

Rekombinase vermittelter Kassettenaustausch im Mausgenom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Matthias Lauth
aus Mannheim

Frankfurt 2003

(D F 1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Walter E. Müller
Gutachter: PD Dr. Michael Meyer, Prof. Dr. Bernd Ludwig
Datum der Disputation: 18. März 2003

1	Zusammenfassung	6
2	Einleitung	8
2.1	Herstellung genetisch modifizierter Mäuse	8
2.2	Einführung in sequenz-spezifische Rekombinationssysteme	13
2.3	Anwendung sequenz-spezifischer Rekombinationssysteme in der Mausgenetik	17
2.4	Rekombinase vermittelter Kassettenaustausch	18
3	Zielsetzung der Arbeit	21
4	Material und Methoden	22
4.1	Materialien	22
4.1.1	Geräte	22
4.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	23
4.1.3	Enzyme	24
4.1.4	Bakterien	25
4.1.5	Plasmide	25
4.1.6	Zelllinien	26
4.1.7	Verwendete Mausstämme	27
4.1.8	Medien und Substrate	27
4.1.9	Lösungen	28
4.1.10	Lösungen für die Zellkultur/Stammzellkultur	35
4.1.11	Primersequenzen	37
4.1.12	Southern Blot-Sonden	38
4.2	Methoden	39
4.2.1	Klonierungsarbeiten	39
4.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	42
4.2.3	Proteinarbeiten	43
4.2.4	Zellkultur	44

4.2.5	Southern Blot genomischer DNA	46
4.2.6	Methoden zur Herstellung genetisch modifizierter Mäuse	48
5	Ergebnisse	50
5.1	Ergebnisteil I	50
5.1.1	Bisherige Vorarbeiten	50
5.1.2	Generation der PN2Flox-Mauslinie	51
5.1.3	Demonstration der korrekten Expression und subzellulären Lokalisation der Cre-Rekombinase in frühen Embryonen	51
5.1.4	Cre vermittelte Integration	53
5.1.5	Rekombinationsereignisse in Postimplantationsembryonen	56
5.1.6	Herstellung und Injektion von Cre-Protein	57
5.1.7	Verwendung eines Liganden induzierbaren Cre-Systems	61
5.1.8	Kurzzusammenfassung des 1. Ergebnisteils und weiterführende Überlegungen zur Stabilität Rekombinase vermittelter Austauschprodukte	63
5.2	Ergebnisteil II	64
5.2.1	Grundschema eines erweiterten RMCE-Ansatzes	64
5.2.2	Das Expressionsplasmid	66
5.2.3	„Transienter“ Frox-Assay	68
5.2.4	Exklusivität der verwendeten Erkennungssequenzen	70
5.2.5	Froxing in ES-Zellen unter Selektionsdruck	73
5.2.6	Froxing in ES Zellen ohne Selektionsdruck	75
5.2.7	Kurzzusammenfassung des 2. Ergebnisteils	78
6	Diskussion	79
7	Appendix	91
8	Abkürzungen	93

9	Literaturverzeichnis	95
10	Danksagung	111
11	Lebenslauf	112
12	Liste der eigenen Publikationen	113

1 Zusammenfassung

Sequenz-spezifische DNA-Rekombination (SSR) bewirkende Systeme aus niederen Organismen, wie z.B. das Cre/loxP-System aus dem P1-Phagen oder das Flp/FRT-System aus Hefe, sind in den letzten Jahren als wichtige und weitverbreitete Werkzeuge zur Modifikation des Säugergenoms etabliert worden. Dies hängt unter anderem mit der Vielfalt an Reaktionen zusammen, welche diese Systeme in der Lage sind durchzuführen. Dazu zählen Exzisions/Deletions-, Integrations-, Inversions- und Translokationsreaktionen. Die hier vorgestellte Arbeit fokussiert auf die Integrationsreaktion, welche aus thermodynamischen Gründen bisher keine breite Anwendung finden konnte, und ihren Einsatz bei der Etablierung allelischer Serien in embryonalen Stammzellen (ES Zellen) oder frühen Embryonen der Maus. Eine solche Methodik wäre ideal für Fragestellungen zu Funktionen von Genen *in vivo* (Functional Genomics) geeignet.

