die Larve enthält das Reporter-Transgen CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP, angezeigt durch homogene blaue Fluoreszenz und das Aktivator-Transgen HSP:FLP+CMV:tdTomato, angezeigt durch homogene rote Fluoreszenz. Die Larve weist keine Rekombinaseaktivität nach dem Hitze-Schock auf, da keine gelbe Fluoreszenz detektiert wurde.

Das Konstrukt HSP:FLP-CMV:tdTomato wurde nach der REMI-Methode und das Konstrukt HSP:FLP-CMV:tdTomato-Scel nach der I-Scel-Methode in Xenopus Eier injiziert. Die daraus resultierenden Larven wurden nach gleichem Muster wie bei der Injektion der Konstrukte HSP:FLP und CMV:tdTomato auf die Rekombinase-Aktivität getestet. Die Ergebnisse aus allen drei Ansätzen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Bei der Injektion des HSP:FLP-CMV:tdTomato-Konstrukts wurde das HSPFlp3-Gründertier identifiziert. Durch Kreuzung mit einem C5-Männchen entwickelten sich 33 Larven bis zum Schwanzknospen-Stadium. Bei keiner dieser Larven wurde eine rote Fluoreszenz beobachtet. Somit wurde das Transgen von den HSPFLP3-Weibchen nicht auf die F1-Generation vererbt.

Konstrukte	Methode	Anzahl		Fluoreszenz		Gründertiere	Geschlecht	Rekombinase in F1		
		Eier	Larven	Farbe	Larven			PCR	p-Wert	Funktion
HSP:Flp + CMV:tdTomato	REMI	13000	71	blau + rot	7	HSPFlp1	weiblich	pos in 10/24	0,41	neg
				rot	12	HSPFlp2	männlich	pos in 27/62	0,31	neg
				blau	19					
HSP:Flp-CMV:tdTomato	REMI	15500	70	blau + rot	9					
				rot	4	HSPFlp3	weiblich	neg		neg
				blau	26					
HSP:Flp-CMV:tdTomato-Scel	I-Scel	3690	351	blau + rot	1					
				rot	14	HSPFlp4	weiblich	n.t		n.t
						HSPFlp5	männlich	n.t		n.t
		blau	67							

Tabelle 5: Zusammenstellung der FLP-Aktivator-Gründertiere.

nt: nicht getestet / neg bei PCR: Das DNA-Fragment wurde bei keiner getesteten Larve nachgewiesen. / neg bei Funktion: Gelbe Fluoreszenz wurde in keiner getesteten Larve induziert. / Der p-Wert wurde mit dem Chi²-Test berechnet.

Bei der Injektion des HSP:FLP-CMV:tdTomato-Scel-Konstrukts wurden die Gründertiere HSPFLP4 und HSPFLP5 identifiziert. Beide Tiere haben die Geschlechtsreife noch nicht erreicht und konnten nicht weiter untersucht werden.

Bei der Herstellung eines FLP-Aktivator-Stamms konnte in keiner Larve eine homogene Expression von EYFP induziert werden. Zwei der Gründertiere vererbten das Rekombinasegen auf die F1-Generation, die Expression von FLP konnte aber nicht aktiviert werden. Somit ist es nicht gelungen, einen Aktivator-Stamm mit induzierbarer FLP-Rekombinase unter der Kontrolle des HSP-70 zu generieren.

3.4.2 Herstellung der Cre-Aktivator-Stämme

Die Herstellung der Cre-Aktivator-Stämme verlief nach gleichem Versuchsmuster wie die Herstellung der FLP-Aktivator-Stämme. Auch hier wurden drei Ansätze gemacht, wobei in den Konstrukten anstelle der FLP-Rekombinase die Cre-Rekombinase benutzt wurde. Das Konstrukt HSP:Cre wurde zusammen mit dem Konstrukt CMV:tdTomato nach der REMI-Methode in Xenopus Eier injiziert. Nach der gleichen Methode wurde auch das Konstrukt HSP:Cre-CMV:tdTomato eingesetzt. Als dritter Ansatz wurde das Konstrukt HSP:Cre-CMVtdTomato-Scel nach der I-Scel-Methode injiziert. Die Ergebnisse aus allen drei Ansätzen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Konstrukte	Methode	Anzahl		Fluoreszenz		Gründertiere	Geschlecht	Rekombinase in F1		
		Eier	Larven	Farbe	Larven			PCR	p-Wert	Funktion
HSP:Cre + CMV:tdTomato	REMI	27500	153	blau + rot	24	HSPCre3	weiblich	neg		neg
				rot	18					
				blau	39	HSPCre1	weiblich	pos in 14/35	0,24	pos in 6/14
						HSPCre2	männlich	n.t		n.t
						HSPCre4	männlich	neg		neg
HSP:Cre-CMV:tdTomato	REMI	12800	58	blau + rot	3	HSPCre5	weiblich	neg		neg
				rot	6	HSPCre6	männlich	neg		neg
				blau	20					
HSP:Cre-CMV:tdTomato-Scel	I-Scel	4143	145	blau + rot	10	HSPCre14	männlich	neg		neg
						HSPCre15	weiblich	n.t		n.t
				rot	17	HSPCre7	weiblich	neg		neg
						HSPCre8	weiblich	neg		neg
						HSPCre9	weiblich	n.t		n.t
						HSPCre10	weiblich	neg		neg
						HSPCre11	weiblich	neg		neg
						HSPCre12	weiblich	n.t		n.t
				HSPCre13	männlich	pos in 14/31	0,59	pos in 7/14		
blau	20									

Tabelle 6: Zusammenstellung der Cre-Aktivator-Gründertiere.

nt: nicht getestet / neg bei PCR: Das DNA-Fragment wurde bei keiner getesteten Larve nachgewiesen. / neg bei Funktion: Gelbe Fluoreszenz wurde in keiner getesteten Larve induziert. / Der p-Wert wurde mit dem Chi²-Test berechnet.

Nach der Injektion der Konstrukte HSP:Cre und CMV:tdTomato wurde bei drei Larven mit nur blauer Fluoreszenz und einer Larve mit blauer und roter Fluoreszenz die Induktion der Expression des gelben Fluoreszenzproteins beobachtet. Diese Larven wurden als Gründertiere HSPCre1-4 benannt. Die Abb. 16A zeigt ein Beispiel einer freischwimmenden Larve mit blauer Fluoreszenz und die Abb. 16B einer Larve mit blauer und roter Fluoreszenz vor und nach dem Hitze-Schock.

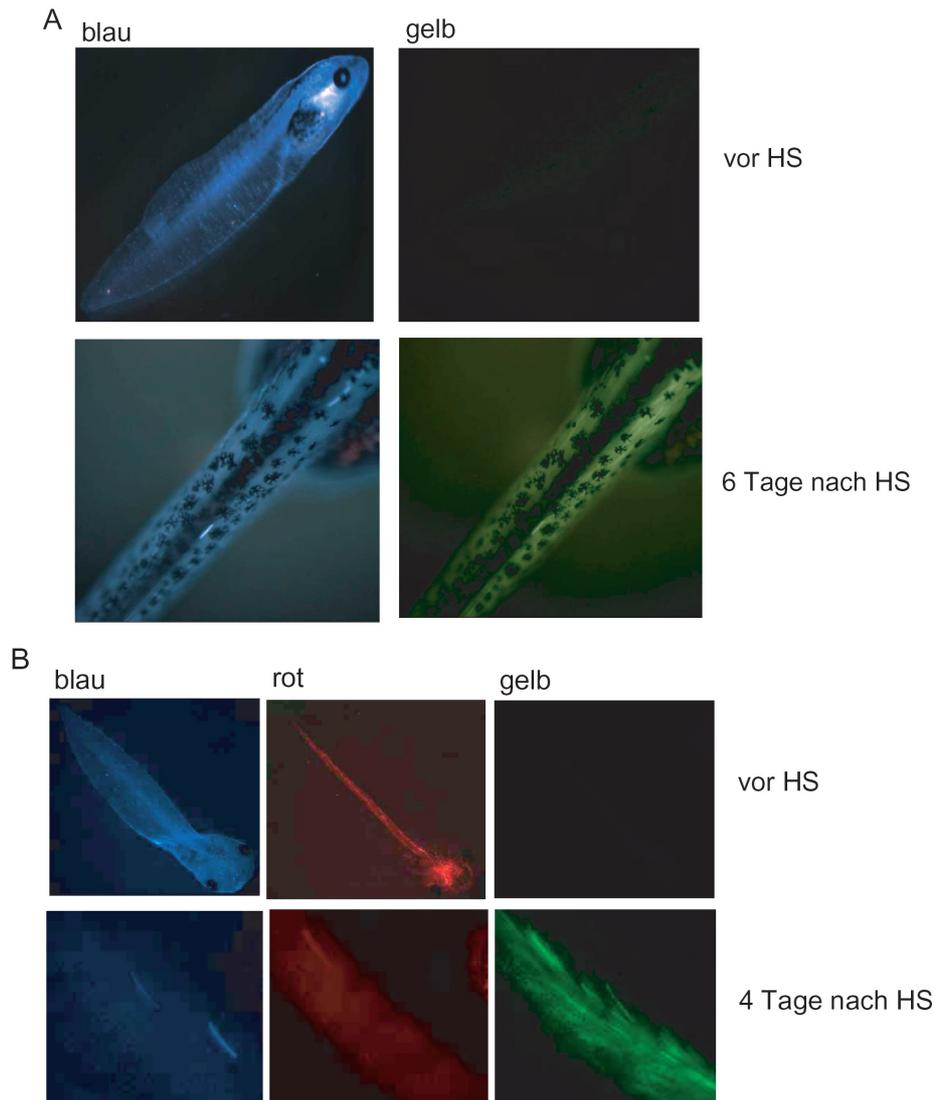


Abb.16: Überprüfung der Rekombinaseaktivität in den HSPCre-Gründertieren

A: Die Larve ist dargestellt unter blauen und gelben Fluoreszenz-Filterset vor dem Hitze-Schock (oben) und 6 Tage nach dem Hitze-Schock (unten). Die Larve enthält das Reporter-Transgen CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP, angezeigt durch homogene blaue Fluoreszenz und weist durch Hitze-Schock induzierbare Rekombinaseaktivität auf, angezeigt durch gelbe Fluoreszenz.

B: Die Larve ist dargestellt unter blauen, roten und gelben Fluoreszenz-Filterset vor dem Hitze-Schock (oben) und 4 Tage nach dem Hitze-Schock (unten). Die Larve enthält das Reporter-Transgen CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP, angezeigt durch homogene blaue Fluoreszenz und das Aktivator-Transgen HSP:Cre+CMV:tdTomato, angezeigt durch rote Fluoreszenz und weist durch Hitze-Schock induzierbare Rekombinaseaktivität auf, angezeigt durch gelbe Fluoreszenz.

In beiden Fällen wurde die gelbe Fluoreszenz einige Tage nach dem Hitze-Schock eindeutig detektiert, während vor dem Hitze-Schock keine gelbe Fluoreszenz erkennbar war. Die Tiere HSPCre1, HSPCre3 und HSPCre4 wurden bis zur Geschlechtsreife aufgezogen. Da alle drei Tiere das Reporter-Transgen enthielten (blaue Fluoreszenz), wurden sie mit einem Wildtyp-Frosch gekreuzt. Das HSPCre1-Tier vererbte das Rekombinase-Gen auf seine Nachkommen weiter. Bei Genotypisierung aus der Schwanz-DNA wurden 14 von 35 Larven als HSP:Cre-positiv getestet. 6 Cre-positive Larven hatten zusätzlich das Reporter-Transgen (blaue Fluoreszenz). Bei diesen 6 Larven konnte nach dem Hitze-Schock gelbe Fluoreszenz induziert werden. Damit wurde ein Stamm mit einer durch Hitze-Schock induzierbaren Cre-Rekombinase, der HSPCre1-Stamm, generiert. Die Gründertiere HSPCre3 und HSPCre4 vererbten das Transgen nicht auf die F1-Generation. Das HSPCre2-Tier hat die Geschlechtsreife noch nicht erreicht und konnte nicht weiter untersucht werden.

Nach der Injektion des Konstrukts HSP:Cre-CMV:tdTomato konnten zwei Gründertiere identifiziert werden, HSPCre5 und HSPCre6. Durch Kreuzung wurde festgestellt, dass beide Tiere das Transgen nicht auf die F1-Generation vererbten.

Mit der I-SceI-Methode wurden weiter 9 Gründertiere generiert, die als HSPCre7-15 benannt worden sind.

Bei dem Gründertier HSPCre13 wurde nach Kreuzung mit einem C5-Weibchen bei 14 von 31 Larven rote Fluoreszenz und damit gleichzeitig die Präsenz der Cre-Rekombinase detektiert. 7 der rot fluoreszierenden Larven hatten zusätzlich das Reporter-Transgen (blaue Fluoreszenz). Bei allen 7 Larven konnte durch Hitze-Schock gelbe Fluoreszenz induziert werden.

Die Abb. 17 zeigt eine freischwimmende Larve aus der F1-Generation 3 Tage nach dem Hitze-Schock. Die gelbe Fluoreszenz konnte eindeutig detektiert werden. Damit wurde ein weiterer Stamm mit einer durch Hitze-Schock induzierbaren Cre-Rekombinase, der HSPCre13-Stamm, generiert.

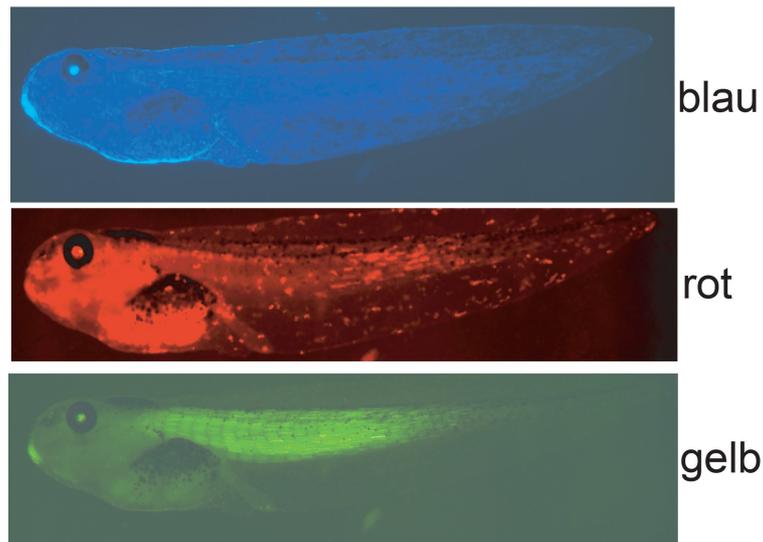


Abb. 17: Überprüfung der Rekombinaseaktivität in dem HSPCre13-Stamm in der F1-Generation

Larve aus der Kreuzung von HSPCre13-Gründertier mit einem C5-Weibchen. Die Larve ist gezeitigt unter blauen, roten und gelben Fluoreszenz-Filterset 3 Tage nach dem Hitze-Schock. Die Larve enthält das Reporter-Transgen CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP, angezeigt durch homogene blaue Fluoreszenz und das Aktivator-Transgen HSP:Cre-CMV:tdTomato, angezeigt durch rote Fluoreszenz und weist durch Hitze-Schock induzierbare Rekombinaseaktivität auf, angezeigt durch gelbe Fluoreszenz

Die Gründertiere HSPCre7, HSPCre8, HSPCre10, HSPCre11 und HSPCre14 vererben das Rekombinase-Gen nicht auf die F1-Generation. Die Tiere HSPCre9, HSPCre12 und HSPCre15 haben die Geschlechtsreife noch nicht erreicht und konnten nicht weiter untersucht werden.

Die Expression der Cre-Rekombinase wurde in mehreren Larven durch einen Hitze-Schock induziert. Dies wurde durch eine homogene Expression des EYFP detektiert. Zwei dieser Tiere vererben die induzierbare Cre-Rekombinase auf die F1-Generation. Somit ist es gelungen, zwei Aktivator-Stämme mit induzierbarer Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des HSP-70 zu generieren, den HSPCre1-Stamm mit dem HSP:Cre-Transgen und den HSPCre13-Stamm mit dem HSP:Cre-CMV:tdTomato-Transgen.

3.5 Charakterisierung des HSPCre1-Aktivator-Stamms

Für weitere Untersuchungen des HSPCre1-Stamms wurde ein Männchen aus der F1-Generation gewählt, welches nur das Rekombinase-Gen nicht aber das Reporter-Transgen enthielt. Das Männchen wurde mit einem C5-Reporter-Weibchen gekreuzt.

Da bei der Herstellung der Aktivator-Stämme die Larven erst im Stadium 45 als freischwimmende Larve Hitze geschockt wurden, sollte überprüft werden, ob die Expression der Cre-Rekombinase auch in frühen Entwicklungsstadien induziert werden kann. Um sicherzustellen, dass die Expression der Cre-Rekombinase nicht vorzeitig induziert wird, wurden die Nachkommen bis zum Hitze-Schock bei 16 °C gehalten. Die Larven wurden im Stadium 9 (späte Blastula), 11 (Gastrula), 13 (frühe Neurula), 19 (späte Neurula) und 30 (Schwanzknospen-Stadium) Hitze geschockt. Die Induktion einer homogenen Expression des gelb fluoreszierenden Proteins wurde in freischwimmenden Larven detektiert, unabhängig von dem Stadium, in dem die Larven Hitze geschockt wurden. Durch PCR-Analyse aus der Schwanz-DNA wurde gezeigt, dass nur in Cre-positiven Larven gelbe Fluoreszenz induziert werden konnte. Diese Korrelation ist in Abb. 18 deutlich zu sehen. In Cre-positiven nicht Hitze geschockten Larven wurde nie eine ubiquitäre gelbe Fluoreszenz detektiert. Es wurde gezeigt, dass in den HSPCre1-Aktivator-Stamm die Expression der Rekombinase bereits ab dem Blastula-Stadium induziert werden kann.

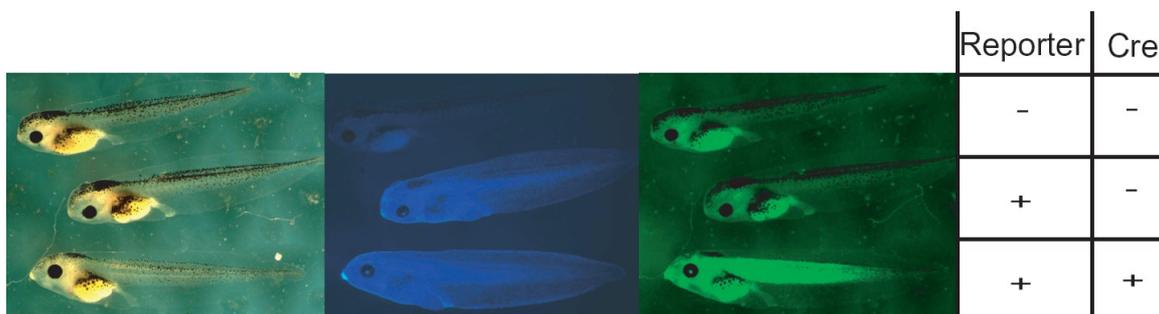


Abb. 18: Überprüfung der Rekombinaseaktivität in dem HSPCre1-Stamm in der F2-Generation

Dargestellt sind drei Larven aus der Kreuzung von HSPCre1-Männchen aus der F1-Generation mit einem C5-Weibchen. Die Larven sind gezeigt unter Normallicht und blauen und gelben Fluoreszenz-Filterset 5 Tage nach dem Hitze-Schock. Zwei der Larven enthalten das Reporter-Transgen CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP, angezeigt durch homogene blaue Fluoreszenz. Eine dieser Larven weist durch Hitze-Schock induzierbare Rekombinaseaktivität auf, angezeigt durch gelbe Fluoreszenz. Dies korreliert mit der Präsenz des Cre-Gens.

Um den Zeitabstand zwischen dem Hitze-Schock und der Cre-vermittelten Rekombination der Reporter-DNA zu bestimmen, wurde die Rekombination des Reporter-Konstrukts CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP durch PCR-Analyse untersucht. Die Position der Primer ist im Abb. 19A durch Pfeile gekennzeichnet. Das Primerpaar wurde so gewählt, dass bei dem nativen C5-Transgen ein 1267 bp großes DNA-Fragment und bei dem rekombinierten C5-Transgen ein 202 bp großes Fragment amplifiziert wurde. Für diese Untersuchung wurden die Embryonen im Stadium 13

Hitze geschockt. Die Embryonen wurden vor sowie eine, zwei, drei und vier Stunden nach Beginn des Hitze-Schocks eingefroren. Die DNA wurde aus dem ganzen Embryo gewonnen. In Abb. 19B ist das Ergebnis der PCR-Analyse dargestellt.

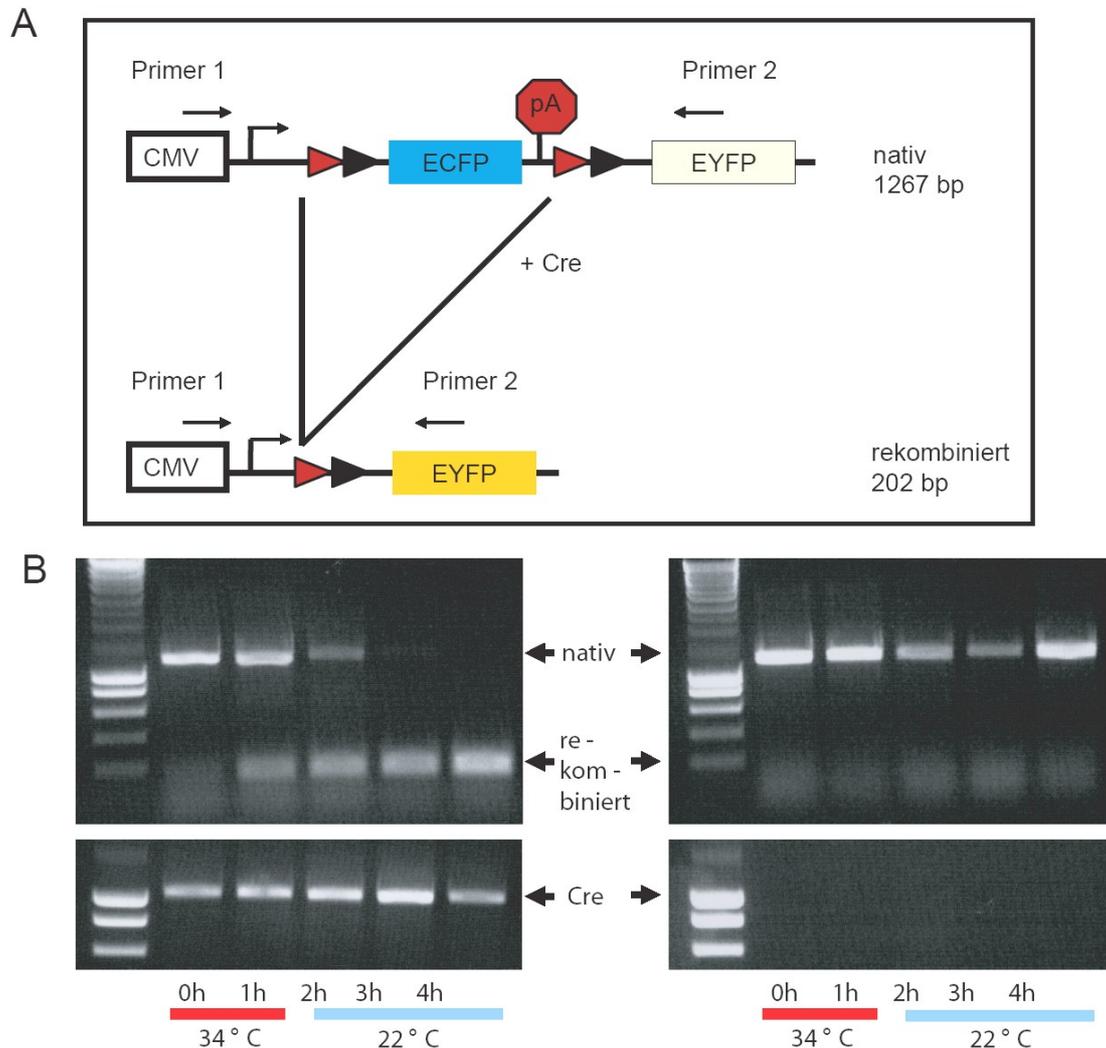


Abb. 19: Hitze-Schock induzierbare Cre-Aktivität in dem HSPCre1-Stamm

A: Rekombination des Reporter-Transgens. Die Position der Primer ist durch Pfeile gekennzeichnet. Bei nativem Transgen wird ein 1267bp langes DNA-Fragment amplifiziert und bei rekombiniertem Transgen ein 202bp langes DNA-Fragment.

B: Zeitkurve der durch die Cre-Rekombinase vermittelten Rekombination nach dem Hitze-Schock bei Cre positiven (linke Seite) und Cre negativen Larven (rechte Seite). Die Zeit ist unten angegeben. Das rekombinierte DNA-Fragment wurde bereits eine Stunde ab Beginn des Hitze-Schocks bei Cre positiven Larven amplifiziert, wurde aber bei den Cre negativen Larven zu keinem Zeitpunkt detektiert.

Es ist deutlich zu sehen, dass in Cre-positiven Embryonen bereits eine Stunde nach Beginn des Hitze-Schocks das rekombinierte DNA-Fragment amplifiziert werden kann und vier Stunden nach dem Hitze-Schock das native DNA-Fragment nicht mehr amplifiziert werden kann. In Cre-negativen Embryonen konnte das rekombinierte

DNA-Fragment zu keinem Zeitpunkt amplifiziert werden. In dem HSPCre1-Stamm ist die Cre-Rekombinase bereits eine Stunde ab Beginn des Hitze-Schocks aktiv und die Rekombination des C5-Transgens vier Stunden ab Beginn des Hitze-Schock vollständig. Dies gilt auch, wenn die Embryonen im Stadium 9, 11, 19 oder 30 Hitze geschockt werden (Daten nicht gezeigt).

Um den Zeitabstand zwischen dem Hitze-Schock und der Expression des gelb fluoreszierenden Proteins zu bestimmen, wurden freischwimmende Larven im Stadium 37 Hitze geschockt und anschließend ihre Augen nach gelber Fluoreszenz untersucht.

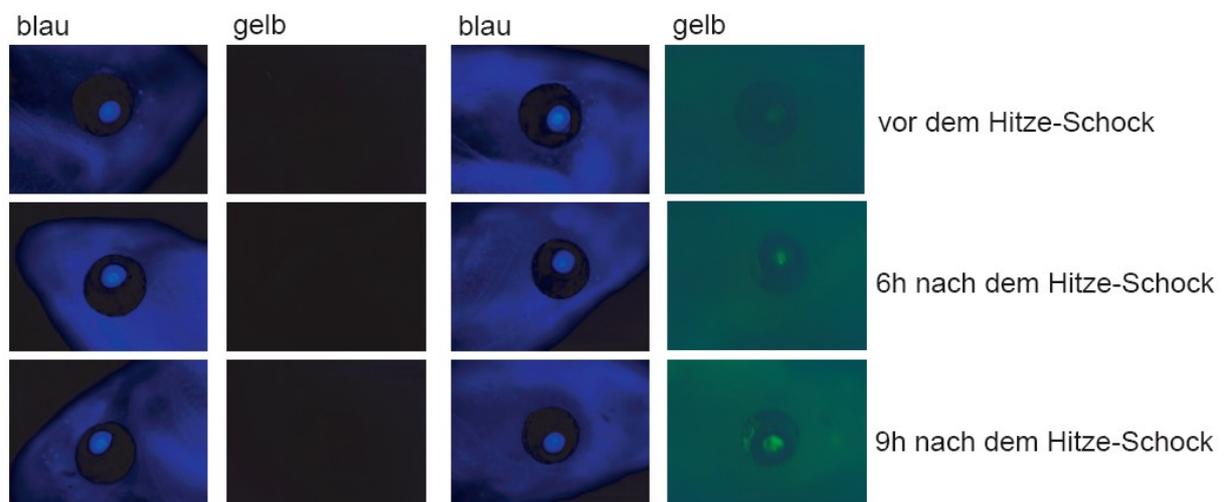


Abb. 20: Hitze-Schock induzierbare EYFP-Expression in dem HSPCre1-Stamm

Dargestellt ist eine Cre positive Larve (rechte Seite) und eine Cre negative Larve (linke Seite) aus der Kreuzung von HSPCre1-Männchen aus der F1-Generation mit einem C5-Weibchen. Die Larven sind gezeigt unter blauen und gelben Fluoreszenz-Filterset vor und nach dem Hitze-Schock. Die Zeiten sind angegeben. Beide Larven enthalten das Reporter-Transgen CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP, angezeigt durch homogene blaue Fluoreszenz. Die Cre positive Larve weist 6 Stunden nach dem Hitze-Schock gelbe Fluoreszenz im Auge auf. Diese wird mit der Zeit immer intensiver und erreicht ihr Maximum 9 Stunden nach dem Hitze-Schock. Bei der Cre negativen Larve wurde zu keinem Zeitpunkt gelbe Fluoreszenz detektiert.

In der Abb. 20 sind die Augen einer Hitze geschockten Cre-positiven Larve (rechte Seite) sowie einer Cre-negativen Larve (linke Seite) unter dem blauen und gelben Fluoreszenz Filterset zu sehen. Die gelbe Fluoreszenz wurde sechs Stunden nach Beginn des Hitze-Schocks im Auge detektiert. Die Fluoreszenz wurde mit der Zeit stärker und erreichte ihr Maximum neun Stunden nach Beginn des Hitze-Schocks. Wie in Abb. 21 gezeigt, wurde bei 5 von 20 Cre-positiven Larven die gelbe Fluoreszenz im Auge bereits vor dem Hitze-Schock detektiert. Dies deutet drauf hin, dass die Rekombinase in diesen 5 Larven bereits vor dem Hitze-Schock exprimiert

wurde. Es muss sich jedoch nur um eine auf das Auge beschränkte Expression handeln, da die gelbe Fluoreszenz vor dem Hitze-Schock in keinem weiteren Körperteil detektiert werden konnte.

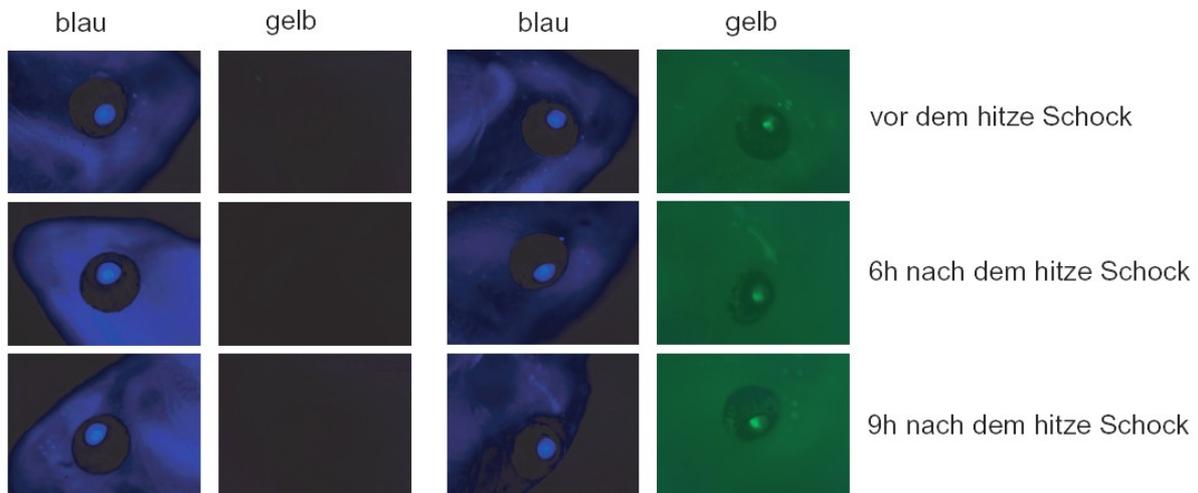


Abb. 21: Expression von EYFP in dem HSPCre1-Stamm ohne Hitze-Schock

Dargestellt ist eine Cre positive Larve (rechte Seite) und eine Cre negative Larve (linke Seite) aus der Kreuzung von HSPCre1-Männchen aus der F1-Generation mit einem C5-Weibchen. Die Larven sind gezeigt unter blauen und gelben Fluoreszenz-Filterset vor und nach dem Hitze-Schock. Die Zeiten sind angegeben. Beide Larven enthalten das Reporter-Transgen CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP, angezeigt durch homogene blaue Fluoreszenz. Die Cre positiven Larve weist bereits vor dem Hitze-Schock gelbe Fluoreszenz im Auge auf. Bei der Cre negativen Larve wurde zu keinem Zeitpunkt gelbe Fluoreszenz detektiert.

Die Cre-Rekombinase konnte bereits in der Blastula, Stadium 9, durch ein Hitze-Schock induziert werden. Die Rekombination des Reporter-Konstrukts wurde bereits eine Stunde ab Beginn des Hitze-Schocks detektiert und war 4 Stunden ab Beginn des Hitze-Schocks vollständig. Das gelb fluoreszierende Protein wurde 4 Stunden ab Beginn des Hitze-Schocks im Auge detektiert.

3.6 Herstellung der Effektor-Stämme

Für den Effektor-Stamm wurde als Zielgen der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 β verwendet. Es wurden drei unterschiedliche Konstrukte kloniert, die in Abb. 22A schematisch in ihrem nativen Zustand dargestellt sind. Wie in dem C5-Stamm detektiert auch hier die Expression von ECFP die Präsenz des Transgens. Stromabwärts des ECFP-Gens ist ein Terminationsstopp integriert, der

die Expression des Zielgens verhindert. Das ECFP-Gen und der Terminationsstopp sind durch loxP- und FRT- Sequenzen flankiert und können nach Kreuzung mit einem Aktivator-Stamm durch Cre- oder FLP-Rekombinasen ausgeschnitten werden. Nach einer erfolgreichen Rekombination wird die Expression des Zielgens, das für das HNF1 β -wt, die P328L329del- oder die A263insGG-Mutation kodiert, aktiviert.

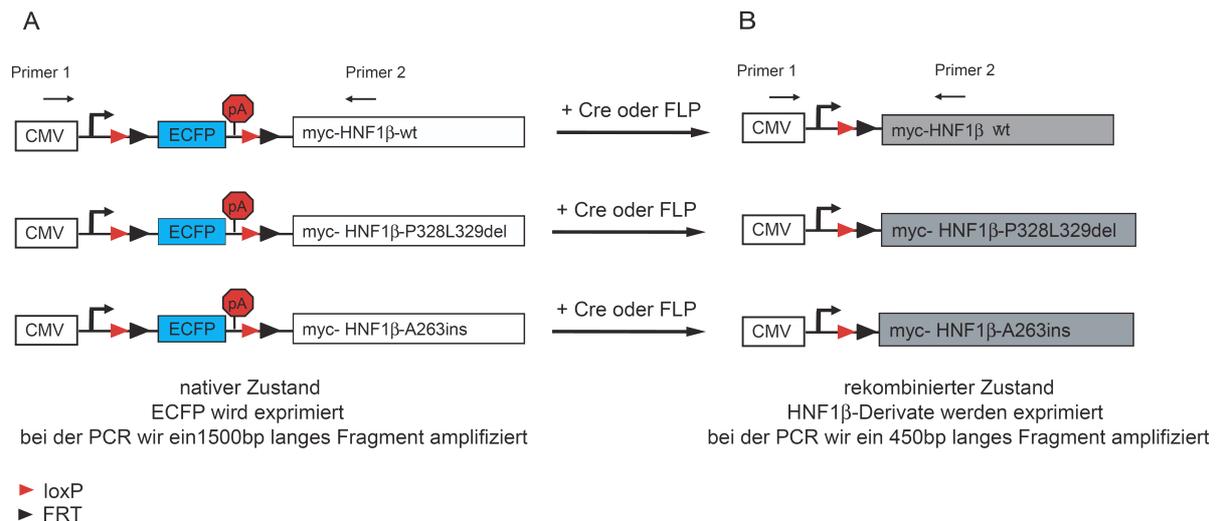


Abb. 22: Effektor-Konstrukte für die durch Rekombinase aktivierbare Expression von HNF1 β Derivaten.

A: Die Effektor-Konstrukte im nativen Zustand. Der CMV Promotor steuert die Expression des blau fluoreszierenden Proteins (ECFP). Das ECFP-Gen und der stromabwärts integrierter Terminationsstopp sind durch loxP- (rotes Dreieck) und FRT-Sequenzen (schwarzes Dreieck) flankiert und können durch Cre- oder FLP-Rekombinase ausgeschnitten werden.

B: Die Effektor-Konstrukte im rekombinierten Zustand. Durch die Rekombination wird das HNF1 β -wt, HNF1 β -P328L329del und HNF1 β -A263ins direkt unter die Kontrolle des CMV Promotors gestellt und exprimiert.

Die Abb. 22B zeigt die Effektor-Konstrukte in rekombinierten Zustand. Durch geschickte Wahl des Primerpaars kann die Rekombination auf der DNA-Ebene nachgewiesen werden. Die Position der Primer ist im Abb. 22 durch Pfeile gekennzeichnet. Das Primerpaar wurde so gewählt, dass bei einem nativen Transgen ein 1500 bp großes DNA-Fragment und bei einem rekombinierten Transgen ein 450 bp großes Fragment amplifiziert wird. Da sich das HNF1 β -, das P328L329del- und das Ains263GG-Gen nur in der 3' Region unterscheiden, wurden die Primer so gewählt, dass sie für alle drei Konstrukte verwendet werden können.

3.6.1 Herstellung des Effektor-Stamms *263ins-6*

Zu Beginn der Arbeit waren der *wt-2*-Stamm und der *328del-4*-Stamm bereits etabliert (Kallal Promanik, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen). Es waren auch zwei Gründertiere mit dem Konstrukt CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1 β -A263ins vorhanden. Diese wurden als *263ins-1* und *236ins-2* benannt. Nach Kreuzung mit Wildtyp-Fröschen wurde bei keinen der Nachkommen blaue Fluoreszenz detektiert. Somit vererbte weder das *263ins-1*-Tier noch das *263ins-2*-Tier das Effektor-Transgen auf die F1-Generation. Aus diesem Grund wurden weitere *263ins*-Gründertiere generiert. Das Konstrukt CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1 β -A263ins wurde in 6240 *Xenopus laevis* Eier injiziert. 342 Embryonen entwickelten sich bis zum Schwanzknospfen-Stadium, wovon 84 eine Expression des blauen Fluoreszenzproteins aufwiesen. Von den fluoreszierenden Larven konnten sechs geschlechtsreife Frösche aufgezogen werden, die als Gründertier *263ins-3* bis *263ins-8* genannt worden sind. Nach Kreuzung mit Wildtyp-Fröschen wurde bei 50 % der Nachkommen des Gründertiers *263ins-6* blaue Fluoreszenz detektiert. Demzufolge ist das *263ins-6*-Gründertier in dem Effektor-Transgen heterozygot. Die anderen 5 Gründertiere vererbten das Effektor-Transgen nicht auf die F1-Generation weiter. Die Abb. 23A zeigt ein Beispiel einer freischwimmenden Larve aus der Gründergeneration und 23B ein Beispiel einer freischwimmenden Larve aus der F1-Generation des *263ins-6*-Stamms. Beide Larven zeigten eine homogene blaue Fluoreszenz.