Zur Anwendung kam ein als „Rekombinase vermittelter Kassettenaustausch“ (recombinase-mediated cassette exchange, RMCE) bezeichnetes Verfahren. RMCE ist ein Zwei-Schritt-Verfahren: Zuerst wird der interessierende Genort durch homologe Rekombination derart verändert, daß 5' und 3' des Genlocus SSR-Erkennungsstellen eingeführt werden. Durch das Einbringen eines die gleichen Erkennungsstellen tragenden Austauschplasmides und die Bereitstellung der entsprechenden Rekombinase kann die im Genom residierende gegen die eingebrachte Kasette (von Erkennungsstellen flankiertes DNA-Segment) ausgetauscht werden. In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Ansätze für RMCE vorgestellt: Der erste Ansatz basiert auf der Verwendung heterospezifischer lox-Sequenzen, welche sich in einer Base unterscheiden (lox511/loxP). Diese Mutation sollte eine effektive Integration durch Verhinderung der Exzision gewährleisten. Es konnte hier gezeigt werden, daß RMCE unter Verwendung einer solchen Methodologie in ES Zellen und frühen Mausembryonen effizient möglich ist, daß das Produkt der Integration jedoch instabil ist und nachfolgender Exzision unterliegt. Diese Deletionsreaktionen sind durch promiskuitive Rekombination der verwendeten lox511 und loxP bedingt. Aus diesen Erkenntnissen wurde ein zweiter Ansatz entwickelt, welcher auf dem simultanen Einsatz des Cre/lox- und des Flp/FRT-Systems basiert.

Diese Methodik umgeht die Nachteile promiskuitiver Erkennungssequenzen und ihre Anwendbarkeit, Funktionsfähigkeit und Effizienz in ES Zellen konnten demonstriert werden. Ein solches Verfahren, welches sowohl in Zellkultur als auch in frühen Mausembryonen zum Einsatz kommen könnte, bietet insbesondere im Hinblick auf zukünftige Bedürfnisse in der Functional Genomics viele Optionen.

2 Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung und Evaluierung einer Methodik zur vereinfachten Einführung von Mutationen an definierten Orten im Mausgenom. Zum generellen Verständnis dieses Ansatzes soll daher zunächst der derzeitige Stand der Techniken zur Herstellung genetisch modifizierter Mäuse vorgestellt werden. Im Anschluß daran werden die Grundprinzipien sequenz-spezifischer DNA-Rekombination und ihre in Bezug auf diese Arbeit wichtigen Anwendungen erläutert.

2.1 Herstellung genetisch modifizierter Mäuse

Die Frage nach der *in vivo* Funktion bestimmter Gene (Functional Genomics) ist in den letzten Jahren sehr stark in den Vordergrund getreten. Dies hängt hauptsächlich mit den Ergebnissen der Genom- und EST (Expressed Sequence Tag)-Sequenzierungsprojekte und der DNA-Chip-Expressionsanalyse zusammen. Bei diesen Projekten wurde eine Vielzahl neuer Gene gefunden, deren Funktion noch unbekannt ist, die aber eventuell medizinische Relevanz besitzen. Eine weitere Erkenntnis ist, daß eine relativ niedrige Anzahl von Genen eine ganze Reihe von unterschiedlichen Transkripten kodiert. Dies wird hauptsächlich durch alternatives Splicing und die Verwendung alternativer Promotoren bewerkstelligt.

Eine Möglichkeit, die *in vivo* Funktion eines Genes zu untersuchen, ist die Etablierung von Mauslinien, welche definierte Veränderungen im Genom tragen. Der möglicherweise resultierende Phänotyp läßt anschließend eine Aussage über die Funktion des mutierten Gens zu. Heterologe DNA wird meist in eines von zwei bestimmten Entwicklungsstadien der Maus in das Genom eingebracht (schematisch in Abbildung 2.1 dargestellt). Dazu sollen hier die wichtigsten Schritte der frühen Mausembryogenese grob umrissen werden. Die ersten Entwicklungsschritte verlaufen ähnlich denen des Menschen: Nach der Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium kommt es zu mehreren symmetrischen Teilungen (2-, 4-, 8-Zellstadien) und der Embryo gelangt anschließend in das Morulastadium (8-16-Zellstadium). Diesem folgen größere morphologische