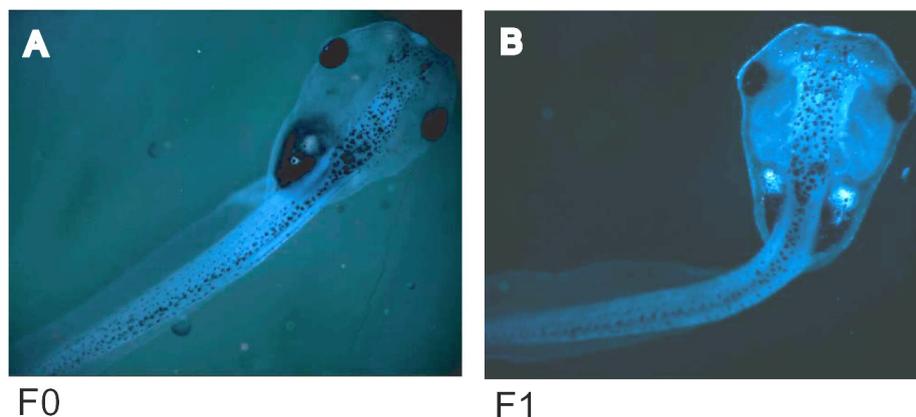


Abb. 23: Effektor-Stamms *ins263-6*

Dargestellt sind das *ins263-6* Gründertier (A) und eine Larve des *Ins263-6*-Stamms aus der F1-Generation (B) unter dem blauen Fluoreszenz-Filtersets. Beide Larven beinhalten das Effektor-Transgen CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1 β -A263insGG angezeigt durch homogene blaue Fluoreszenz.

Alle aus diesen Versuchen resultierenden Gründertiere sind in Tabelle 7 aufgelistet. Somit konnten für weitere Untersuchungen des Transkriptionsfaktors HNF1 β erfolgreich die drei Effektor-Stämme wt2, 328del-4 sowie 263ins-6 eingesetzt werden.

ins263-Gründertiere		
Bezeichnung	Geschlecht	Fluoreszenz in der F1-Generation
ins263-1	weiblich	nein
ins263-2	männlich	nein
ins263-3	männlich	nein
ins263-4	weiblich	nein
ins263-5	weiblich	nein
ins263-6	weiblich	ja
ins263-7	männlich	nein
ins263-8	weiblich	nein

Tabelle 7: Zusammenstellung der ins263-Gründertiere

3.7 Durch Hitze-Schock induzierbare Überexpression von HNF1 β -wt sowie der Mutanten P328L329del und Ains263GG

Für die Überexpression von HNF1 β und der zwei Derivaten P328L329del und Ains263GG wurde jeweils ein Effektor-Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1-Männchen gekreuzt.

Die Präsenz des Effektor-Gens wird durch blaue Fluoreszenz markiert. Da die Expression von ECFP durch den ubiquitär aktiven CMV-Promotor gesteuert wird, enthalten die Eier der Effektor-Weibchen maternales ECFP und fluoreszieren blau. Das maternale ECFP ist nur begrenzte Zeit stabil, folglich geht die blaue Fluoreszenz in nicht transgenen Embryonen im Laufe der Entwicklung verloren. In transgenen Embryonen wird dagegen ab Beginn der zygotischen Transkription endogenes ECFP exprimiert, sodass die blaue Fluoreszenz erhalten bleibt. Ab den späten Schwanzknospen-Stadium (Stadium 36) können dann die transgenen Larven aufgrund der blauen Fluoreszenz selektiert werden.

Das HSPCre1-Männchen hat als Aktivator-Transgen das Konstrukt HSP:Cre. Hier

kontrolliert der durch Hitze-Schock aktivierbare Promotor die Expression der Cre-Rekombinase. Um sicherzustellen, dass die Expression der Cre-Rekombinase nicht vorzeitig induziert wird, wurden die Nachkommen bis zum Hitze-Schock bei 16 °C gehalten.

3.7.1 Durch Hitze-Schock induzierbare Überexpression von Ains263GG

Für die Überexpression der HNF1 β -Mutante Ains263GG wurde ein heterozygoten ins263-6-Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1-Männchen gekreuzt.

In der späten Gastrula, Stadium 12, wurden 13 Larven Hitze geschockt. Im Schwanzknospen-Stadium wurde bei 7 Larven eine blaue Fluoreszenz detektiert. Die Larvenentwicklung wurde 14 Tage lang beobachtet. Alle Larven entwickelten sich normal und zeigten keine Veränderungen. Anschließend wurden die Larven getötet und die DNA isoliert. Durch PCR-Analyse wurden 4 blau fluoreszierenden Larven als Cre-positiv getestet. Insgesamt konnte die Cre-Rekombinase in 6 Larven nachgewiesen werden. Anschließend wurde die Rekombination des Effektor-Transgens mit PCR analysiert. Wie in Abb. 24 zu sehen ist, wurde bei allen vier Cre-positiven Larven nur das rekombinierte 450 bp große DNA-Fragment amplifiziert, während bei Cre-negativen Larven nur das native 1500 bp große DNA-Fragment amplifiziert wurde.

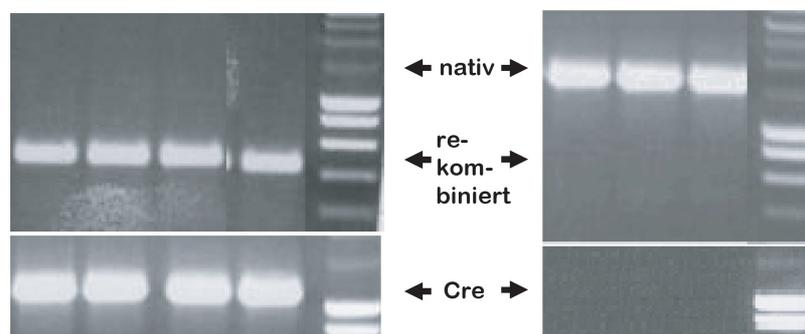


Abb. 24: Rekombination des Effektor-Transgens CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1 β -A263insGG

Cre vermittelten Rekombination des Effektor-Transgens CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1 β -A263insGG nach dem Hitze-Schock bei Cre positiven (linke Seite) und Cre negativen Larven (rechte Seite) aus der Kreuzung von einem heterozygoten ins263-6-Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1 Männchen. Das rekombinierte DNA-Fragment wurde nur bei Cre positiven Larven amplifiziert. Das native DNA-Fragment wurde nur bei Cre negativen Larven amplifiziert.

Damit konnte eine erfolgreiche Rekombination des Effektor-Transgens durch die Cre-Rekombinase nach dem Hitze-Schock durch PCR-Analyse detektiert werden.

3.7.2 Durch Hitze-Schock induzierbare Überexpression von HNF1 β -wt

Für die Überexpression von HNF1 β wurde ein heterozygotes wt2-Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1-Männchen gekreuzt.

In der späten Gastrula, Stadium 12, wurden 46 Embryonen Hitze geschockt. Im Schwanzknospen-Stadium wurde bei 21 Larven blaue Fluoreszenz detektiert. Die Entwicklung der Larven wurde zwei Wochen lang beobachtet. Alle Larven entwickelten sich normal. Durch die Rekombination wird das ECFP-Gen ausgeschnitten und das blau fluoreszierende Protein wird nicht mehr gebildet. Bei einer Hitze geschockten Larve wurde eine Abnahme der blauen Fluoreszenz im Vergleich zur blau fluoreszierenden nicht Hitze geschockten Larven beobachtet (Abb. 25B). Eine anschließende PCR-Analyse ergab, dass diese Larve Cre-positiv war. Darüber hinaus wurden 3 weitere blau fluoreszierende Larven als Cre-positiv getestet. Insgesamt wurde die Cre-Rekombinase in 16 Larven detektiert. Anschließend wurde die Rekombination des Effektor-Transgens mit PCR analysiert. Wie in Abb. 25A zu sehen ist, wurde bei allen 4 Larven, die für beide Transgene positiv waren, neben dem nativen 1500 bp großen DNA-Fragment auch das 450 bp große DNA-Fragment amplifiziert, während bei Larven, die nur für das Effektor-Transgen nicht aber für das Cre-Gen positiv waren, nur das native Fragment amplifiziert wurde.

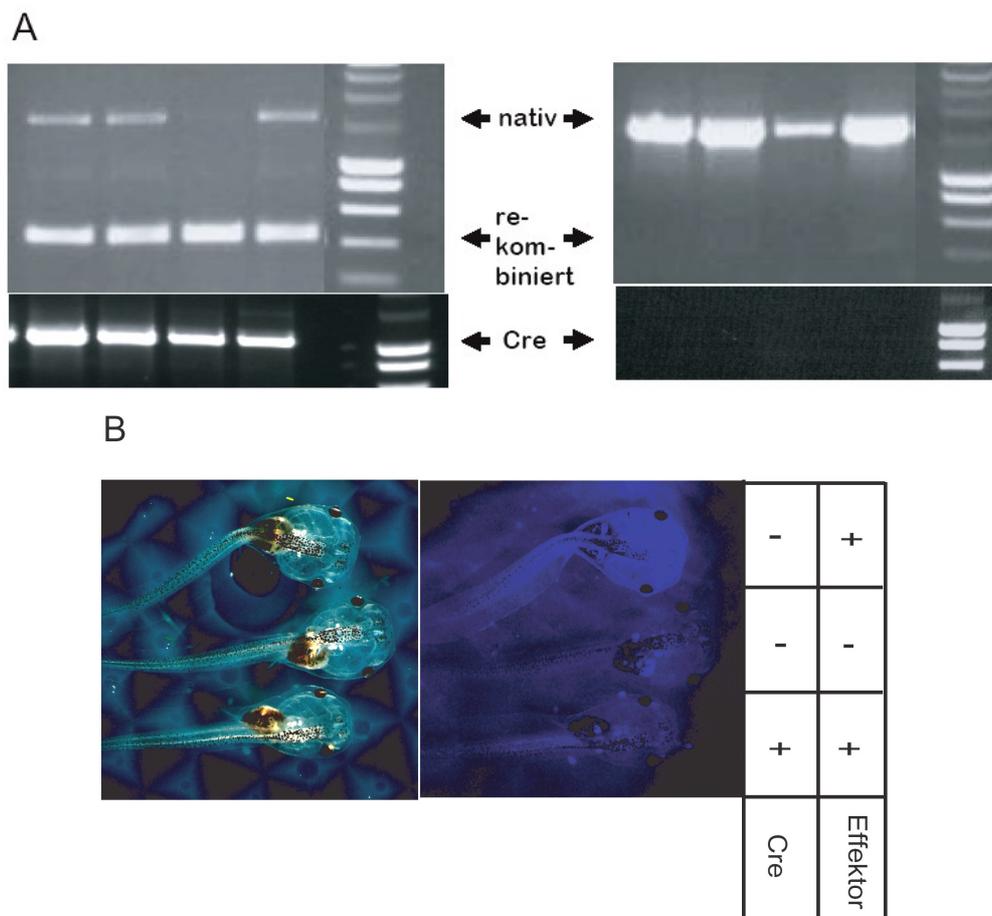


Abb. 25: Rekombination des Effektor-Transgens CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1 β -wt

A: Cre vermittelten Rekombination des Effektor-Transgens CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1 β -wt nach dem Hitze-Schock bei Cre positiven (linke Seite) und Cre negativen Larven (rechte Seite) aus der Kreuzung von einem heterozygoten wt2-Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1 Männchen. Das rekombinierte DNA-Fragment wurde nur bei Cre positiven Larven amplifiziert. Das native DNA-Fragment wurde sowohl bei Cre negativen wie auch bei Cre positiven Larven amplifiziert. Bei Cre positiven Larven ist diese Bande deutlich schwächer.

B: Dargestellt sind drei Larven aus der Kreuzung von einem heterozygoten wt2-Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1 Männchen. Die Larven sind gezeigt unter Normallicht und blauen Fluoreszenz-Filterset 2 Wochen nach dem Hitze-Schock. Zwei der Larven enthalten das Reporter-Transgen CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP. Eine dieser Larven weist eine deutliche Abnahme der blauen Fluoreszenz. Dies korreliert mit der Präsenz des Cre-Gens.

Eine erfolgreiche Rekombination des Effektor-Transgens durch die Cre-Rekombinase nach dem Hitze-Schock wurde durch PCR-Analyse und die Abnahme der blauen Fluoreszenz detektiert.

3.7.3 Durch Hitze-Schock induzierbare Überexpression von P328L329del

Bei dem del328-4-Stamm konnten mit dem gleichen homozygoten Weibchen zwei voneinander unabhängige Kreuzungen mit zwei unterschiedlichen HSPCre1-Männchen durchgeführt werden. Da das del328-4-Weibchen homozygot war, waren alle ihrer Nachkommen für das Effektor-Transgen positiv.

In der ersten Kreuzung wurde der Hitze-Schock in der späten Blastula, Stadium 9, und in der frühen Gastrula, Stadium 11, durchgeführt. Anschließend wurde die Larvenentwicklung 8 Tage lang beobachtet und die Larven getötet. Aus dem Schwanzgewebe wurde DNA isoliert. Der Rumpf wurde fixiert und der Pronephros durch Immunhistofärbung sichtbar gemacht. In der späten Blastula, Stadium 9, wurden 42 Embryonen Hitze geschockt. Durch PCR-Analyse wurden 16 Larven als Cre-positiv getestet. Davon wies eine Larve verlangsamtes Wachstum gegenüber nicht Hitze geschockten Larven auf und entwickelte als freischwimmende Larve im Stadium 41 Ödeme sowie Abnormitäten im Magen-Darm-Bereich.

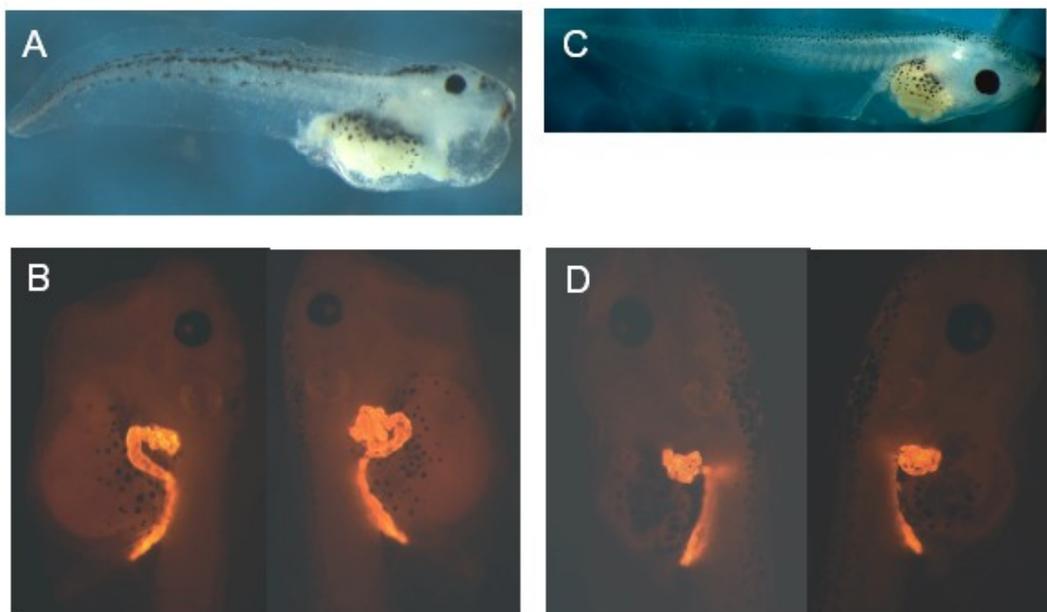


Abb. 26: Überexpression von HNF1 β -P328L329del führt zur Ödembildung.

Larven aus der Kreuzung eines homozygoten del328-4 Weibchens mit einem heterozygoten HSPCre1 Männchen. Die Larven wurden in der Blastula, Stadium 9 Hitze geschockt. Im Stadium 46 wurde der Rumpf der Larven fixiert und der Pronephros immunhistochemisch angefärbt. Dargestellt ist eine Larve mit Ödem im Stadium 46 (A). Die Immunhistofärbung ergab verkleinerte Nierenkanälchen auf der linken Seite (B). C und D Kontrollarve mit normaler Entwicklung im gleichen Stadium.

Die Abb. 26A zeigt diese Larve im Stadium 41. In der Abb. 26B ist das Ergebnis der Immunhistofärbung des Pronephros dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die Pronephros-Kanälchen auf der linken Seite im Vergleich zur Kontrolllarve (Abb. 26D) verkleinert waren, während sich der Pronephros auf der rechten Seite der Larve normal entwickelt hat.

Eine Überexpression der HNF1 β -Mutante P328L329del ab der späten Blastula interferiert mit einer normalen Entwicklung in 1 von 16 Larven.

In der frühen Gastrula, Stadium 11, wurden 40 Embryonen Hitze geschockt. Durch PCR-Analyse wurden 21 als Cre-positiv getestet. Bei neun Larven entwickelten sich im Schwanzknospen-Stadium, Stadium 33, Ödeme (Abb. 27), die sich bis zum Stadium 38 zurückgebildet haben. Diese Abnormitäten korrelierten jedoch nicht mit dem Vorhandensein der Rekombinase, da sechs dieser Larven Cre-negativ waren.



Abb. 27: Larven mit Ödemen im Schwanz-knospen-Stadium

Larven aus der Kreuzung eines homozygoten del328-4 Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1 Männchen. Die Larven wurden in der Gastrula, Stadium 9 Hitze geschockt. Oben eine Larve mit normaler Entwicklung. Unten drei Larven mit Ödemen.

Andere sieben Cre-positive Larven entwickelten sich gegenüber nicht Hitze geschockten Larven langsamer und zeigten als freischwimmende Larven ab Stadium 41 mannigfaltige Abnormitäten. In Abb. 28 ist beispielhaft die Entwicklung zweier solcher Larven vom Stadium 41 bis 46 im Vergleich zur normal entwickelten Larve (Abb. 28A, H-J) dargestellt. Beide Larven zeigten einen verdickten Darmausgang (Abb. 28B-G Dreieck) sowie Ödeme oberhalb des Magens (Abb. 28B-D, G Pfeil). Darüber hinaus waren bei einer Larve Verdickungen in der Schwanzknospe (Abb. 28B-D Pfeilspitze) und ein Ödem in der Gehirnregion (Abb. 28D Stern) zu sehen.

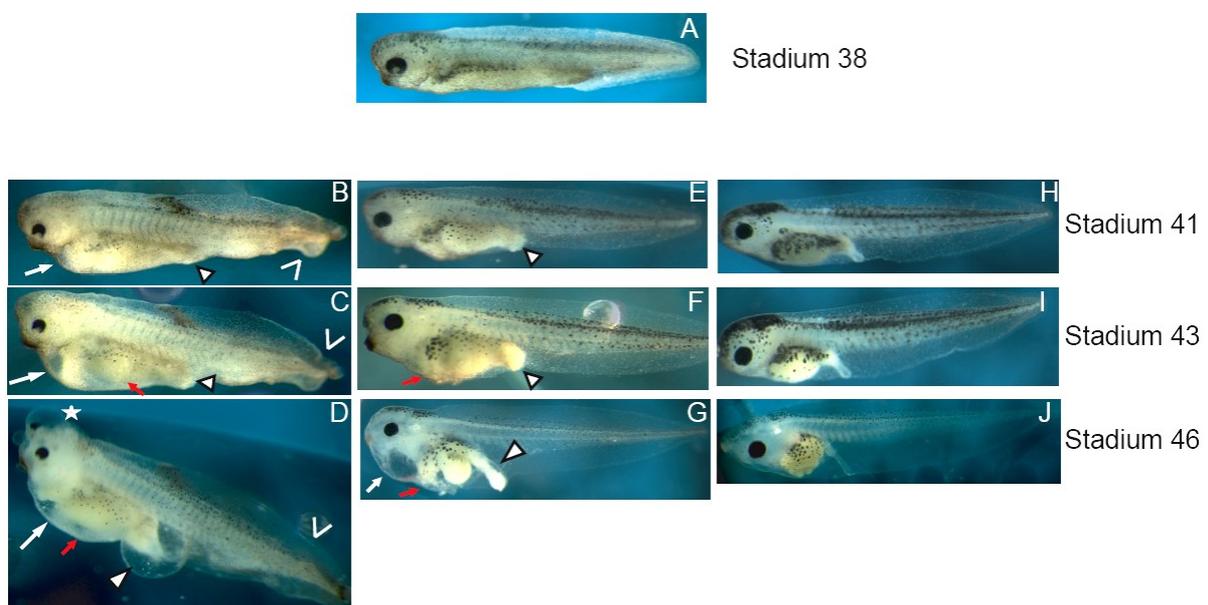


Abb. 28: Überexpression von HNF1 β -P328L329del führt zur Ödembildung.