Veränderungen: Es bildet sich die Blastozyste (3,5 dpc) mit dem Trophektoderm (außen liegend), der innen liegenden ICM (inner cell mass, Embryoblast) und der Blastozystenhöhle (Blastocoel) aus. Aus dem Trophektoderm entwickelt sich später die Plazenta, während sich die ICM zum Embryo weiterentwickelt. Zellen der inneren Zellmasse können in Kultur genommen werden und man kann aus ihnen embryonale Stammzellen (ES) gewinnen. Diese können in alle Zellarten des Embryos differenzieren, allerdings nicht in Plazentagewebe. Die Blastozyste verliert anschließend die sie umgebende Hülle (Zona Pellucida) und implantiert in das Uterusgewebe, wo die weitere Embryogenese abläuft.

Vorkerninjektion: Der erste Zeitpunkt, an dem heterologe DNA in das Mausgenom eingebracht werden kann, ist direkt nach der Befruchtung, wenn die beiden Vorkerne gut sichtbar werden und noch nicht verschmolzen sind (0,5 dpc) (Gordon et al., 1980; Palmiter et al, 1983). Die befruchteten Eizellen werden aus den Eileitern superovulierter Weibchen gewonnen, welche am Vorabend mit Männchen verpaart wurden. Die Superovulation besteht aus einer intraperitonealen PMSG (Pregnant mare serum Gonadotropin, Wirkung wie FSH)-Injektion und einer 44-48 h späteren hCG (human chorionic Gonadotropin, Wirkung wie LH)-Injektion vor dem Zusammensetzen der Tiere. Dies verstärkt die Follikelreifung und man erhält eine größere Anzahl an Eizellen. Üblicherweise wird in den männlichen Vorkern injiziert, da dieser größer ist. Injizierte DNA wird in 10-30 % der Fälle ins Genom eingebaut und nur im Idealfall besitzen alle Zellen eines entstehenden transgenen Tieres die Fremd-DNA. Im Durchschnitt überleben 50-80 % der befruchteten Eier die Injektionsprozedur. Diese werden anschließend entweder sofort, im Zweizellstadium oder als Blastozyste in scheinchwangere Empfängerweibchen transferiert. Scheinschwangerschaft wird erreicht, indem die Empfängerweibchen am Vortag des Transfers mit vasektomierten Männchen verpaart werden. Frühe Embryonen werden in den Eileiter, Blastozysten in den Uterus transferiert. 10-20 % der geborenen Tiere enthalten das Transgen stabil im Genom integriert.

Der Vorteil der Vorkerninjektion (Pronukleusinjektion) ist die schnelle und effektive Erzeugung von Mutanten. Der Nachteil liegt in der Tatsache, daß das Transgen nicht zielgerichtet, sondern an zufälligen Orten im Genom integriert. Dies kann unter

Umständen nachteilige Folgen haben: Ein Transgen kann unter den Einfluß umliegenden Chromatins gelangen (Positionseffekt) und dadurch misreguliert exprimiert werden. Zudem können Gene durch die zufällige Integration des Transgens inaktiviert werden (Integrationsmutanten). Ebenso wird das Transgen oftmals nicht als Einzelkopie, sondern als „Multi-copy-array“ mit bis zu mehreren hundert Kopf-Schwanz-Multimeren integriert. Diese werden häufig durch Silencing-Mechanismen transkriptionell inaktiviert. Aus diesen Gründen müssen bei einem klassischen Pronukleusinjektionsexperiment immer mehrere Gründertiere (d.h. unterschiedliche Integrationsorte und Transgenstrukturen) erzeugt und untersucht werden.

Die Vorkerninjektion ist die Methode der Wahl für Anwendungen, die keine locus-spezifische Modifikation benötigen, wie z.B. die Über- oder ektope Expression heterologer Proteine.