Larven aus der Kreuzung eines homozygoten del328-4 Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1 Männchen. Die Larven wurden in der Gastrula, Stadium 9 Hitze geschockt und entwickelten sich bis zur Stadium 38 normal (A). Dargestellt sind beispielhaft zwei Cre positive Larven mit abnormer Entwicklung ab dem Stadium 41 bis Stadium 46 (B-G) und eine normal entwickelte Larve (H-J). Die Larven weisen Verdickungen im Darmausgang (Dreieck) abnormale Entwicklung des Magens (roter Pfeil), Ödeme oberhalb des Magens (Pfeil) und in der Gehirnregion (Stern) und abnormale Schwanzentwicklung (Pfeilspitze).

In Abb. 29 II-VII ist die Immunhistofärbung des Pronephros dieser sechs Larven gezeigt. Es ist deutlich zu sehen, dass bei allen Larven im Vergleich zur Kontrolle, Abb. 29 I, der Pronephros verkleinert war. Bei den Larven II und III führte die Überexpression von P328L329del zur Verkleinerung der Pronephros-Kanälchen sowie zur Agnese des Sammelrohres. Bei den Larven IV und V haben sich die Pronephros-Kanälchen verkleinert (IV rechte Seite) oder gar nicht entwickelt. Der proximale Bereich des Sammelrohres war verlängert und der distale Bereich dicker

entwickelt. Bei der Larve VI entwickelten sich die Pronephros-Kanälchen verkleinert, wogegen das Sammelrohr normal entwickelt war. Die Larve VII zeigte abnormes Pronephros-Gewebe. Der immunhistochemisch gefärbte Bereich konnte keiner Pronephrosstruktur eindeutig zugeordnet werden.

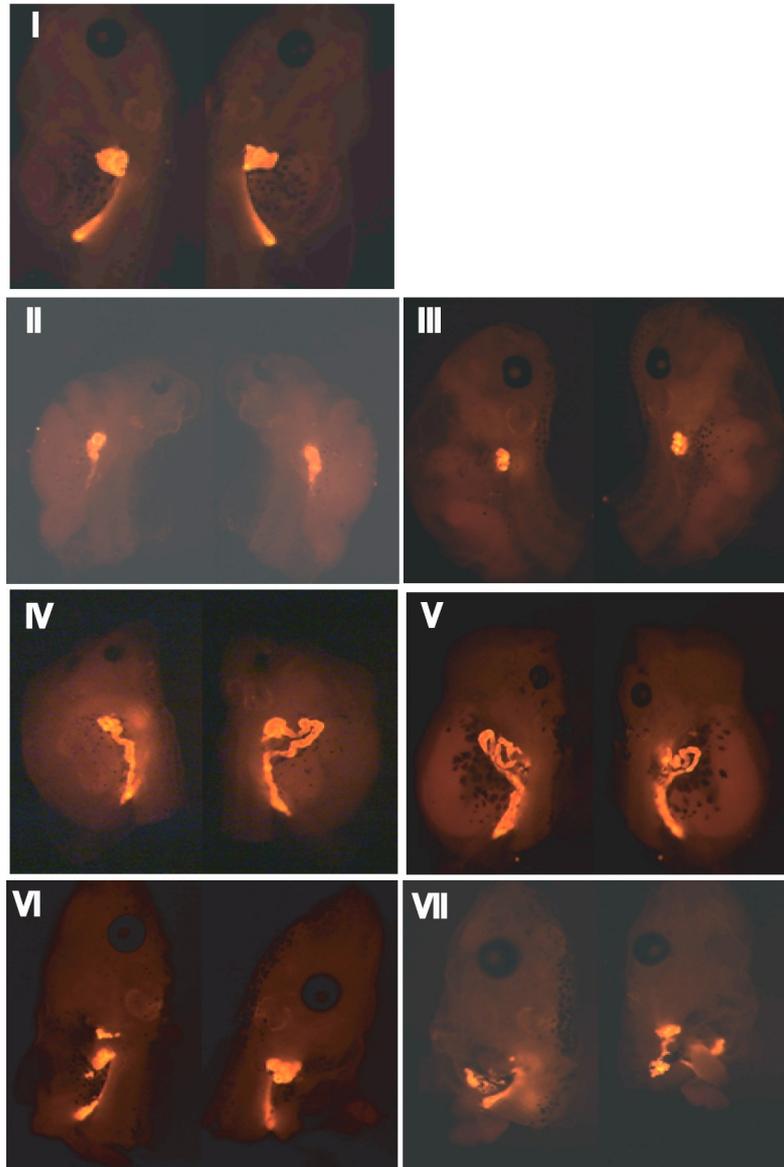


Abb. 29: Überexpression von HNF1 β -P328L329del führt zur verkleinerten Pronephros

Larven aus der Kreuzung eines homozygoten del328-4 Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1 Männchen. Die Larven wurden im frühen Gastrula-Stadium Hitze geschockt. Im Stadium 46 wurde der Rumpf der Larven fixiert und der Pronephros immunhistochemisch angefärbt. I: Larve mit normal entwickelten Pronephros. II-VII: Cre positive Larven mit abnormale Pronephrosentwicklung.

Bei einer, in Stadium 11 Hitze geschockten und Cre-positiven Larve entwickelte sich ab dem Schwanzknospfen-Stadium, Stadium 33, die Schwanzregion anomal. Abb. 30A zeigt die Entwicklung dieser Larve vom Stadium 31 bis 46. Wie in Abb. 30B deutlich zu sehen ist, entwickelte sich bei dieser Larve der Pronephros normal.

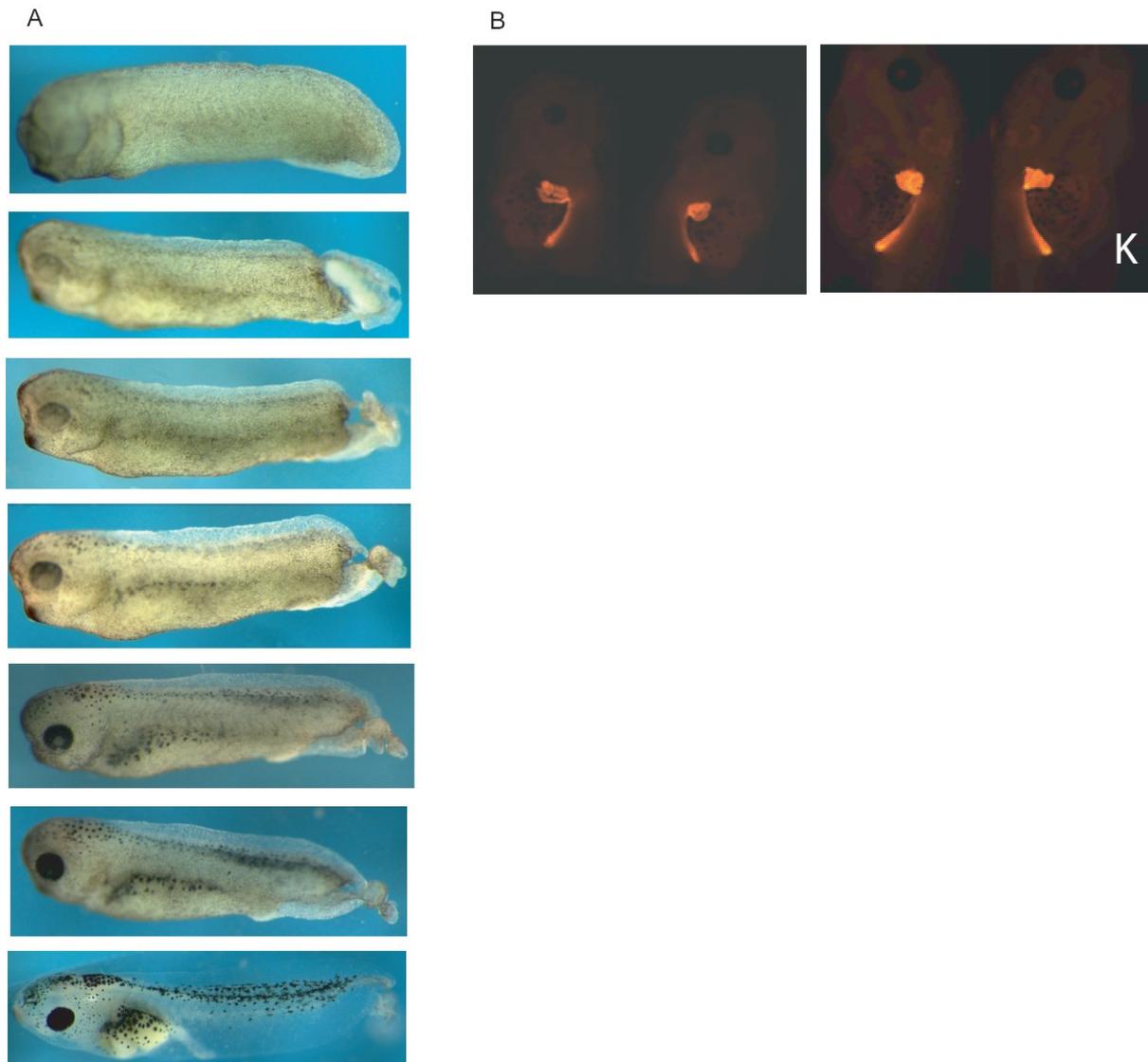


Abb. 30: Abnorme Schwanzentwicklung nach Überexpression von HNF1 β -P328L329del

Cre positive Larve aus der Kreuzung eines homozygoten del328-4 Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1 Männchen. Die Larve wurde im Gastrula-Stadium Hitze geschockt. Bei dieser Larve entwickelte sich der Schwanz ab Stadium 33 anomal.

A: Die Larve ist gezeigt im Stadium 31, 33, 35, 37, 39, 40 und 46 (von oben nach unten).

B: Im Stadium 46 wurde der Rumpf dieser Larve fixiert und der Pronephros immunhistochemisch angefärbt. Der Pronephros dieser Larve (linke Seite) ist normal entwickelt. Rechte Seite: Kontrolllarve.

Die Größe der Pronephri wurde gemessen und mit der Größe der Pronephri der Larven, die im Blastula-Stadium oder gar nicht Hitze geschockt wurden, verglichen. Mit dem t-Test wurde berechnet, ob der Größenunterschied der Pronephri nach Überexpression von HNF1 β -P238L239del signifikant verschieden war. Für den t-Test wurden immer Cre positive mit Cre negativen Larven verglichen, die zu gleichen Zeitpunkt Hitze geschockt wurden. In Abb. 31 ist es deutlich zu sehen, dass die Reduktion des Pronephros signifikant war.

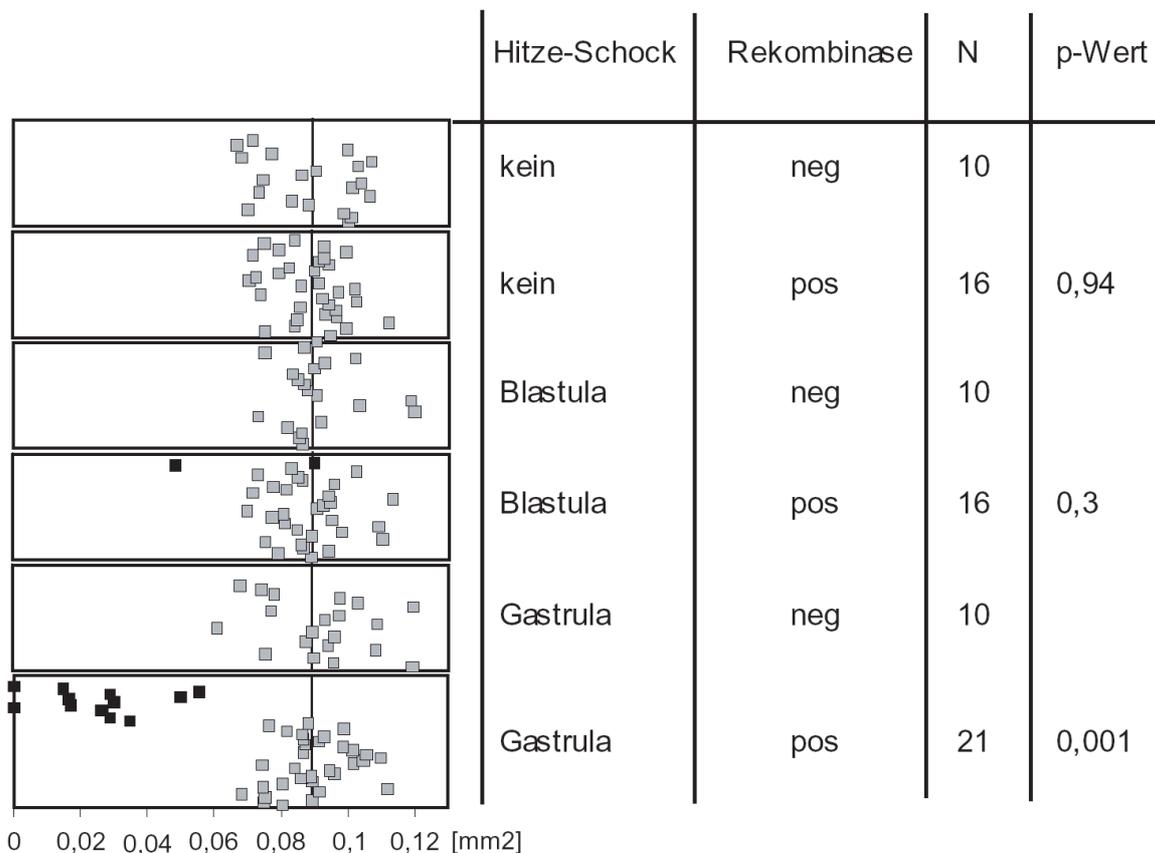


Abb. 31: Beeinflussung der Pronephrosgröße durch Überexpression von HNF1 β -P328L329del.

Die freischwimmenden Xenopus Larven wurden in Stadium 46 fixiert. Die Pronephri wurden immunhistochemisch sichtbar gemacht und die Größe mit dem Computerprogramm AxioVision von Zeiss vermessen. Es wurden jeweils die Pronephri von Cre positiven und Cre negativen Larven, die zum gleichen Zeitpunkt Hitze geschockt wurden, miteinander verglichen. Die Verteilung der Werte ist für jedes Pronephros durch graue (für Larven ohne Phänotyp) oder schwarze (für Larven mit Phänotyp) Quadrate dargestellt, die schwarze Linie entspricht dem Mittelwert. Der p-Wert gibt die Signifikanz an, N die Anzahl der untersuchten Tiere.

Bei einer erneuten Kreuzung (Nr. 2) des gleichen homozygoten del328-4-Weibchens mit einem HSPCre1-Männchen wurden in der späten Gastrula, Stadium 12, 23 Larven Hitze geschockt. Die Larvenentwicklung wurde 14 Tage lang beobachtet. Anschließend wurden die Larven getötet und die DNA aus dem Gewebe isoliert. Durch PCR-Analyse wurden zehn Larven als Cre-positiv getestet. Bei zwei Cre-positiven Larven fehlte im Stadium 40 die Schwanzstruktur (Abb. 32). Alle anderen Larven entwickelten sich normal und zeigten keinen Phänotyp.



Abb. 32: Abnorme Schwanzentwicklung nach Überexpression von HNF1 β -P328L329del

Cre positive Larven aus der Kreuzung eines homozygoten del328-4 Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1 Männchen. Die Larven wurden in der späten Gastrula, Stadium 12 Hitze geschockt. Im Stadium 40 fehlte die Schwanzstruktur.

Die Ergebnisse aus beiden Kreuzungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Hitze-Schock		Kreuzung Nr.	N	Rekombinase		Phänotyp	
				positiv	p-Wert	Niere	Schwanz
kein		1	38	18	0,75	0	0
		2	20	7	0,18	0	0
Blastula	St. 9	1	42	16	0,12	1	0
Gastrula	St. 11	1	40	21	0,75	6	2
	St. 12	2	23	10	0,53	0	2

Tabelle 8: Durch Hitze-Schock induzierbare Überexpression von HNF1 β -P328L329del

Gekreuzt wurde ein homozygoten del328-4 Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1-Männchen. Das Stadium, in dem die Larven Hitze geschockt wurden, ist angegeben. Der p-Wert wurde mit dem χ^2 -Test berechnet.

Bei beiden Kreuzungen wurde die Rekombination des Effektor-Transgens mit PCR analysiert. Unabhängig vom Zeitpunkt des Hitze-Schocks wurde bei allen Larven, die für beide Transgene positiv waren, neben den nativen 1500 bp großen DNA-Fragment auch das rekombinierte 450 bp große DNA-Fragment amplifiziert, während bei Larven, die nur für das Effektor-Transgen nicht aber für das Cre-Gen positiv waren, nur das native Fragment amplifiziert wurde (Abb. 33).

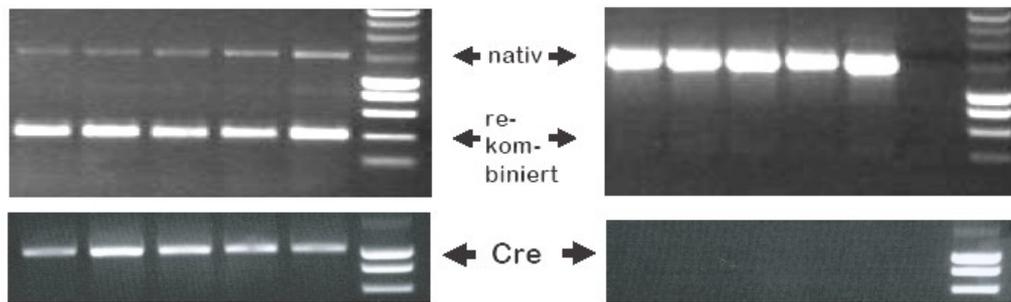


Abb. 33: Rekombination des Effektor-Transgens CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1 β -P328L329del

Cre vermittelten Rekombination des Effektor-Transgens CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1 β -P328L329del nach dem Hitze-Schock bei Cre positiven (linke Seite) und Cre negativen Larven (rechte Seite). Das rekombinierte DNA-Fragment wurde nur bei Cre positiven Larven amplifiziert. Das native DNA-Fragment wurde sowohl bei Cre negativen wie auch bei Cre positiven Larven amplifiziert. Bei Cre positiven Larven ist diese Bande deutlich schwächer.

Eine Überexpression von HNF1 β -P328L329del interferiert in eine normale Larvenentwicklung. Je nach Zeitpunkt des Hitze-Schocks wurden zwei Phänotypen beobachtet. Eine Überexpression ab Stadium 11 führt bei 7 von 21 Larven zu einem verkleinerten Pronephros, während eine Überexpression ab dem Stadium 12 bei 2 von 10 Larven zum Schwanzverlust führte.

4 Diskussion

4.1 Die Expression roter Fluoreszenzproteine in *Xenopus laevis* Embryonen

Im Modellorganismus *Xenopus laevis* werden Fluoreszenzproteine häufig als Marker gebraucht, da sie in den transparenten Larven *in vivo* schnell und effizient mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden können, ohne diese vorher töten zu müssen. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wird dabei am häufigsten benutzt (z. B. Bronchain et al., 1999; Ikari und Suketa, 2002; Smith et al., 2005; Gross, 2006; Hayes et al., 2007), wohingegen der Gebrauch des roten Fluoreszenzproteins DsRed sehr selten berichtet wird (Werdien et al., 2001; Terskikh et al., 2002; Waldner et al., 2006).