Gene Targeting: Ein anderer Zeitpunkt in der Entwicklung der Maus, an dem heterologe DNA eingebracht werden kann, ist das Blastozystenstadium. Embryonale Stammzellen bieten die Möglichkeit, durch homologe Rekombination (Gene Targeting) gezielt bestimmte Genorte zu verändern (Thomas & Capecchi, 1987; Doetschman et al., 1988). Methodisch wird dies durch Elektroporation von ES Zellen mit einem linearen Targeting Konstrukt durchgeführt, welches auf beiden Seiten der einzuführenden Mutation homologe DNA-Flanken trägt. Zelleigene Mechanismen bewirken eine Rekombination der homologen Bereiche. Da dieser Prozeß sehr selten ist und Zufallsintegrationen weit häufiger eintreten, müssen einzelne Zellkolonien auf das gewünschte Ereignis hin untersucht werden. Erfolgreich modifizierte Klone werden anschließend zurück in Blastozysten injiziert und diese werden in den Uterus scheinchwangerer Empfängerweibchen transferiert. Zur Isolierung der Blastozysten werden Tiere mit einer Fellfarbe verwendet, welche rezessiv und verschieden zur Fellfarbe derjenigen Tiere ist, aus denen ursprünglich die ES Zellen isoliert wurden. Dies hat den Vorteil, daß sich aus den injizierten Blastozysten Tiere entwickeln, die zwei verschiedene Fellfarben aufweisen. Der Grad dieses Chimärismus korreliert meist mit dem Anteil, den die injizierten ES Zellen zum Gesamttier beitragen. Tragen die mutanten ES Zellen zum Aufbau des Keimbahngewebes bei, kann die Mutation durch eine Verpaarung der

Chimären weitervererbt und eine mutante Mauslinie erhalten werden (Keimbahntransmission).

In letzter Zeit wurden effektive Methoden etabliert, welche den zeitaufwendigen Schritt der Chimärenerzeugung und Verpaarung umgehen (Eggan et al., 2001). Wie bereits oben erwähnt, tragen diploide ES Zellen nur zur Embryoanlage, nicht jedoch zu extraembryonalen Geweben, wie der Plazenta, bei. Tetraploide Zellen weisen ein genau komplementäres Verhalten auf: Sie tragen bevorzugt zu extraembryonalem Gewebe, nicht aber zu embryonalem bei. Werden daher tetraploide Blastozysten mit diploiden ES Zellen injiziert so können komplett ES Zell-abstammende Tiere erhalten werden. Tetraploide Blastozysten werden meist durch Elektrofusion diploider Zweizellembryonen erhalten, welche anschließend bis zum Blastozystenstadium kultiviert werden. Es konnte gezeigt werden, daß bei einem solchen Ansatz F1-Hybrid ES Zellen verwendet werden müssen, da unter Verwendung üblicher Inzucht-ES Zellen die Effizienz zu niedrig ist.

Der große Vorteil der Verwendung embryonaler Stammzellen zur Herstellung genetisch modifizierter Mäuse liegt in der Möglichkeit, gezielt bestimmte Loci zu verändern. Dies ermöglicht z.B. die Etablierung von Nullmutanten (Knock-Out, KO). Desweiteren lassen sich mit dieser Methodik alle denkbaren Modifikationen wie z.B. Knock-In, Punktmutationen, kleine Deletionen, Translokationen etc. erzeugen. Nachteilig ist bei einem solchen Ansatz der große Zeit- und Arbeitsaufwand, welcher primär durch die Ineffektivität der homologen Rekombination und die damit verbundene aufwendige ES-Zellkultur bedingt ist. Dieser Nachteil tritt besonders dann zum Vorschein, wenn ein bestimmtes Allel mehrmals gezielt verändert werden soll (Allelische Serie). Ein solcher Ansatz, welcher z.B. bei der Untersuchung regulatorischer Elemente interessant ist, erfordert wiederholte Gene Targeting Experimente. Das Gleiche gilt für die Rekapitulation humaner Krankheiten im Mausmodell: Bei vielen Erbkrankheiten kennt man die mitunter zahlreichen zugrundeliegenden Mutationen des betreffenden Gens. Haben diese Mutationen eventuell unterschiedliche physiologische Effekte, sind wiederholte Gene Targeting Experimente notwendig, um die diversen pathologischen Zustände zu imitieren.