In diesem Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass eine durch den CMV-Promotor gesteuerte Expression von DsRedExpress mit einer normalen Larvenentwicklung interferiert. Wie in den Abbildungen 5A und 6B-C deutlich zu sehen, entwickelten sich Larven, bei denen das DsRedExpress ubiquitär exprimiert wurde, langsamer, wiesen Missbildungen auf und starben eine Woche nach der Befruchtung.

Im Jahr 2000 haben Baird et al. nachgewiesen, dass das DsRed präzipitiert und Oligomere bildet. Allgemein werden Proteine, die Aggregate bilden, in Verbindung mit neurodegenerativen Erkrankungen gebracht (Steffani und Dobson et al., 2003). Aus diesem Grund wird spekuliert, dass genau dieses Verhalten für die toxische Wirkung von DsRed verantwortlich ist. Diese Hypothese wurde von Link et al. (2006) durch Untersuchungen an GFP bekräftigt, bei denen das C-terminale Ende von GFP durch das Hinzufügen eines kurzen Peptids verändert wurde. Das zuvor als nicht toxisch beschriebene Peptid zeigte nach dieser Veränderung eine zytotoxische Wirkung. Zwar berichteten Agbulut et al. (2006), dass eine Expression von GFP in die Aktin-Myosin-Interaktion eingreift und somit die Muskelkontraktion beeinträchtigt, vor Kurzem wurde jedoch diese Behauptung durch Studien von Resnicow et al. (2008) infrage gestellt.

Die toxische Wirkung eines Proteins wird durch eine hohe Konzentration verstärkt. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete CMV-Promotor erzeugt eine starke

Expression und ist bereits zu Beginn der zygotischen Gen-Transkription aktiv. Die frühe Embryonalentwicklung ist eine sehr sensible Phase mit einem komplexen Gen-Expressions-Netzwerk. Die Aggregation eines stark exprimierten Proteins im Zytoplasma könnte zur fehlerhaften Lokalisation wichtiger Schlüsselmoleküle sowie zur fehlerhaften Protein-Protein-Interaktion führen, wodurch auch intramolekulare Prozesse gestört werden könnten.

Die Expression von DsRedExpress ist auch für embryonale Maus-Stammzellen toxisch (Hadjantonakis et al., 2002) und Tao et al. haben 2006 gezeigt, dass DsRedExpress die Entwicklungsfähigkeit hämatopoetischer Stammzellen verringert und deren Wachstum inhibiert.

Die toxische Wirkung von DsRedExpress in *Xenopus*-Embryonen konnte in der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz des γ -Kristallin-Promotors aufgehoben werden. Anders als der ubiquitäre CMV-Promotor ist der γ -Kristallin-Promotor erst ab dem späten Schwanzknospenstadium in der Augenlinse aktiv (Brakenhoff et al., 1991). Während des Schwanzknospenstadiums findet die Organogenese statt, damit ist dieses Stadium ebenfalls eine sensible Phase in der Embryonalentwicklung. Da jedoch die Expression von DsRedExpress nur auf die Linse beschränkt war, interferiert das Fluoreszenzprotein nicht mit einer normalen Entwicklung. Die Larven zeigten keine Abnormitäten auf. Es ist sogar gelungen, adulte Frösche mit roter Fluoreszenz im Auge aufzuziehen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in diesen Fröschen die Linse aufgrund der toxischen Wirkung von DsRedExpress beschädigt ist und die Frösche sehbehindert oder sogar blind sind. Da die Frösche unter Laborbedingungen gehalten werden, stellt eine Sehbehinderung keinen Nachteil dar.

Durch den γ -Kristallin-Promotor reguliertes DsRedExpress kann somit als Markerprotein in *Xenopus laevis* benutzt werden, die rote Fluoreszenz kann jedoch erst ab dem späten Schwanzknospenstadium detektiert werden. Dieser Ansatz ist nicht geeignet, wenn man Ereignisse in der frühen Embryonalentwicklung untersuchen möchte.

Im Jahr 2004 hatten Shaner et al. durch gerichtete Evolution eine Reihe neuer rot fluoreszierender Proteine generiert, die alle ihren Ursprung in DsRed haben. Aufgrund einer sehr starken Leuchtkraft sowie einer kurzen Reifung von einer Stunde bei 37 °C stellt das tandem dTomato (tdTomato) ein gutes Markerprotein dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine durch den CMV-Promotor

kontrollierte Expression von tdTomato keinen Einfluss auf eine normale Larvenentwicklung hat. Es wurde sogar ein transgener Stamm generiert (Tom3), in dem das tdTomato ubiquitär exprimiert wird. Eine starke rote Fluoreszenz wurde bereits in dem Neurula-Stadium detektiert (Abb. 7). Im Jahr 2006 berichteten Gross et al. dass eine durch den CMV-Pomoter kontrollierte Expression im adulten Tier stillgelegt ist. Wie in Abbildung 8 dargestellt, wurde jedoch in einem adulten Tom3-Männchen eine starke und homogene rote Fluoreszenz sowohl in der Epidermis, als auch in allen untersuchten Organen detektiert. Damit eignet sich CMV-kontrolliertes tdTomato hervorragend als Markerprotein. Da die rote Fluoreszenz sowohl in dem Neurula-Stadium als auch im adulten Frosch detektiert werden konnte, kann das tdTomato für Untersuchungen in der frühen Embryonalentwicklung, aber auch für Lang-Zeit-Untersuchungen wie zum Beispiel zur Zelllinienmarkierung benutzt werden.

4.2 Durch *I-SceI*-Meganuklease vermittelte Transgenese im *Xenopus laevis*

Die stabile Integration von Transgenen in das Genom eines Modellorganismus sowie die adäquate Expression desselben in der Gründergeneration und den nachfolgenden Generationen stellt einen der wichtigsten technologischen Fortschritte in der modernen Biologie dar.

Die am häufigsten benutzte Methode, transgene *Xenopus laevis* zu generieren, ist die durch Restriktionsendonucleasen vermittelte Integration (REMI) von DNA in Spermienkerne und die Transplantation dieser in nicht befruchtete Eier (Kroll und Amaya, 1999). Diese Methode war bereits zur Beginn dieser Arbeit etabliert. Die größten Vorteile der REMI-Methode sind die homogene und stabile Expression des Transgens sowie die Weitergabe des Transgens auf die F1-Generation. Ihre größten Nachteile sind die niedrige Überlebens- und Transgeneserate.

Im Verlauf der Arbeit wurde mit der REMI-Methode eine durchschnittliche Überlebensrate von 0,8 % und eine durchschnittliche Transgeneserate von 0,1 % erreicht (Abb. 13). Die geringe Überlebensrate ist durch den Einsatz von Spermienkernen und einer Injektionsnadel mit relativ großem Durchmesser zu

erklären. Die Spermienkerne werden durch das Enthüllen fragil. Bei der Injektion in das Ei werden die Spermienkerne Scherkräften ausgesetzt, was zur Schädigung der Kerne führen kann. Um die Scherkräfte zu minimieren, muss der Durchmesser der Injektionsnadel so groß wie möglich sein. Andererseits verursacht ein großer Durchmesser eine starke Beschädigung des Eis, was eine fehlerhafte Entwicklung bewirkt. Schließlich können auch mehrere oder keine Spermienkerne in ein Ei injiziert werden. Werden mehrere Spermienkerne injiziert, so führt das zu einer fehlerhaften Entwicklung und schließlich zum Tod des Embryos. Wird kein Spermienkern injiziert, so wird das Ei nicht befruchtet und stirbt.

Eine Alternative zu der REMI-Methode bietet die durch die *I-SceI*-Meganuklease vermittelte Integration einer Plasmid-DNA in das Genom. Diese Methode wurde bereits außer im *Xenopus laevis* (Pan et al., 2006) und *Xenopus tropicalis* (Ogino et al., 2006) auch in Axolotel (Sobkow et al., 2006) sowie verschiedenen Fischarten wie Medaka (Thermes et al., 2002), Stichling (Hosemann et al., 2004) und Zebrafisch (Grabher et al., 2004) erfolgreich angewendet.

In der durch *I-SceI*-Meganuclease vermittelten Integration einer Plasmid-DNA in das Genom werden die Eier mit isolierten Hoden befruchtet. Dies kommt der natürlichen Befruchtung sehr nahe und erhöht die Überlebensrate der Embryonen. In dieser Methode wird die Plasmid-DNA mit der Meganuklease in bereits befruchtete Eier injiziert, deswegen kann eine Injektionsnadel mit sehr kleinem Durchmesser benutzt werden. Dadurch wird die durch die Injektion verursachte Schädigung des Eis minimiert. In der vorliegenden Arbeit konnten bereits bei den ersten Versuchen mit der *I-SceI*-Methode Überlebensraten zwischen 6,7 % für das CMVtdTomato-*SceI*-Konstrukt und 7,7 % für das SKA:EGFP-*SceI*-Konstrukt erreicht werden. Für eine weitere Optimierung wurden die Konstrukte HSP:Flp-CMV:tdTomato-*SceI* und HSP:Cre-CMV:tdTomato-*SceI* benutzt. Es wurden drei unterschiedliche DNA-Konzentrationen (80 pg, 160 pg, 200 pg) und zwei unterschiedliche Enzymkonzentrationen (0,001 U und 0,004 U) verwendet (Tabelle 4). Bei allen Ansätzen wurden deutlich bessere Überlebens- und Transgeneseraten als mit der REMI-Methode erzielt. Für beide Konstrukte wurden die besten Ergebnisse bei der Injektion von 160 pg DNA und 0,004 U Meganuklease erreicht. Bei diesem Ansatz wurden Überlebensraten von 13,1 % für das HSP:Flp-CMV:tdTomato-*SceI*-Konstrukt und 13,7 % für das HSP:Cre-CMV:tdTomato-*SceI*-Konstrukt beobachtet, damit wurde die Überlebensrate im Vergleich zu der REMI-Methode um das 17-fache erhöht. Die

Effizienz der Transgenese wurde sogar um das Zehn- bzw. Dreißigfache für die entsprechenden Konstrukte im Vergleich zur REMI-Methode erhöht (Abb. 13). Bei der Injektion von 160 pg DNA wurde deutlich, dass die Präsenz der Meganuklease für eine erfolgreiche Transgenese wichtig ist, denn die Erhöhung der Enzymkonzentration hatte gleichzeitig eine Erhöhung der Transgeneserate zur Folge. Der Mechanismus der durch *I-SceI*-Meganuklease vermittelten Transgenese ist noch unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass die Meganuklease gleichzeitig Doppelstrangbrüche in dem Wirtsgenom und der Plasmid-DNA verursacht, was zur Integration des Transgens in das Genom führt. Eine sequenzspezifische Integration kann aufgrund der sehr langen Erkennungssequenzen der *I-SceI*-Meganuklease von 18 bp ausgeschlossen werden. In den bis jetzt untersuchten Vertebrate-Genomen wurden diese Erkennungssequenzen nicht gefunden (Grabher und Wittbrodt, 2007). Ebenfalls wird spekuliert, dass die *I-SceI*-Meganuklease entgegen der Ligase- und Replikase-Aktivität wirkt, die bei der REMI-Methode für die Integration von Transgen-Konkatemeren verantwortlich gemacht wird (Grabher und Wittbrodt, 2007). Bei der Meganuklease-Methode wird die Plasmid-DNA nach der Restriktion nicht gereinigt, sondern zusammen mit dem Enzym in befruchtete Eier injiziert. Es wird vermutet, dass die *I-SceI*-Meganuklease an der geschnittenen Plasmid-DNA gebunden bleibt und somit die 4 bp langen Überhang-Enden vor Ligation und/oder Degeneration schützt. Es ist bekannt, dass die *I-SceI*-Meganuklease die Häufigkeit der Rekombination zwischen chromosomaler und exogener DNA um das 1000-fache erhöht (Puchta et al., 1993; Chouluka et al., 1995). Somit könnte die transgene-DNA mithilfe der Meganuklease in das Genom durch Rekombination integriert werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den Mechanismus der durch die *I-SceI*-Meganuklease vermittelten Transgenese näher zu beschreiben. Durch die deutliche Erhöhung der Transgeneserate stellt die durch die *I-SceI*-Meganuklease vermittelte Transgenese eine Verbesserung gegenüber der REMI-Methode da.

4.3 Stabile Integration von konditional aktiven Rekombinasen in *Xenopus laevis*

4.3.1 Stabile Integration der FLP-Rekombinase

Der Einsatz sequenzspezifischer Rekombinasen ist eine gute Möglichkeit, um die Funktion wichtiger Gene zu analysieren. Die FLP-Rekombinase ist *in vitro* vor allem bei Temperaturen zwischen 23-30 °C aktiv (Buchholz et al., 1996). Bei 37 °C sinkt die Aktivität um die Hälfte, wodurch in Mäusen die DNA entweder gar nicht (Ludwig et al., 1996) oder nur unvollständig (Dymecki et al., 1996) rekombiniert wird. Die Variante FLPe, bei der vier Aminosäuren ausgetauscht worden sind, hat eine erhöhte Thermostabilität. In *E.coli* ist die FLPe-Variante bei 37 °C viermal aktiver als Wildtyp-FLP (Buchholz et al., 1998), und auch in der Maus zeigt sie eine erhöhte Reaktionsaktivität, welche vergleichbar mit der von Cre ist (Rodriguez et al., 2000).

Die Körpertemperatur der *Xenopus* Larven entspricht der Wassertemperatur, in der diese gehalten werden, also 20-22 °C, deswegen sollte das niedrige Temperaturoptimum der FLP-Rekombinase keinen Nachteil darstellen, trotzdem wurde in der vorliegenden Arbeit für die Herstellung der FLP-Aktivator-Stämme die FLPe-Variante benutzt. Um eine konditionale Aktivierung zu gewährleisten, wurde die Rekombinase unter die Kontrolle des HSP-70-Promotors gestellt. Um die Rekombinase-Aktivität sofort in den Gründertieren untersuchen zu können, wurden für die Befruchtung Spermien des Reporter-Stamms C5 benutzt, in dem gelbe Fluoreszenz durch die FLP-Rekombinase induziert werden kann. Nach rund 32000 Injektionen wurden durch die Expression des Selektionsmarkers oder durch PCR-Analyse in der F0-Generation eindeutig 11 Larven als HSP:FLP- und C5-positiv identifiziert. Nur bei einer Larve (HSPFlp1) wurde durch den Hitze-Schock die gelbe Fluoreszenz induziert. In der Abbildung 14 ist deutlich zu sehen, dass sich die gelbe Fluoreszenz nur auf wenige Zellen beschränkte, deswegen ist es wahrscheinlich, dass die Rekombinase nur in wenigen Zellen exprimiert wurde. Ein Gründertier, welches das Transgen stabil in das Genom integriert hat, sollte es an 50 % seiner Nachkommen vererben. Die Untersuchung einer Stichprobe ergab, dass das HSPFlp1-Gründertier die Rekombinase auf 10 von 24 Larven vererbte. Statistisch gesehen entspricht das den Erwartungen und man kann davon ausgehen, dass das

HSPFlp1-Gründertier das Transgen an einen einzelnen chromosomalen *Locus* stabil in das Genom integriert hat. In der F1-Generation konnte die gelbe Fluoreszenz jedoch nicht mehr induziert werden. Ein ähnliches Verhalten zeigte das Gründertier HSPFlp2, bei dem die Rekombinase-Aktivität erst in der F1-Generation überprüft werden konnte. Der HSPFlp2-Frosch vererbte zwar die Rekombinase auf 50 % seiner Nachkommen, diese konnte jedoch nicht aktiviert werden. Allgemein wurde in keiner Larve eine homogene Induktion der gelben Fluoreszenz detektiert.

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine FLP vermittelte Rekombination in *Xenopus* Embryonen möglich ist. Werdien et al. (2001) haben gezeigt, dass die Koinjektion von Reporter-DNA und FLP-mRNA in *Xenopus* Embryonen eine vollständige Rekombination der Reporter-DNA ergab. Nach der Injektion von FLP-mRNA in Embryonen, die die Reporter DNA stabil in das Genom integriert hatten, wurde der Induktionsmarker jedoch nur noch mosaikartig aktiviert. Dies deutet darauf hin, dass stabil in das Genom integrierte FRT-Sequenzen für die FLP-Rekombinase schwerer zugänglich sind als FRT-Sequenzen in injizierten Plasmid und dass eine hohe Konzentration an FLP für eine vollständige Rekombination notwendig ist. Da bei der vorliegenden Arbeit die Rekombinase unter die Kontrolle des HSP-70-Promotors gestellt worden ist, wird die FLP nur während des Hitze-Schocks (1 h) aktiviert. Da in keiner der untersuchten Larven eine homogene gelbe Fluoreszenz induziert werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass in dieser kurzen Zeit keine ausreichende Menge an FLP produziert werden kann, um eine vollständige Rekombination zu erzielen. In weiteren Untersuchungen sollte die Konzentration an FLP-Rekombinase in den Larven durch Verlängerung oder mehrmaliges Wiederholen des Hitze-Schocks erhöht und die Induktion des gelb fluoreszierenden Proteins erneut untersucht werden.

Die FLP-Rekombinase zeigt auch in der Maus ein ähnliches Verhalten. In embryonalen Stammzellen konnte auch nur eine mosaikartige Aktivierung des Induktionsmarkers erzielt werden (Schaff et al., 2001). Es wird spekuliert, dass dieses Verhalten mit dem Ursprung der FLP-Rekombinase in der Hefe zusammenhängt. Durch die Präsenz kryptischer Spleiß-Aktivator- oder Donor-Sequenzen wird zum Beispiel ein nur vermindert aktives Protein in Vertebratezellen produziert. Raymond et al. (2007) haben die Sequenz der FLPe-Rekombinase einer *de-novo*-Rekonstruktion unterzogen. Unter Verwendung der so optimierten FLPe-Rekombinase (FLPo) konnte in transgenen Mäusen eine homogene Aktivierung des

Induktionsmarkers in 11 von 18 Fällen beobachtet werden. In weiteren Untersuchungen sollte die Aktivität der FLPO in *Xenopus* untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit einer HSP-70-kontrollierten FLPE-Variante in *Xenopus* Larven keine homogene Rekombination erzielt werden.

4.3.2 Stabile Integration der Cre-Rekombinase und Cre-vermittelte Rekombination in *Xenopus* Larven

Anders als bei der FLP-Rekombinase liegt das Temperaturoptimum der Cre-Rekombinase zwischen 37 °C und 40 °C, da die Körpertemperatur der *Xenopus* Larven 20-22 °C beträgt, könnte ein so hohes Temperaturoptimum einen Nachteil darstellen. *In vitro* beträgt die Aktivität der Cre-Rekombinase bei 23 °C nur noch 25 % der maximalen Aktivität (Buchholz et al., 1996).

Um eine konditionale Aktivierung der Rekombinase zu erzielen, wurde für die Herstellung der Cre-Aktivator-Stämme der HSP-70-Promotor benutzt. In der F0-Generation wurden 14 Larven eindeutig als Cre- und C5-positiv getestet. In vier Larven wurde die gelbe Fluoreszenz induziert. Anders als bei der FLP-Rekombinase wurde bei der Cre-vermittelten Rekombination eine homogene Induktion des gelb fluoreszierenden Proteins erreicht, das in der Abbildung 16 deutlich zu sehen ist. Somit zeigte die Cre-Rekombinase bereits in der F0-Generation trotz der ungünstigen Temperatur eine höhere Aktivität als die FLP-Rekombinase. Eine Erklärung für die hohe Effizienz der Cre-Rekombinase in *Xenopus* Larven könnte in der sehr hohen Affinität zu den loxP-Sequenzen liegen sowie in der Ausbildung eines sehr stabilen Synaptischen-Komplexes (Abb. 3) mit der Reporter-DNA (Ringrose et al., 1998).

Insgesamt wurden 15 HSPCre-Gründertiere generiert, wobei zwei der Tiere (HSPCre1 und HSPCre13) die aktivierbare Cre-Rekombinase auf die F1-Generation vererbten. Wie der Tabelle 6 zu entnehmen ist, ergab die Untersuchung einer Stichprobe, dass das HSPCre1-Gründertier das Transgen an 14 von 35 und das HSPCre13-Gründertier an 14 von 30 seiner Nachkommen vererbt hat. Statistisch gesehen entspricht dies 50 % und man kann davon ausgehen, dass beide Frösche das Transgen an einem einzelnen chromosomalen *Locus* stabil in das Genom

integriert haben. Der HSPCre13-Stamm bietet gegenüber dem HSPCre1-Stamm ein Vorteil, denn während HSPCre1 nur das Rekombinasegen stabil in das Genom integriert hat, besitzt HSPCre13 im gleichen Transgen zusätzlich das tdTomato-Gen als Markerprotein. Die Präsenz der Cre-Rekombinase kann in diesem Stamm aufgrund der roten Fluoreszenz *in vivo* sehr einfach detektiert werden. Die Cre-vermittelte Rekombination in diesem Stamm konnte nicht näher charakterisiert werden. Da das HSPCre13-Gründertier ein Männchen war, wurde es für die Kreuzung getötet und die Tiere der F1-Generation haben die Geschlechtsreife noch nicht erreicht.

Nach näherer Untersuchung der Cre-vermittelte Rekombination im HSPCre1-Stamm konnte durch PCR-Analyse die Rekombination der Reporter-DNA bereits eine Stunde ab Beginn des Hitze-Schocks detektiert werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Michiue und Asashima (2005), die auch eine Stunde ab Beginn des Hitze-Schocks eine durch den HSP-Promoter kontrollierte EGFP-Expression in *Xenopus* Larven detektieren konnten. In dem hier untersuchten HSPCre1-Stamm war vier Stunden ab Beginn des Hitze-Schocks die Rekombination vollständig, da die native Reporter-DNA nicht mehr amplifiziert werden konnte. Damit bietet der HSPCre1-Stamm einen großen Vorteil gegenüber bereits beschriebenen HSPCre-Linien im Zebrafisch. Bei doppelt transgenen Zebrafischen, die sowohl Hitze-Schock aktivierbare Cre-Rekombinase wie auch eine Reporter-DNA enthielten, konnte erst 2 Stunden nach dem Hitze-Schock das rekombinierte Reporter-DNA-Fragment durch PCR-Analyse amplifiziert werden (Thummel et al., 2005). Weiterhin wurde das native Reporter-DNA-Fragment auch 48 Stunden nach dem Hitze-Schock amplifiziert, somit vermittelte die Cre-Rekombinase in dieser Zebrafisch-Linie nur eine unvollständige DNA-Umlagerung (Thummel et al., 2005). Im Jahr 2007 machten auch Le et al. Untersuchungen an doppelt transgenen Zebrafischen mit durch Hitze-Schock induzierbarer Cre-Rekombinase. Auch in diesem Fall konnte nur eine unvollständige DNA-Umlagerung nach dem Hitze-Schock erreicht werden, die Rekombinations-Effizienz betrug lediglich 33 %.

In dem hier beschriebenen HSPCre1-Stamm wurden jeweils die gleichen Ergebnisse erzielt, unabhängig davon, zu welcher Zeit in der Embryonalentwicklung der Hitze-Schock durchgeführt wurde. Damit kann der HSPCre1-Stamm sowohl für Untersuchungen in der frühen Embryonalentwicklung benutzt werden so wie auch für Untersuchungen in späteren Larvenstadien. Theoretisch ist es auch möglich, dass

die Cre-Rekombinase in diesem Stamm erst nach der Metamorphose durch Hitze-Schock aktiviert werden kann. Es wurden jedoch keine Untersuchungen dazu gemacht.

Da bei Untersuchungen der Funktion von Genen der Zeitpunkt, ab dem das Gen exprimiert wird, sehr wichtig ist, wurde die Zeitdifferenz zwischen dem Hitze-Schock und dem ersten Auftreten der gelben Fluoreszenz untersucht. Da das gelb fluoreszierende Protein eine schwache Leuchtkraft hat, wurde die gelbe Fluoreszenz in der Augenlinse der Larve untersucht, denn in einem so kleinen Bereich kann eine schwache Fluoreszenz einfacher detektiert werden. Die gelbe Fluoreszenz wurde bereits sechs Stunden nach Beginn des Hitze-Schocks detektiert und erreichte das Maximum neun Stunden nach Beginn des Hitze-Schocks. Da die Rekombination laut PCR-Analyse bereits vier Stunden ab Beginn des Hitze-Schocks vollständig war, ist es wahrscheinlich, dass das gelb fluoreszierende Protein bereits früher exprimiert wird, als durch das Auftreten der Fluoreszenz untersucht werden kann. Daher sollte der genaue Zeitpunkt der EYFP-Expression nach dem Hitze-Schock auf RNA-Ebene durch RT-PCR bestimmt werden. Unerwarteterweise wurde auch in 5 von 20 Larven eine gelbe Fluoreszenz im Auge bereits vor dem Hitze-Schock detektiert. Da sich die Emissionsspektren von ECFP und EYFP teilweise überlappen, kann es sich hier um eine schwache Hintergrundfluoreszenz des ECFP handeln. Da sich die blaue Fluoreszenz in dem C5-Stamm von Larve zu Larve unterscheidet, ist auch zu erklären, dass die Hintergrundfluoreszenz in nur 5 von 20 Larven detektiert werden konnte. Andererseits kann es sich hierbei auch um eine durch Cre-Rekombinase induzierte gelbe Fluoreszenz handeln. Dies würde bedeuten, dass der HSP-70-Promotor auch ohne Hitze-Schock in der Linse aktiv ist. Im Jahr 2002 wurde durch Blechinger et al. im Zebrafisch auch eine von Hitze-Schock unabhängige Aktivität des HSP-70-Promotors beobachtet. Genau wie in den vorliegenden Untersuchungen in *Xenopus* beschränkte sich diese Aktivität im Zebrafisch auch nur auf die Augenlinse. Blechinger et al. (2002) beobachteten die von Hitze-Schock unabhängige Aktivität nur in einem engen Zeitfenster von 14 Stunden, in der Zeit, in der sich die Augenlinse entwickelte. Da in der vorliegenden Arbeit bei Cre- und C5-positiven Larven des HSPCre1-Stamms vor dem Hitze-Schock zu keinem Zeitpunkt homogene gelbe Fluoreszenz detektiert wurde, kann man davon ausgehen, dass sich die von Hitze-Schock unabhängige Aktivität des HSP-70-Promotors nur auf die Augenlinse und wahrscheinlich, ähnlich wie bei dem Zebrafisch, auf ein kurzes Zeitfenster

beschränkt. Das bedeutet, dass der HSPCre1-Stamm eine sehr geringe Basalaktivität der Cre-Rekombinase aufweist. Dies stellt einen Vorteil gegenüber anderen induzierbaren Systemen, wie zum Beispiel den durch Hormon induzierbaren Rekombinasen dar. Denn sowohl bei Mäusen wie auch *in vitro* wurde eine hohe Basalaktivität durch Hormon induzierbare Cre- und FLP-Rekombinasen in Abwesenheit des Induktors beobachtet (Schwenk et al., 1998; Kellendonk et al., 1999; Fuhrmann-Benzakein 2000). Auch in *Xenopus* Larven wurde in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe eine Basalaktivität bei durch Hormon induzierbaren Cre- und Flp-Rekombinasen in Abwesenheit des Induktors beobachtet (Waldner et al., nicht publizierte Daten). Für die durch Hydroxitamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase wurde eine starke Basalaktivität mit einer nahezu homogenen Expression des Induktionsmarkers beobachtet und auch für die FLP-Rekombinase wurde Basalaktivität mit einer mosaikartigen Expression des Induktionsmarkers detektiert. Auch wenn in dem HSPCre1-Stamm die Basalaktivität der Cre-Rekombinase sehr gering ist, sollte der genaue Level zum Beispiel durch eine RT-PCR auf der RNA-Ebene untersucht werden.

Mit dem HSPCre1-Stamm wurde ein Aktivator-Stamm generiert, der aufgrund der schnellen und vollständigen Rekombination der DNA sowie der geringen Basalaktivität der Cre-Rekombinase einen Vorteil gegenüber bereits beschriebenen induzierbaren Rekombinase-Systemen anbietet. Mit diesem Stamm kann die Expression von Effektor-Genen in *Xenopus laevis* zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung induziert werden. Auf diese Weise können durch die Überexpression von Zielgenen *gain-of-function*-Studien durchgeführt werden. Es ist aber auch denkbar, dass durch die Überexpression dominant-negativer Mutanten *loss-of-function*-Studien möglich sind. Darüber hinaus kann die Expression des Zielgens durch Verwendung eines gewebespezifischen Promotors auf bestimmte Bereiche in der Larve beschränkt werden. Für *Drosophila* (Halfon et al., 1997), Schmetterling (Ramos et al., 2006) und Zebrafisch (Halloran et al., 2000) wurde sogar beschrieben, dass der HSP-Promotor durch einen Laser zellgenau aktiviert werden kann. Darüber hinaus wurde im Zebrafisch von Hardy et al. (2007) über eine räumlich begrenzte Aktivierung der Gen-Expression durch einen lokalen Hitze-Schock bei Verwendung eines modifizierten LötKolbens berichtet. Diese Techniken müssen jedoch erst im *Xenopus* etabliert werden.

4.4 Durch Hitze-Schock induzierbare Überexpression von HNF1 β -wt sowie der Mutanten Ains263GG und P328L329del

Nachdem die Effizienz der Cre-vermittelten Rekombination an dem Reporter-Stamm C5 getestet wurde, sollte durch Kreuzung des HSPCre1-Stamms mit den Effektor-Stämmen und anschließenden Hitze-Schock die Expression von HNF1 β -wt sowie der Mutanten P328L329del und Ains263GG aktiviert werden.

In früheren Versuchen wurde von Bohn et al. (2003) der Einfluss einer Überexpression von neun verschiedenen HNF1 β -Mutanten durch RNA-Injektionen in *Xenopus* Embryonen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Nierenentwicklung der Larven auf unterschiedliche Weise gestört war, und die Mutanten konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe verursachte eine Vergrößerung des Pronephros, während die Überexpression der Mutanten aus der zweiten Gruppe eine Verkleinerung des Pronephros zur Folge hatten. Die Mutanten P328L329del und Ains263GG ergaben dabei den stärksten Phänotyp. Wobei die Überexpression der P328L329del-Mutante zur Verkleinerung und die Überexpression der Ains263GG-Mutante zur Vergrößerung des Pronephros führte. Auch die Überexpression von Wildtyp HNF1 β verursachte eine Verkleinerung des Pronephros (Wild et al., 2000). Die RNA-Injektion führte jedoch zu großen Unterschieden in den Phänotypen bei den so manipulierten Larven (Bohn et al., 2003). Durch die Verwendung des binären Systems aus Aktivator- und Effektor-Stämmen sollte die große Variabilität in dem Phänotyp minimiert werden. Denn durch den Gebrauch von stabilen Stämmen können in einem Versuch viele F1-Larven, in denen das Transgen in gleicher Stärke exprimiert wird, untersucht werden. Als Aktivator wurde der HSPCre1-Stamm etabliert. Für die Effektor-Stämme wurden das Wildtyp-HNF1 β und die mutierten Formen P328L329del und Ains263GG stabil in das Genom integriert und die Stämme wt2, 328del-4 und ins263-6 etabliert. Dabei wurden die Konstrukte so konzipiert, dass das Effektor-Gen erst nach einer Cre oder FLP-vermittelten Rekombination aktiviert wird. Da die Expression der Rekombinase selbst induzierbar ist, kann die Expression des Effektor-Gens zum beliebigen Zeitpunkt in der Larvenentwicklung aktiviert werden. Das bietet einen weiteren Vorteil gegenüber RNA-Injektionen, in denen das Protein direkt nach der Injektion gebildet

wird. Da die RNA nur begrenzte Zeit stabil ist und kurze Zeit nach der Injektion wieder abgebaut wird, können nur Auswirkungen auf die frühe Embryonalentwicklung untersucht werden. Auch bei konstitutiv aktiven Transgenen startet die Expression bereits zu Beginn der Embryonalentwicklung. Mit dem in der vorliegenden Arbeit etablierten binären System können die Auswirkungen der Effektor-Gene sowohl in der frühen Embryonalentwicklung als auch in späten Larvenstadien untersucht werden.

Da bei der Kreuzung des HSPCre1-Stamms mit dem C5-Reporter-Stamm die gelbe Fluoreszenz 6 Stunden ab Beginn des Hitze-Schocks detektiert werden konnte, wurde auch bei der Kreuzung des HSPCre1-Stamms mit den Effektor-Stämmen die Expression der HNF1 β -Proteine 6 Stunden ab Beginn des Hitze-Schocks erwartet. Des Weiteren wurden die gleichen Phänotypen wie bei der RNA-Injektion erwartet.

4.4.1 Durch Hitze-Schock induzierbare Rekombination der Effektor-DNA im ins263-6 und wt2-Stamm

Sowohl beim ins263-6-Stamm wie auch beim wt2-Stamm standen für die Untersuchungen nur sehr junge Weibchen zu Verfügung, die durch Hormon-Injektion zur Abgabe von nur wenigen Eiern stimuliert werden konnten.

Für die Expression der HNF1 β -Mutante A263insGG wurde ein ins263-6-Weibchen mit einem HSPCre1-Männchen gekreuzt. Da beide Tiere heterozygot waren, wurden beide Transgene in ~25 % der Nachkommen erwartet.

Bei dieser Kreuzung konnten 13 Larven untersucht werden. 4 der Larven wurden für beide Transgene positiv getestet, dies entsprach den Erwartungen. Nach dem Hitze-Schock in Stadium 12 (späte Gastrula) entwickelten sich die Larven normal und zeigten keine Veränderungen. Wie in der Abbildung 24 deutlich zu sehen ist, konnte durch PCR-Analyse eine vollständige Rekombination der Effektor-DNA nachgewiesen werden (Abb. 24).

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Kreuzung eines wt2-Weibchens mit einem HSPCre1-Männchen erzielt. Bei dieser Kreuzung wurden 46 Larven untersucht. Nach dem Hitze-Schock entwickelten sich die Larven normal und zeigten keine Veränderungen. Blaue Fluoreszenz und somit die Präsenz des Effektor-Gens wurden

in 21 (46 %) Larven detektiert, statistisch gesehen, entsprach dies den Erwartungen. Das Cre-Gen konnte durch PCR-Analyse jedoch nur in 16 (35 %; p-Wert = 0,04) Larven detektiert werden. Da in früheren Untersuchungen eindeutig gezeigt worden ist, dass in dem HSPCre1-Stamm das Transgen auf 50 % der Nachkommen vererbt wird, liegt die Erklärung in der PCR-Analyse. In diesem Ansatz wurde versucht, aus der ganzen Larve zuerst die Proteine und anschließend die DNA zu isolieren. Dies ist jedoch nicht gelungen, vielmehr führte dieser Versuch zur Abnahme in der DNA-Qualität und -Konzentration, so dass in vielen Fällen zu wenig DNA für die anschließende PCR-Analyse zur Verfügung stand. Aus diesem Grund konnten beide Transgene nur in 4 Larven eindeutig detektiert werden. In weiterer PCR wurde gezeigt, dass die Effektor-DNA in diesen 4 Larven rekombiniert worden ist. Anders als bei dem ins263-6-Stamm war hier die Rekombination jedoch nicht vollständig, denn neben dem rekombinierten DNA-Fragment wurde auch das native Fragment amplifiziert (Abb. 25A). Es ist bekannt, dass die transgenen Tiere zwischen 5 bis 35 Genkopien pro Zelle enthalten (Kroll und Amaya 1996). Die unterschiedliche Anzahl der integrierten Kopien führt zur Variabilität der Tiere. Es ist möglich, dass im wt2-Stamm das Transgen in einer höheren Kopiezahl als im ins263-6-Stamm in das Genom integriert worden ist, sodass die Cre-Rekombinase in gleicher Zeit nicht alle Kopien rekombinieren konnte.

Zwei Wochen nach dem Hitze-Schock konnte bei Cre- und HNF1 β -wt-positiven Larven eine Abnahme der blauen Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 25B). Durch diese Beobachtung wird das Ergebnis der PCR-Analyse bekräftigt, denn während der Rekombination wird das ECFP-Gen ausgeschnitten, sodass das blau fluoreszierende Protein nicht mehr exprimiert wird, was zur Abnahme der blauen Fluoreszenz führt.

Somit wurde eindeutig gezeigt, dass sowohl im wt2-Stamm als auch im ins263-6-Stamm die Effektor-DNA durch die Cre-Rekombinase umgelagert wird. Bei beiden Kreuzungen entwickelten sich die jeweils 4 doppelt transgenen Larven nach dem Hitze-Schock normal und zeigten keine Abnormitäten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das HNF1 β und die A263insGG-Mutante keine Auswirkungen auf die Nierenentwicklung haben. Da hier jedoch nur eine geringe Anzahl an Larven zur Verfügung stand und eine Expression des Effektor-Gens nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, sollten die Ergebnisse durch weitere Untersuchungen bekräftigt werden.

4.4.2 Durch Hitze-Schock induzierbare Rekombination der Effektor-DNA im 328del-4-Stamm

Für die Expression der HNF1 β -Mutante P328L329del wurde ein homozygotes 328del-4-Weibchen mit einem heterozygoten HSPCre1-Männchen gekreuzt, deswegen wurden beide Transgene in ~50 % der Nachkommen erwartet. Da die Kreuzung zweimal durchgeführt wurde, konnten insgesamt 163 Larven untersucht werden. Wie erwartet, zeigten alle Larven blaue Fluoreszenz, die die Präsenz des Effektor-Gens markiert, und die Cre-Rekombinase wurde bei 72 (44 %) Larven mittels PCR detektiert. Aufgrund des χ^2 -Tests (p -Wert = 0,14) entspricht dies einer 50%-Weitergabe.

Die Larven wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung Hitze geschockt. Damit sollte festgestellt werden, ob die Expression der P328L329del-Mutante zu unterschiedlichen Zeitpunkten auch einen unterschiedlichen Einfluss auf die Larvenentwicklung hat. Da die Expression von HNF1 β in *Xenopus* bereits ab dem Blastula-Stadium mit RT-PCR detektiert werden konnte (Vignali et al., 2000) und die Spezifikation der Pronephrosanlage in der späten Gastrula beginnt, wurden die Zeitpunkte des Hitze-Schocks so bestimmt, dass die P328L329del-Mutante zu Zeitpunkten exprimiert wird wie das endogene HNF1 β , im Blastula-Stadium, bevor die Spezifikation der Pronephrosanlage beginnt, im frühen Gastrula-Stadium und zum Zeitpunkt der Spezifikation, im späten Gastrula-Stadium.

Bei doppelt transgenen Larven konnte unabhängig vom Zeitpunkt des Hitze-Schocks eine Rekombination der Effektor-DNA mittels PCR-Analyse festgestellt werden. Wie bei dem wt2-Stamm war auch hier die Rekombination nicht vollständig.

Je nach Zeitpunkt des Hitze-Schocks entwickelten sich die Larven unterschiedlich. Während die Überexpression der P328L329del-Mutante ab dem Blastula-Stadium nicht mit einer normalen Larvenentwicklung interferierte, entwickelten Larven bei der Überexpression ab dem frühen und späten Gastrula-Stadium Missbildungen (Tabelle 8).

Zwar wurden bei einer Larve nach dem Hitze-Schock im Blastula-Stadium Missbildungen beobachtet, aufgrund der niedrigen Effizienz ist jedoch davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine von der Rekombination unabhängige Fehlentwicklung handelt, wie sie auch bei Wildtyp-Fröschen vorkommt.