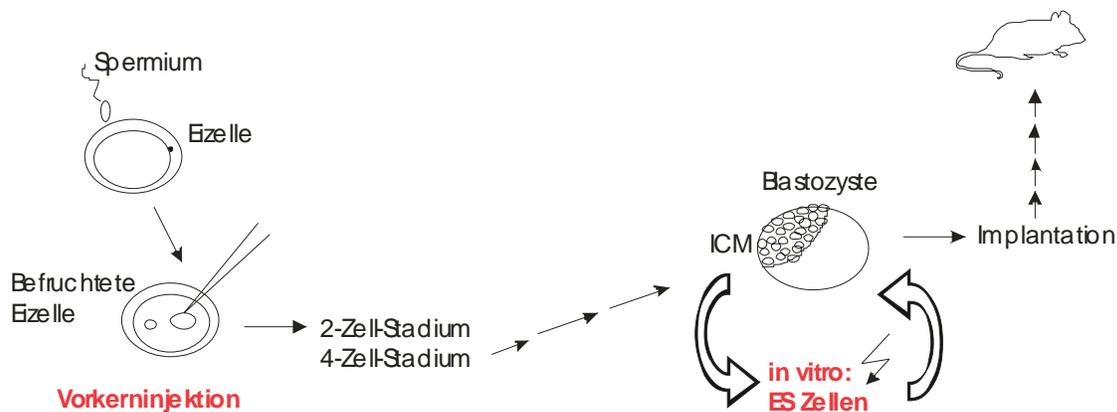


Abb 2.1. Sehr stark vereinfachte Darstellung der Embryonalentwicklung der Maus und der gängigen Verfahren zur Herstellung genetisch modifizierter Mäuse.

Hit-and-Run und Double Replacement: Diese beiden Verfahren stellen zwei weitere Methoden dar, welche eine gezielte Modifikation eines Genortes erlauben: Beim Hit-and-Run- (Hasty et al., 1991) (oder In-and-Out nach Valancius & Smithies, 1991) Verfahren werden zwei Runden homologer Rekombination durchgeführt. Die Targetingvektoren tragen hierbei positive und negative Selektionskassetten und werden in der Homologieregion linearisiert. Im ersten Schritt (der Integration („Hit“)) wird unter Anwendung positiver Selektion der Vektor in den gewünschten Genort integriert. Da der Vektor in der Homologieregion linearisiert wurde, führt die Integration zu einer Verdopplung des Ziellocus. Der zweite Schritt basiert auf spontaner intrachromosomaler Rekombination zwischen den duplizierten Sequenzen („pop-out“ oder „Run“). Dieser Schritt, bei welchem negative Selektion verwendet wird, generiert entweder das Ursprungsallel oder das erwünschte mutante Allel.

Beim zweiten Verfahren, dem Double Replacement (Stacey et al., 1994; Wu et al., 1994), handelt es sich im Prinzip um zwei hintereinander ablaufende Gene Targeting Experimente. Im ersten Schritt wird ein Targetingvektor mit positiver und negativer Selektionskassette homolog rekombiniert. Darauf folgt ein zweites Gene Targeting Experiment, in welchem unter Anwendung negativer Selektion das erwünschte mutante Allel erzeugt wird.

Beide Verfahren haben den Vorteil, daß die erzeugten mutanten Allele frei von jeder unerwünschten Veränderung sind (wie dies häufig bei klassischen Gene Targeting Experimenten der Fall ist (Anwesenheit von z.B. Selektionskassetten, loxP-Sequenzen (siehe weiter unten)). Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn Mutationen in kodierende oder regulatorische Sequenzen eingeführt werden sollen. Nachteilig ist bei diesen Verfahren jedoch die große Ineffizienz, die daraus resultiert, daß zwei Runden homologer Rekombination durchgeführt werden müssen.

2.2 Einführung in sequenz-spezifische Rekombinationssysteme

Sequenz-spezifische DNA-Rekombination benutzt im Gegensatz zu homologer Rekombination relativ kurze Sequenzbereiche als Erkennungsstellen. In den letzten Jahren wurden zahlreiche sequenz-spezifische DNA-Rekombinasen (SSRs) aus niederen Organismen kloniert und es wurde versucht, diese auch in Zellen höherer Organismen zur Anwendung zu bringen (z.B. β -Rekombinase (Diaz et al., 1999); $\gamma\delta$ -Resolvase (Schwikardi & Droge, 2000); BLV-Integrase (Tanaka et al., 1998); R4-Integrase (Olivares et al., 2001); ϕ C31-Integrase (Andreas et al., 2002); λ -Integrase (Christ & Droge, 2002)). Die beiden am besten charakterisierten und am weitesten verbreiteten SSR-Systeme sind das Cre/loxP (Hamilton & Abremski, 1984) und das Flp/FRT System (Sadowski, 1995), welche hier näher vorgestellt werden sollen. Beide Systeme konnten erfolgreich in der Maus zur Anwendung gebracht werden (Nagy, 2000; Farley et al., 2000; Rodriguez et al., 2000). Cre und Flp gehören beide zur Superfamilie der λ -Integrasen.

Das Cre/lox-Rekombinationssystem. Dieses aus dem Bakteriophagen P1 stammende Rekombinationssystem, bestehend aus der 38 kD Cre-Rekombinase und deren 34 bp loxP-Erkennungsstellen ist dort für die Zirkularisierung des linearen Phagengenoms (Hochman et al., 1983) und die Resolution postreplikativer zirkulärer Genomdimere in Monomere zuständig (Austin et al., 1981). Die loxP-Sequenz besteht aus zwei 13 bp langen, invertierten Wiederholungssequenzen (inverted repeats), welche einen 8 bp langen, nichtsymmetrischen Spacer flankieren (Abb. 2.2). Die Asymmetrie des Spacers

verleiht der gesamten Struktur eine Direktionalität. Diese Direktionalität bestimmt den Ausgang der Cre-vermittelten Reaktion: Befinden sich zwei loxP-Stellen in gleicher Orientierung, so wird die dazwischen liegende Sequenz herausgeschnitten (Exzision), wobei anschließend beide Produkte eine lox-Stelle tragen. Der reverse Vorgang, die Integration, steht mit der Exzisionsreaktion im Gleichgewicht. Aus entropischen Gründen ist das Gleichgewicht jedoch stark auf die Seite der Exzision verschoben. Befinden sich die beiden loxP-Stellen in gegensätzlicher Orientierung zueinander kommt es zur Invertierungsreaktion. Zum dritten möglichen Reaktionstypus, der Translokation, kommt es, wenn beide lox-Stellen auf verschiedenen linearen Molekülen liegen (intermolekulare Rekombination). Die Reaktionen der Inversion und der Translokation befinden sich im Gegensatz zur Excision-Integrationsreaktion im thermodynamischen Gleichgewicht. Alle Reaktionen sind unabhängig von der Substrattopologie und benötigen weder Energiezufuhr noch zusätzliche Cofaktoren.

Die beiden inverted repeats der lox-Stelle fungieren als Rekombinase-Bindestellen, d.h. es binden jeweils zwei Cre Monomere pro loxP-Sequenz (Mack et al., 1992). Durch Protein-Protein-Interaktion kommt es zur Ausbildung des aus zwei loxP-Stellen und vier Cre-Molekülen bestehenden Rekombinationskomplexes, der Synapsis. Die 8 bp Spacerregion wird in einem Abstand von 6 bp geschnitten. Dies geschieht durch nukleophilen Angriff des Tyrosinrestes 324 auf die Phosphodiesterbindung eines der DNA-Stränge, wobei Cre kovalent an das 3'-Phosphat gebunden wird und ein freies 5'-OH entsteht. Durch Strangaustausch und Ligation des Tyr-3'-Phosphat an das freie 5'-OH des Empfängerstranges kommt es zur Formation eines Holliday-Intermediates (Guo et al., 1997). Neueren Vorstellungen zufolge unterläuft dieses Holliday-Intermediat keine klassische „Branch Migration“, sondern eine „strand-swapping“ Isomerisierung (Van Duyne, 2001). In diesem Modell erfolgt der Strangaustausch durch Aufschmelzen von 2-3 Basenpaaren in der Spacerregion nach Strangbruch und Annealing an den komplementären Strang des Rekombinationspartnerstranges. Die Überprüfung der Homologie der aufgeschmolzenen Basen wird durch Watson-Crick-Basenpaarung erreicht. Dieses Modell erklärt am besten die zur Verfügung stehenden Cre-DNA Strukturdaten und scheint ein generelles Modell für den Rekombinationsablauf der Mitglieder der λ -Integrase Familie darzustellen (Nunes-Düby et al., 1995). Eine erneute