Wie die Abbildung 29 zeigt, führte eine Überexpression der P328L329del-Mutante ab dem frühen Gastrula-Stadium zu einer signifikanten Verkleinerung oder sogar zur Agenesese des Pronephros. Dabei ist in Abbildung 28 deutlich zu sehen, dass sich die Larven bis zum Stadium 38 normal entwickelten und erst anschließend Abnormitäten zeigten. Im Stadium 38 ist die Differenzierung des Pronephros abgeschlossen, so dass das Organ seine Funktion übernehmen kann (Ryffel 2003). Da bei diesen Larven der Pronephros nicht funktionstüchtig war, entwickelten sie als Folge davon in späteren Stadien Ödeme. Im Stadium 41 zeigten die Larven einen verdickten Darmausgang und auch der Magen entwickelte sich nicht normal und zeigte im Stadium 46 nicht die typischen Windungen. Da HNF1 β im Magen-Darm-Trakt exprimiert wird (Cereghini et al., 1996), ist es wahrscheinlich, dass es auch bei der Magenentwicklung eine wichtige Rolle spielt. Eine Larve entwickelte neben Ödemen oberhalb des Magens auch ein Ödem in der Gehirnregion. Dies könnte mit Beobachtungen im Zebrafisch übereinstimmen, wo gezeigt worden ist, dass HNF1 β eine Rolle bei der Entwicklung des Nachhirns spielt (Sun und Hopkins, 2001).

Bei der Überexpression der P328L329del Mutante ab dem späten Gastrula-Stadium wurden keine Nierenanomalien festgestellt.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass es ein zeitliches Fenster gibt, in dem das HNF1 β eine wichtige Rolle für die Pronephros- und Magenentwicklung spielt. Denn nur die Überexpression ab dem frühen Gastrula-Stadium, nicht aber ab dem Blastula- oder späten Gastrula-Stadium, interferiert mit einer normalen Entwicklung dieser Organe.

Bei der Überexpression der P328L329del-Mutante ab dem späten Gastrula-Stadium wurde bei zwei Larven eine fehlerhafte Schwanzentwicklung beobachtet (Abb. 32). Wie in den Abbildungen 28 und 30 dargestellt, wurde auch bei zwei Larven, die bereits in dem frühen Gastrula-Stadium Hitze-geschockt wurden, Missbildungen in der Schwanzregion beobachtet.

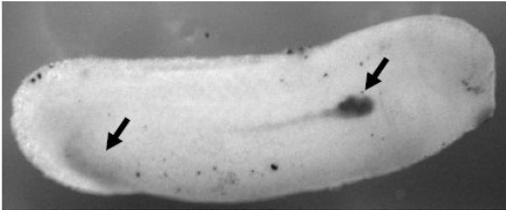


Abb. 34: Räumliches Expressions-Muster des endogenen HNF1 β in einem Wildtyp-Embryo im Schwanzknospen-Stadium

Die Transkripte wurden durch Whole mount in situ Hybridisierung mit entsprechenden Sonden detektiert. Die Pfeile markieren die Expression in der Pronephrosanlage sowie in der Schwanzknospe.

In der Abbildung 34 ist eine Whole-mount-in-situ-Hybridisierung von HNF1 β in einer Xenopus Larve im Schwanzknospen-Stadium dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass der Transkriptionsfaktor auch in der Schwanzknospe exprimiert wird. Eine Expression in der Schwanzregion wurde auch bei Maus-Embryonen detektiert (Zhou et al., 2007) und deutet daraufhin, dass HNF1 β möglicherweise auch bei der Schwanzentwicklung eine Rolle spielt. Dies würde die fehlerhafte Schwanzentwicklung in den induzierten 328del-4-Larven erklären.

Erstaunlicherweise korrelierte weder der Nieren- noch der Schwanz-Phänotyp mit der Präsenz der Cre-Rekombinase (Tabelle 8).

Der Nieren-Phänotyp wurde in allen doppelt transgenen Larven erwartet, doch konnte er nur in 38 % beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte in einer unvollständigen Rekombination, wie sie mit der PCR-Analyse detektiert wurde, gesehen werden. Cre wird insbesondere bei einer Integration mehrerer Genkopien, wie sie bei der Transgenese von Fröschen häufig vorkommt (Kroll und Amaya 1996), zutreffen.

Wie die Abbildung 35 zeigt, können die Kopien in einer Schwanz-Kopf- (Abb. 35A) oder Schwanz-Schwanz-Orientierung (Abb. 35B) integriert werden.

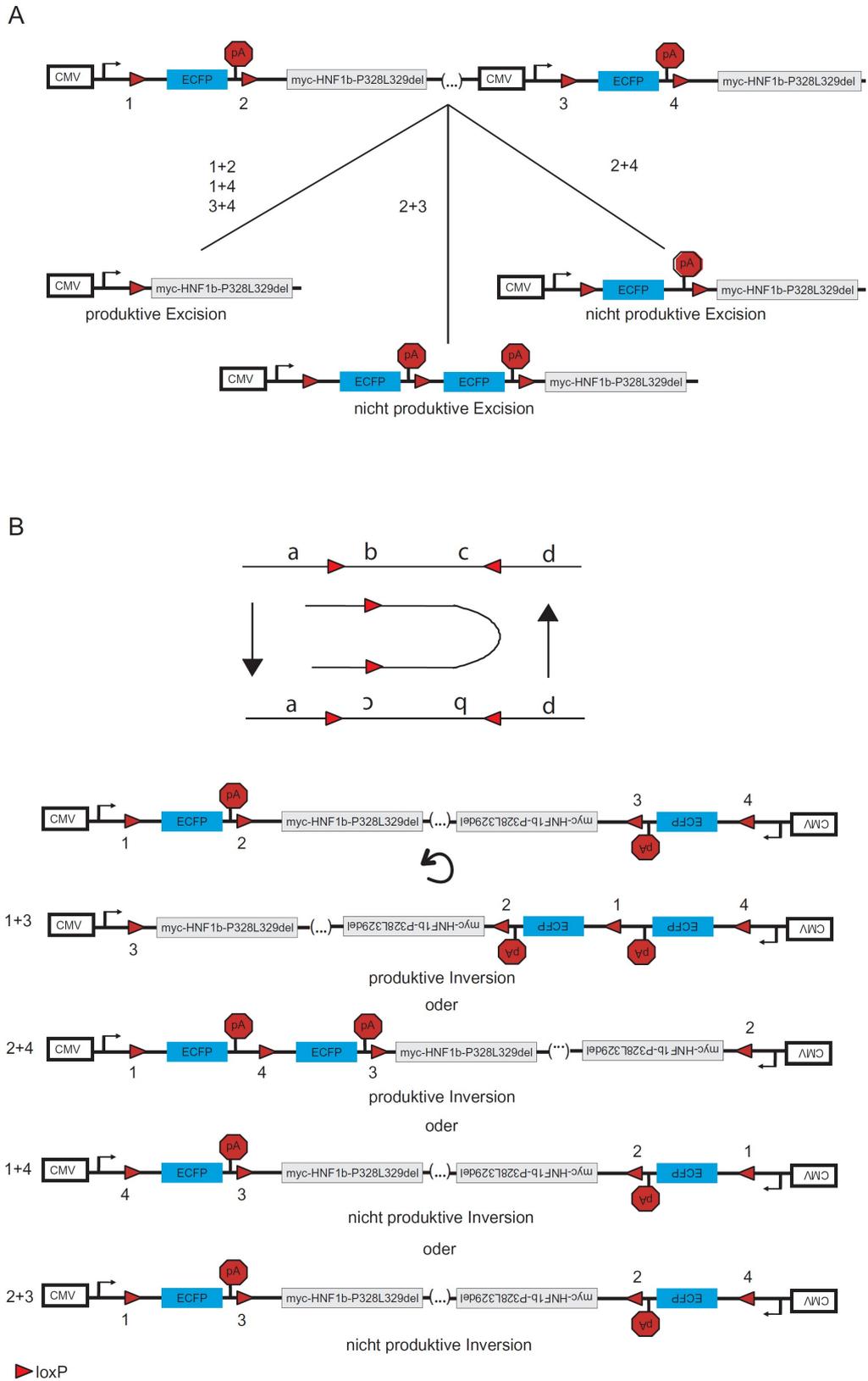


Abb. 35: Mögliche Umlagerungen einer Kopienkette der HNF1 β - P328L329del-Effektor-DNA durch die Cre-Rekombinase

A: Die Schwanz-Kopf-Orientierung führt zu einer Excision. Je nach dem zwischen welchen loxP-Sequenzen die Umlagerung stattfindet, ist die Excision produktiv oder nicht-produktiv. Die loxP-Sequenzen sind durchnummeriert. Neben den Linien sind die loxP-Sequenzen angegeben, die zu der gezeigten Excision führen.

B: Die Schwanz-Schwanz-Orientierung führt zu einer Inversion. Die loxP Sequenzen sind durchnummeriert. Das Sequenzen-Paar, das zum dargestellten Inversion-Produkt führt ist jeweils links angegeben.

Bei einer Schwanz-Kopf-Integration sind alle Cre-Erkennungssequenzen (loxP) in gleicher Orientierung. Somit kann eine Excision zwischen zwei beliebigen loxP-Sequenzen stattfinden. Wie in der Abbildung 35A dargestellt, kann es dabei zu einer produktiven oder nicht-produktiven Excision kommen. Bei einer produktiven Excision wird das Effektor-Gen unter die Kontrolle des CMV-Promotors gestellt und exprimiert, im Fall einer nicht-produktiven Excision wird dagegen weiterhin das blau fluoreszierende Protein exprimiert. Bei einer Schwanz-Schwanz-Integration gibt es neben gleich gerichteten auch invers gerichtete loxP-Sequenzen (Abb. 35B). In diesem Fall kann neben einer Excision auch eine Inversion stattfinden. Je nachdem zwischen welchen loxP-Sequenzen die Umlagerung passiert, kann es, wie in der Abbildung 35B dargestellt, zur produktiven oder nicht-produktiven Inversion kommen. Nach einer Inversion kann anschließend zwischen zwei gleich gerichteten loxP-Sequenzen wieder eine Excision stattfinden. Es wird hier deutlich, dass es bei einer Integration mehrerer Genkopien in einer Kette eine große Anzahl an Möglichkeiten gibt, wie die DNA umgelagert werden kann. Dabei führt nicht jede Umlagerung zur Expression des Effektor-Gens. Nur bei einer vollständigen Rekombination ist die Expression des Effektor-Gens gewährleistet. Aus diesem Grund sollte bei dem 328del-4-Stamm überprüft werden, wie viele Genkopien in das Genom integriert worden sind und in welcher Orientierung sie zueinander stehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein binäres System mit Aktivator- und Effektor-Stamm generiert, mit dem die Expression des Effektor-Gens zu beliebigen Zeiten in der Larvenentwicklung aktiviert werden kann.

Es wurde eindeutig gezeigt, dass die Effektor-DNA in dem 328del-4-Stamm durch die Cre-Rekombinase umgelagert wird. Die Umlagerung kann sowohl im Blastula-, im frühen als auch späten Gastrula-Stadium induziert werden. Nach der Induktion im Gastrula-Stadium wurde der gleiche Nieren-Phänotyp wie bei früheren RNA-Injektionen beobachtet. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Überexpression

von HNF1 β -P328L329del in eine normale Entwicklung des Magen-Darm-Traktes interferiert und möglicherweise auch eine Rolle in der Schwanzentwicklung spielt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die genaue Funktion von HNF1 β in der Larvenentwicklung zu bestimmen.

5 Zusammenfassung

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist ein attraktives Modell, um die frühe Entwicklung von Vertebraten auf molekularer und zellulärer Ebene zu untersuchen. Aufgrund der Transparenz der Larven kann die Organogenese mit ihren zahlreichen morphologischen Veränderungen gut beobachtet werden. Bei der Herstellung transgener Stämme werden vor allem Fluoreszenzproteine als Marker benutzt, da sie in den transparenten Larven *in vivo* einfach detektiert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine CMV-kontrollierte Expression des rot fluoreszierenden Proteins DsRedExpress mit einer normalen Larvenentwicklung interferiert. Die toxische Wirkung konnte aufgehoben werden, indem die Expression unter die Kontrolle des γ -Kristallin-Promotors gestellt worden ist. Des Weiteren wurde ein neues rot fluoreszierendes Protein, das tdTomato, als Marker in *Xenopus laevis* etabliert. Es wurde gezeigt, dass eine durch den CMV-Promotor kontrollierte Expression von tdTomato keinen Einfluss auf eine normale Larvenentwicklung hat und für Lang-Zeit-Untersuchungen eingesetzt werden kann.

Das CMV-kontrollierte tdTomato wurde als Marker bei der Herstellung der Aktivator-Stämme verwendet. Es wurden zwei Aktivator-Stämme generiert, in denen die Cre-Rekombinase durch einen Hitze-Schock aktiviert werden kann, der HSPCre1- und der HSPCre13-Stamm.

Durch Kreuzung mit dem Reporter-Stamm wurde gezeigt, dass in dem HSPCre1-Stamm die Expression der Rekombinase zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung induziert werden kann. Die vollständige Rekombination der DNA erfolgte innerhalb von vier Stunden ab Beginn des Hitze-Schocks und führte zur Aktivierung des gelb fluoreszierenden Proteins im Reporter-Gen.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass in den drei verwendeten Effektor-Stämmen eine Cre-vermittelte Rekombination der transgenen DNA stattfindet. Die damit verbundene Überexpression von HNF1 β und der A263insGG-Mutante hatte keine Auswirkungen auf die Larvenentwicklung wohingegen die Überexpression von HNF1 β -P328L329del einen Nieren-Phänotyp zur Folge hatte und mit einer normalen Entwicklung des Magen-Darm-Traktes interferierte. Darüber hinaus konnte ein zeitliches Fenster bestimmt werden, in dem das HNF1 β eine wichtige Rolle in der Pronephros- und

Magenentwicklung spielt, da nur die Überexpression ab dem Gastrula-Stadium mit einer normalen Entwicklung dieser Organe interferierte.

Mit dem HSPCre1-Aktivator-Stamm und den drei Effektor-Stämmen, wt2, 328del-4 und ins263-6, wurde im *Xenopus laevis* ein binäres System etabliert, in dem die Expression der Effektor-Gene durch Cre-vermittelte Rekombination zu beliebigen Zeitpunkten in der Entwicklung aktiviert werden kann.

6 Literaturverzeichnis

Agbulut,O., Coirault,C., Niederländer,N., Huet,A., Vicart,P., Hagège,A., Puceat,M. Menasché,P. (2006) GFP expression in muscle cells impairs actin-myosin interactions: implications for cell therapy. *Nat. Med.* 3, 331.

Amaya,E., Kroll,KL. (1999) A method for generating transgenic frog embryos. *Method Mol Biol.* 97, 393-414.

Bai,Y., Pontoglio,M., Hiesberger,T., Sinclair,A., Igarashi,P. (2002) Regulation of kidney-specific Ksp-cadherin gene promoter by hepatocyte nuclear factor-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283: F839–F851.

Baird,GS., Zacharias,DA., Tsien,R.Y. (2000) Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *PNAS* 97, 11984-11989.

Beck,C.W., Slack,J.M.W. (1999) Gut specific expression using mammalian promoters in transgenic *Xenopus laevis*. *Mechanisms of Development* 88, 221-227

Beck,C.W., Christen,B., Slack,J.M.W. (2003) Molecular Pathways Needed for Regeneration of Spinal Cord and Muscle in a Vertebrate. *Developmental Cell* 5, 429–439

Bellanne´-Chantelot,C., Chauveau,D., Gautier,J.F., Dubois-Laforgue,D., Se´verine Clauin,S., Beaufils,S., Wilhelm,J.M, Boitard,C., Noel,L.H., Velho,G., Timsit,J. (2004) Clinical Spectrum Associated with Hepatocyte Nuclear Factor-1 Mutations. *Ann Intern Med.* 140, 510-517.

Bernardini,G., Prati,M., Bonetti,E., and Scari,G. (1999). *Atlas of Xenopus Development.* Springer-Verlag Italia).

Bingham,C., Ellard,S., Allen,L., Bulman,M., Shepherd,M., Frayling,T., Berry,P.J., Clark,P.M., Lindner,T., Bell,G.I., Ryffel,G.U., Nicholls,A.J., and Hattersley,A.T. (2000). Abnormal nephron development associated with a frameshift mutation in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1 beta. *Kidney Int.* 57, 898-907.

Blechinger,S.R., Evans,T.G., Tang,P.T., Kuwada,J.Y., Warren,J.T.Jr., Krone,P.H. (2002) The heat-inducible zebrafish hsp70 gene is expressed during normal lens development under non-stress conditions. *Mech Dev.* 112, 213-215.

Bohn,S., Thomas,H., Turan,G., Ellard,S., Bingham,C., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U. (2003). Distinct molecular and morphogenetic properties of mutations in the human HNF1beta gene that lead to defective kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2033-2041.

- Brakenhoff,R.H., Ruuls,R.C., Jacobs,E.H., Schoenmakers,J.G., Lubsen,N.H. (1991) Transgenic *Xenopus laevis* tadpoles: a transient in vivo model system for the manipulation of lens function and lens development. *Nucleic Acids Res.* 19, 1279-84.
- Bronchain,O.J., Hartley,K.O., Amaya,E. (1999) A gene trap approach in *Xenopus*. *Current Biology*, 9, 1195–1198
- Buchholz,F., Ringrose,L., Angrand,P.O., Rossi,F., Stewart,A.F. (1996) Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* 24, 4256-62.
- Buchholz,F., Angrand,P.O., Stewart,A.F. (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol.* 16, 657-62.
- Buchholz,D.R., Tomita,A., Fu,L., Paul,B.D., and Shi,Y.B. (2004). Transgenic analysis reveals that thyroid hormone receptor is sufficient to mediate the thyroid hormone signal in frog metamorphosis. *Mol. Cell Biol.* 24, 9026-9037.
- Cereghini,S., Blumenfeld,M., and Yaniv,M. (1988). A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. *Genes Dev.* 2, 957-974.
- Cereghini,S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* 10, 267-282.
- Chae,J., Zimmerman,L.B., and Grainger,R.M. (2002). Inducible control of tissue-specific transgene expression in *Xenopus tropicalis* transgenic lines. *Mech. Dev.* 117, 235-241.
- Choulika,A., Perrin,A., Dujon,B., Nicolas,J.F. (1995) Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 15, 1968-73.
- Coffinier,C., Thepot,D., Babinet,C., Yaniv,M., and Barra,J. (1999). Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development* 126, 4785-4794.
- Coffinier,C., Gresh,L., Fiette,L., Tronche,F., Schutz,G., Babinet,C., Pontoglio,M., Yaniv,M., and Barra,J. (2002). Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Development* 129, 1829-1838.
- Cronin,C.A., Gluba,W., Scrable,H., (2001) The lac operator-repressor system is functional in the mouse. *Genes Dev.* 15, 1506-17
- Danielian,P.S., Muccino,D., Rowitch,D.H., Michael,S.K., McMahon,A.P. (1998) Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol.* 8, 1323-6.
- Das,B. and Brown,D.D. (2004). Controlling transgene expression to study *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 4839-4842.

- Demartis,A., Maffei,M., Vignali,R., Barsacchi,G., and De,S., V (1994). Cloning and developmental expression of LFB3/HNF1 beta transcription factor in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 47, 19-28.
- Deryckere,F., Byrnes,L., Wagner,A., McMorrow,T., and Gannon,F. (1995). Salmon HNF1:cDNA sequence, evolution, tissue specificity and binding to the salmon serum albumin promoter. *J. Mol. Biol.* 247, 1-10.
- Dukes,I.D., Sreenan,S., Roe,M.W., Levisetti,M., Zhou,Y.P., Ostrega,D., Bell,G.I., Pontoglio,M., Yaniv,M., Philipson,L., and Polonsky,K.S. (1998). Defective pancreatic betacell glycolytic signaling in hepatocyte nuclear factor-1alpha-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 273, 24457-24464.
- 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.
- Edghill,E.L., Bingham,C., Ellard,S., and Hattersley,A.T. (2006). Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. *J. Med. Genet.* 43, 84-90.
- Etkin,L., Pearman,B., Roberts,M., Bektesh,S.L. (1984) Replication, integration and expression of exogenous DNA injected into fertilized eggs of *Xenopus laevis*. *Differentiation* 26, 194–202.
- Frain,M., Swart,G., Monaci,P., Nicosia,A., Stampfli,S., Frank,R., and Cortese,R. (1989). The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell* 59, 145-157.
- Fu,L., Buchholz,D., and Shi,Y.B. (2002). Novel double promoter approach for identification of transgenic animals: A tool for in vivo analysis of gene function and development of gene-based therapies. *Mol. Reprod. Dev.* 62, 470-476.
- Fuhrmann-Benzakein,E., Gracia-Gabay,I., Pepper,M.S., Vassalli,J.D., Herrera,P.L., (2000) Inducible and irreversible control of gene expression using a single transgene. *Nucleic Acids Res.* 28, E99
- Gossen,M., Bujard,H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5547-5551
- Gossen,M., Freundlieb,S., Bender,G., Muller,G., Hillen,W., Bujard,H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cell. *Science* 268, 1766-1769
- Göttgens,B., Nastos,A., Kinston,S., Piltz,S., Delabesse,E.C., Stanley,M., Sanchez,M.J., Ciau-Uitz,A., Patient,R., and Green,A.R. (2002). Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *EMBO J.* 21, 3039-3050.
- Grabher,C., Joly,J.S., Wittbrodt,J. (2004) Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease I-SceI. *Methods Cell Biol.* 77, 381-401.