Runde mit Strangbruch und Ligation des zweiten Stranges vervollständigt die Rekombination und löst die Holliday-Junction auf. Damit eine Rekombination überhaupt stattfinden kann, müssen die beiden lox-Stellen mindestens 82 bp auseinander liegen. Die DNA-Rekombination erfolgt bei Cre in *cis*, d.h. das Rekombinase-molekül, welches das katalytische Tyrosin zur Verfügung stellt, ist direkt neben dem Strangbruch gebunden (Shaikh & Sadowski, 2000). Außer diesem Tyrosin, welches der Superfamilie der λ -Rekombinasen auch den Namen „Tyrosin-Rekombinasen“ verleiht, existieren noch vier weitere konservierte Reste, welche essentiell für die Cre-Reaktion sind: Arg 173, His 289, Arg 292 (als RHR-Triade bekannt) und Lys 172 (Cao & Hayes, 1999).

Das Flp/FRT-Rekombinationssystem. Dieses sequenz-spezifische Rekombinationssystem aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* benutzt die 46 kD DNA-Rekombinase Flp und deren Erkennungsstellen FRT. Das Flp/FRT-System ist auf dem 2 μ m-Plasmid der Hefe lokalisiert und bewirkt dort die Erhöhung der Kopienzahl dieses Plasmids durch Flp-vermittelte Inversion während der Replikation (Futcher, 1986). Die FRT-Sequenz besteht aus einem 8 bp langen Spacer, flankiert von zwei 13 bp langen (nahezu perfekten) inverted repeats (34 bp-FRT, siehe Abb. 2.2). In der Hefe existiert noch ein zusätzliches 14 bp Element, welches einem inverted repeat entspricht und welches der nativen FRT-Stelle eine Länge von 48 bp verleiht (Kilby et al., 1993). Die Verwendung dieser FRT-Sequenz ermöglicht die Ausführung der gleichen Rekombinationstypen wie mit dem Cre/lox-System (Integration/Exzision, Inversion, Translokation). Die kürzere, 34 bp lange Variante entspricht der Minimallänge der FRT-Stelle und mit ihr lassen sich intramolekulare, aber nicht intermolekulare Rekombinationen durchführen. Das bedeutet, daß z.B. Exzisionsreaktionen mit beiden FRT-Varianten, Integrationen jedoch nur mit der nativen FRT-Sequenz möglich sind (Jayaram, 1985).

Der Mechanismus der Flp-vermittelten Rekombination, über den im Detail nicht so viel bekannt ist wie über den Cre-Reaktionsmechanismus, verläuft im Großen und Ganzen ähnlich der Cre/lox-Reaktion. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, daß die Kristallstrukturen der katalytischen Domänen von Cre (Guo et al., 1997) und Flp (Chen et al., 2000), nicht jedoch die der restlichen Proteindomänen, sehr ähnlich sind. In Analogie zu Cre/lox beginnt auch im Flp/FRT-System die Rekombination mit der positiv

kooperativen Bindung von Flp-Monomeren an die beiden inverted repeats der FRT-Sequenz (Ringrose et al., 1998). Anschließend kommt es zu einem nukleophilen Angriff eines Tyrosinrestes (Tyr 343) und dadurch vermitteltem Strangbruch. Dieser findet im Gegensatz zu Cre/lox jedoch nicht im Abstand von 6, sondern von 8 Basenpaaren statt. Als Resultat kommt es auch hier zu einem Holliday-Intermediat, welches durch Isomerisierung aufgelöst wird. Diese Isomerisierung erfordert bei Flp/FRT größere Konformationsänderungen als bei Cre/lox. Der Angriff des nukleophilen Tyrosins findet bei Flp/FRT in *trans* (und nicht in *cis* wie bei Cre) statt, d.h. Flp-Monomere, welche auf der jeweils anderen Seite der FRT-Stelle gebunden sind, stellen das reaktive Zentrum zur Verfügung (Shaikh et al., 2000). Auch bei Flp ist eine RHR-Triade konserviert (Arg 191, His 305 und Arg 308).