- Grabher,C., Wittbrodt,J. (2007) Meganuclease and transposon mediated transgenesis in medaka Genome Biol. 8, S10. Review
- Gresh,L., Fischer,E., Reimann,A., Tanguy,M., Garbay,S., Shao,X., Hiesberger,T., Fiette,L., Igarashi,P., Yaniv,M., and Pontoglio,M. (2004). A transcriptional network in polycystic kidney disease. EMBO J. 23, 1657-1668.
- Gross,J.B., Hanken,J., Oglesby,E., and Marsh-Armstrong,N. (2006). Use of a ROSA26:GFP transgenic line for long-term Xenopus fate-mapping studies. J. Anat. 209, 401-413.
- Hadjantonakis,A.K., Macmaster,S., Nagy,A. (2002) Embryonic stem cells and mice expressing different GFP variants for multiple non-invasive reporter usage within a single animal. BMC Biotech. 2
- Halfon,M.S., Kose,H., Chiba,A., and Keshishian,H. (1997). Targeted gene expression without a tissue-specific promoter: creating mosaic embryos using laser-induced single-cell heat shock. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94, 6255-6260.
- Hartley,K.O., Nutt,S.L., and Amaya,E. (2002). Targeted gene expression in transgenic Xenopus using the binary Gal4-UAS system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 1377-1382.
- Haumaitre,C., Barbacci,E., Jenny,M., Ott,M.O., Gradwohl,G., and Cereghini,S. (2005). Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 102, 1490-1495.
- Haumaitre,C., Fabre,M., Cormier,S., Baumann,C., Anne-Lise Delezoide,A.L., Cereghini,S. (2006) Severe pancreas hypoplasia and multicystic renal dysplasia in two human fetuses carrying novel HNF1 β /MODY5 mutations. Hum. Mol. Genet., 15, 2363–2375
- Hiesberger,T., Bai,Y., Shao,X., McNally,B.T., Sinclair,A.M., Tian,X., Somlo,S., Igarashi,P. (2004) Mutation of hepatocyte nuclear factor-1beta inhibits Pkhd1 gene expression and produces renal cysts in mice. J Clin Invest. 113, 814-25
- Hiesberger,T., Shao,X., Gourley,E., Reimann,A., Pontoglio,M., and Igarashi,P. (2005). Role of the hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) C-terminal domain in Pkhd1 (ARPKD) gene transcription and renal cystogenesis. J. Biol. Chem. 280, 10578-10586.
- Horikawa,Y., Iwasaki,N., Hara,M., Furuta,H., Hinokio,Y., Cockburn,B.N., Lindner,T., Yamagata,K., Ogata,M., Tomonaga,O., Kuroki,H., Kasahara,T., Iwamoto,Y., and Bell,G.I. (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. Nat. Genet. 17, 384-385.
- Hosemann,K.E., Colosimo,P.F., Summers,B.R., Kingsley,D.M. (2004) A simple and efficient microinjection protocol for making transgenic sticklebacks. Behaviour. 141,1345–1355

- Huang,H., Marsh-Armstrong,N., Brown,D.D. (1999) Mtamorphosis is inhibited in Transgenic Xenopus laevis tadpoles that overexpress type III deiodinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 962-967
- Ikari,A., Suketa,Y. (2002) Expression of GFP-tagged low affinity Na⁺-dependent glucose transporter in Xenopus oocytes and CHO cells. Jpn J Physiol. 52, 395-8
- Jones,E.A. (2005). Xenopus: a prince among models for pronephric kidney development. J. Am. Soc. Nephrol. 16, 313-321.
- Kellendonk,C., Tronche,F., Casanova,E., Anlag,K., Opherk,C., Schütz,G. (1999) Inducible site-specific recombination in the brain. J Mol Biol. 285,175-182.
- Kilby,N.J., Snaith,M.R., Murray,J.A., (1993) Site-specific recombinases: tools for genome engineering. Trends Genet. 9, 413-421
- Kroll,K.L. and Amaya,E. (1996). Transgenic Xenopus embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. Development 122, 3173-3183.
- Lewandoski,M. (2001) Conditional control of gene expression in the mouse. Nat Rev Genet. 2, 743-55
- Link,C.D., Fonte,V., Hiester,B., Yerg,J., Ferguson,J., Csontos,S., Silverman,M.A., Stein,G.H. (2006) Conversion of green fluorescent protein into a toxic, aggregation-prone protein by C-terminal addition of a short peptide. J Biol Chem. 281, 1808-1816
- Lu,P., Rha,G.B., Chi,Y.I. (2007) Structural basis of disease-causing mutations in hepatocyte nuclear factor 1beta. Biochemistry. 46, 12071-12080
- Ludwig,D.L., Stringer,J.R., Wight,D.C., Doetschman,H.C., Duffy,J.J. (1996) FLP-mediated site-specific recombination in microinjected murine zygotes. Transgenic Res. 5, 385-95
- Maestro,M.A., Cardalda,C., Boj,S.F., Luco,R.F., Servitja,J.M., Ferrer,J. (2007) Distinct roles of HNF1beta, HNF1alpha, and HNF4alpha in regulating pancreas development, beta-cell function and growth. Endocr Dev. 12,33-45
- Marsh-Armstrong,N., Huang,H., Berry,D.L., Brown,D.D. (1999) Germ-line transmission of transgenes in Xenopus laevis. Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 14389-14393
- Michiue,T., Asashima,M. (2005) Temporal and spatial manipulation of gene expression in Xenopus embryos by injection of heat shock promoter-containing plasmids. Dev Dyn. 232, 369-376
- Nieuwkoop,P.D. and Faber,J. (1975). Normal table of Xenopus laevis (Daudin). (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North-Holland Publishing Co).

- Nishigori,H., Yamada,S., Kohama,T., Tomura,H., Sho,K., Horikawa,Y., Bell,G.I., Takeuchi,T., Takeda,J. (1998) Frameshift mutation, A263fsinsGG, in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene associated with diabetes and renal dysfunction. *Diabetes*. 47, 1354-1355.
- Offield,M.F., Hirsch,N., Grainger,R.M. (2000) The development of *Xenopus tropicalis* transgenic lines and their use in studying lens developmental timing in living embryos. *Development*. 127, 1789-1797
- Ogino,H., McConnell,W.B., and Grainger,R.M. (2006). Highly efficient transgenesis in *Xenopus tropicalis* using I-SceI meganuclease. *Mech. Dev.* 123, 103-113.
- Ornitz,D.M., Moreadith,R.W., Leder,P. (1991) Binary system for regulating transgene expression in mice: targeting int-2 gene expression with yeast GAL4/UAS control elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88, 698-702
- Pan,F.C., Chen,Y., Loeber,J., Henningfeld,K., and Pieler,T. (2006). I-SceI meganuclease-mediated transgenesis in *Xenopus*. *Dev. Dyn.* 235, 247-252.
- Pfeifer,A., Brandon,E.P., Kootstra,N., Gage,F.H., Verma,I.M. (2001) Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 11450-11455.
- Phillips,K., Luisi,B. (2000) The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *J Mol Biol.* 302, 1023-1039.
- Pontoglio,M., Prie,D., Cheret,C., Doyen,A., Leroy,C., Froguel,P., Velho,G., Yaniv,M., and Friedlander,G. (2000). HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep.* 1, 359-365.
- Puchta H, Dujon B, Hohn B. (1993) Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 21, 5034-5040
- Ramos,D.M., Kamal,F., Wimmer,E.A., Cartwright,A.N., and Monteiro,A. (2006). Temporal and spatial control of transgene expression using laser induction of the hsp70 promoter. *BMC. Dev. Biol.* 6, 55.
- Raymond,C.S., Soriano,P. (2007) High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells. *PLoS ONE.* 2, e162.
- Resnicow,D.I., Hooft,A.M., Harrison,B.C., Baker,J.E., Leinwand,L.A. (2008) GFP fails to inhibit actin-myosin interactions in vitro. *Nat Methods.* 5, 212-213.
- Ridgway,P., Quivy,J.P., and Almouzni,G. (2000). Tetracycline-regulated gene expression switch in *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Res.* 256, 392-399.
- Ringrose,L., Lounnas,V., Ehrlich,L., Buchholz,F., Wade,R., Stewart,A.F. (1998) Comparative kinetic analysis of FLP and cre recombinases: mathematical models for DNA binding and recombination. *J Mol Biol.* 284, 363-384.

- Rodríguez,C.I., Buchholz,F., Galloway,J., Sequerra,R., Kasper,J., Ayala,R., Stewart,A.F., Dymecki,S.M. (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet.* 25, 139-140.
- Rosenfeld,M.G. (1991) POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. *Genes Dev.* 5, 897-907.
- Ryan,A.K., Rosenfeld,M.G. (1997) POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev.* 11, 1207-1225.
- Ryffel,G.U. (2003). What can a frog tell us about human kidney development. *Nephron Exp. Nephrol.* 94, e35-e43.
- Ryffel,G.U. and Lingott,A. (2000). Distinct promoter elements mediate endodermal and mesodermal expression of the HNF1alpha promoter in transgenic *Xenopus*. *Mech. Dev.* 90, 65-75.
- Ryffel,G.U., Werdien,D., Turan,G., Gerhards,A., Goosses,S., and Senkel,S. (2003). Tagging muscle cell lineages in development and tail regeneration using Cre recombinase in transgenic *Xenopus*. *Nucleic Acids Res.* 31, e44.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular cloning - a laboratory manual.* (Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Schaft J, Ashery-Padan R, van der Hoeven F, Gruss P, Stewart AF. (2001) Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes. *Genesis.* 31, 6-10
- Schmidt,E.E., Taylor,D.S., Prigge,J.R., Barnett,S., Capecchi,M.R. (2000) Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 13702-13707.
- Schwenk,F., Kuhn,R., Angrand,P.O., Rajewsky,K., Stewart,A.F. (1998) Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* 26, 1427-1432
- Senkel,S., Lucas,B., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (2005). Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1731, 179-190.
- Shaner,N.C., Campbell,R.E., Steinbach,P.A., Giepmans,B.N., Palmer,A.E., Tsien,R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 22, 1567-1572.
- Sive,H., Grainger,R.M., and Harland,R.M. (2000). *Early development of Xenopus laevis: a laboratory manual.* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Smith,S.J., Ataliotis,P., Kotecha,S., Towers,N., Sparrow,D.B., Mohun,T.J. (2005) The MLC1v gene provides a transgenic marker of myocardium formation within developing chambers of the *Xenopus* heart. *Dev Dyn.* 232, 1003-1012.

- Sobkow,L., Epperlein,H.H., Herklotz,S., Straube,W.L., Tanaka,E.M. (2006) A germline GFP transgenic axolotl and its use to track cell fate: dual origin of the fin mesenchyme during development and the fate of blood cells during regeneration. *Dev Biol.* 290, 386-397.
- Sparrow,D.B., Cai,C., Kotecha,S., Latinkc,B., Cooper,B., Towers,N., Evans,S.M., Mohun,T.J. (2000) Regulation of the tinman homologues in *Xenopus* embryos. *Dev Biol.* 227, 65-79.
- Stark,W.M., Boocock,M.R., Sherratt,D.J. (1992) Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet.* 8, 432-439.
- Stefani,M., Dobson,C.M. (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med.* 81, 678-699.
- Sun,Z. and Hopkins,N. (2001). *vhnf1*, the *MODY5* and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain. *Genes Dev.* 15, 3217-3229.
- Sun,Z., Amsterdam,A., Pazour,G.J., Cole,D.G., Miller,M.S., and Hopkins,N. (2004). A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. *Development* 131, 4085-4093.
- Tao,W., Evans,B.G., Yao,J., Cooper,S., Cornetta,K., Ballas,C.B., Hangoc,G., Broxmeyer,H.E. (2007) Enhanced green fluorescent protein is a nearly ideal long-term expression tracer for hematopoietic stem cells, whereas DsRed-express fluorescent protein is not. *Stem Cells.* 25, 670-678.
- Tena,J.J., Neto,A., de,I.C.-M., Bras-Pereira,C., Casares,F., and Gomez-Skarmeta,J.L. (2007). Odd-skipped genes encode repressors that control kidney development. *Dev. Biol.* 301, 518-531.
- Terskikh,A.V., Fradkov,A.F., Zaraisky,A.G., Kajava,A.V., Angres,B. (2002) Analysis of DsRed Mutants. Space around the fluorophore accelerates fluorescence development. *J Biol Chem.* 277, 7633-7636.
- Thomas,H., Senkel,S., Erdmann,S., Arndt,T., Turan,G., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (2004). Pattern of genes influenced by conditional expression of the transcription factors HNF6, HNF4alpha and HNF1beta in a pancreatic beta-cell line. *Nucleic Acids Res.* 32, e150.
- Thummel,R., Burket,C.T., Brewer,J.L., Sarras,M.P.Jr., Li,L., Perry,M., McDermott,J.P., Sauer,B., Hyde,D.R., Godwin,A.R. (2005) Cre-mediated site-specific recombination in zebrafish embryos. *Dev Dyn.* 233, 1366-1377.
- Thyagarajan,B., Guimaraes,M.J., Groth,A.C., Calos,M.P. (2000) Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene.* 244, 47-54.

- Tronche,F., Yaniv,M. (1992) HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network. *Bioessays*. 14, 579-587.
- Vignali,R., Poggi,L., Madeddu,F., and Barsacchi,G. (2000). HNF1(beta) is required for mesoderm induction in the *Xenopus* embryo. *Development* 127, 1455-1465.
- Vize,P.D., Jones,E.A., and Pfister,R. (1995). Development of the *Xenopus* pronephric system. *Dev. Biol.* 171, 531-540.
- Vize,P.D., Seufert,D.W., Carroll,T.J., and Wallingford,J.B. (1997). Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. *Dev. Biol.* 188, 189-204.
- Vize,P.D., Carroll,T.J., and Wallingford,J.B. (2003). Introduction: Embryonic kidneys and other nephrogenic models. In *The Kidney: From Normal Development To Congenital Disease*, P.D.Vize, A.S.Woolf, and J.B.L.Bard, eds. (Amsterdam: Academic Press), pp. 1-6.
- Waldner,C., Sakamaki,K., Ueno,N., Turan,G., and Ryffel,G.U. (2006). Transgenic *Xenopus laevis* strain expressing cre recombinase in muscle cells. *Dev. Dyn.* 235, 2220-2228.
- Wang,Y., Xu,J., Pierson,T., O'Malley,B.W., Tsai,S.Y. (1997) Positive and negative regulation of gene expression in eukaryotic cells with an inducible transcriptional regulator. *Gene Ther.* 4, 432-441.
- Wang,L., Coffinier,C., Thomas,M.K., Gresh,L., Eddu,G., Manor,T., Levitsky,L.L., Yaniv,M., and Rhoads,D.B. (2004). Selective deletion of the *Hnf1beta* (*MODY5*) gene in beta-cells leads to altered gene expression and defective insulin release. *Endocrinology* 145, 3941-3949.
- Werdien,D., Peiler,G., Ryffel,G.U. (2001) FLP and Cre recombinase function in *Xenopus* embryos. *Nucleic Acids Res.* 29, E53-3.
- Wheeler,G.N., Hamilton,F.S., and Hoppler,S. (2000). Inducible gene expression in transgenic *Xenopus* embryos. *Curr. Biol.* 10, 849-852.
- Wild,W., Pogge,v.S., Nastos,A., Senkel,S., Lingott-Frieg,A., Bulman,M., Bingham,C., Ellard,S., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U. (2000). The mutated human gene encoding hepatocyte nuclear factor 1beta inhibits kidney formation in developing *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4695-4700.
- Zhou,Z., Kang,X., Jiang,Y., Song,Z., Feng,W., McClain,C.J., Kang,Y.J. (2007) Preservation of hepatocyte nuclear factor-4alpha is associated with zinc protection against TNF-alpha hepatotoxicity in mice. *Exp Biol Med* (Maywood). 232, 622-6228.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. phil nat. Gerhart Ryffel für die Überlassung des interessanten Themas, die ständige Gesprächsbereitschaft und das Interesse am Fortgang sowie die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Dr. Christoph Waldner für die intensive Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft sowie die hervorragende Einarbeitung in die Transgenese-Technik.

Bei Gülüzar Turan möchte ich mich für die sehr große Unterstützung und viel Geduld bei diversen Klonierungen bedanken. Außerdem danke ich recht herzlich für die vielen Gespräche und Aufmunterungen, die mir über so manche schwierige Phase geholfen haben.

Frau Sabine Senkel danke ich für die guten Ratschläge in technischen Fragen, die mir oft die Arbeit erleichtert haben.

Bei Natalie Solomentsew bedanke ich mich für die Durchführung der vielen PCR-Analysen.

Bei Karen Grigo und Karin Dudziak bedanke ich mich für die tolle Atmosphäre und den freundlichen Umgang. Es hat viel Spaß gemacht mit euch zusammenzuarbeiten. Karen danke ich auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Andrea Wirsing, Christiane Drews und Kathrin Sauert danke ich für die nette Aufnahme in die „neue“ Gruppe und die vielen Gespräche, auch wenn sie meist nicht fachlicher Natur waren.

David Nickol, Thomas und Michael danke ich für die tolle Pflege der adulten *Xenopus laevis*.

Bei der gesamten AGIII möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und große Hilfsbereitschaft bedanken.

Meinen Eltern danke ich für die große Unterstützung, vor allem bei der Betreuung von Benedikt und ihr großes Vertrauen.

Meinem Mann danke ich für seine Geduld und die liebevolle Unterstützung. Ohne dich hätte ich es nicht geschafft.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Beeinflussung der Genregulation durch Rekombinasen in der Entwicklung von *Xenopus laevis*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Magdalena Roose befürworte.

Essen, den 17.06.2008

(Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 17.06.2008

(Magdalena Roose)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 17.06.2008

(Magdalena Roose)

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Magdalena Roose
Geburtsdatum: 23. März 1977
Geburtsort: Königshütte (Oberschlesien)
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

SCHULAU SBILDUNG

1984 - 1989: Volksschule, Oberschlesien
1989 - 1990: Elsa-Brandström-Schule, Ratingen
1990 - 1995: Erzbischöfliche Realschule, Ratingen
1995 - 1998: Erzbischöfliches Suitbertus-Gymnasium, Düsseldorf
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

BERUFSAU SBILDUNG

10.1998 - 01.2004: Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität-Bochum
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie,
Medizinische Fakultät, Ruhr-Universität Bochum, Prof. Dr. med.
S.G. Gatermann; Thema: „Konstruktion einer totalen knockout
Mutante des Autolysin- Adhäsins Gens (aas) von *Staphylococcus
saprophyticus*“
Abschluss: Diplom-Biochemikerin
Seit 04/2004: Promotion am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums
Essen in der Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie von Prof. Dr.
Gerhart U. Ryffel

Essen, den 17.06.2008

(Magdalena Roose)