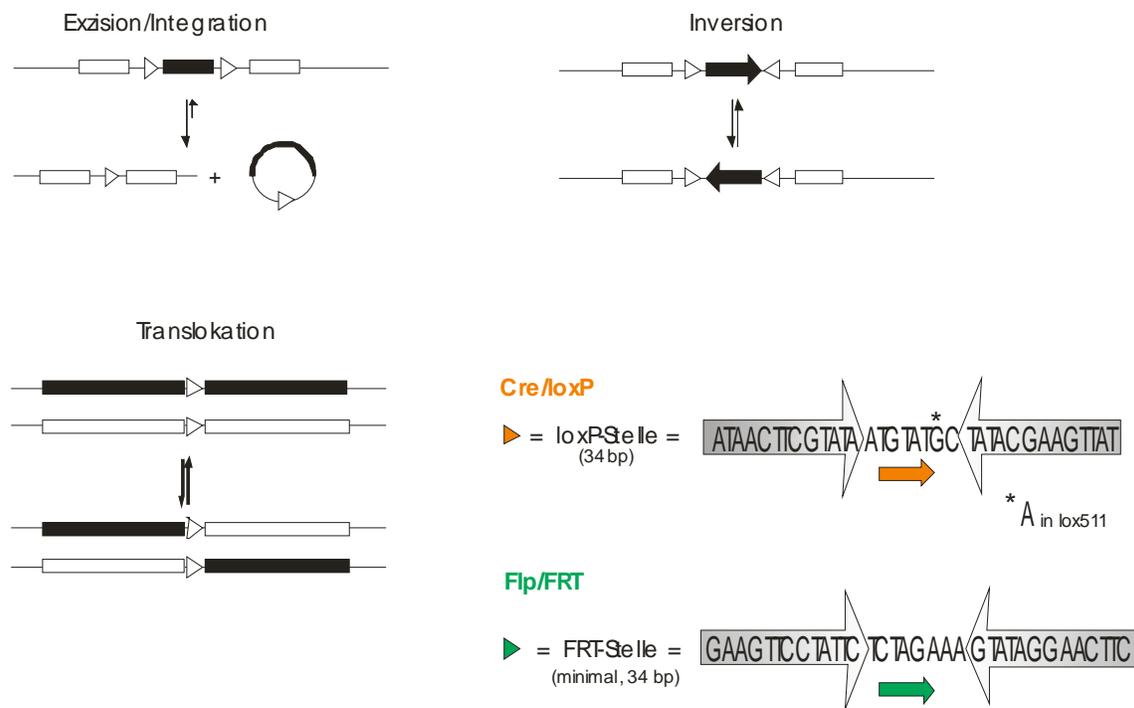


Abb 2.2. Reaktionstypen sequenz-spezifischer Rekombination. Die Sequenz der loxP, lox511, der minimalen FRT-Stelle und deren prinzipieller Aufbau mit inverted repeats (große Pfeile) und Spacerregion (kleine Pfeile) ist ebenfalls gezeigt.

2.3 Anwendung sequenz-spezifischer Rekombinationssysteme in der Mausgenetik

In den letzten Jahren hat sich vor allem das Cre/lox-System als „Allzweckwaffe“ in der Mausgenetik etabliert. Die Anwendungen sind vielfältig und reichen von simplen Deletionsreaktionen über Inversionsreaktionen bis zu Chromosomentranslokationen. Eine genaue Darstellung aller dieser Anwendungen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, jedoch sei hier auf einige Übersichtsartikel verwiesen (Nagy, 2000; Yu & Bradley, 2001; Lewandoski, 2001). Das Cre/lox (und Flp/FRT)-System ist durch seine Grundeigenschaften sehr gut geeignet, als genetisches Werkzeug für die Modifikation des Säuger-genoms eingesetzt zu werden: Die Erkennungsstelle loxP (FRT) ist 34 bp lang. Dies ist lang genug, daß diese Sequenz nicht zufällig im Genom auftritt und kurz genug, daß ihre Einführung in das Genom keine negativen Einflüsse auf benachbarte Genombereiche hat. Es sollte hier jedoch angemerkt werden, daß es unter bestimmten Voraussetzungen möglicherweise zur Rekombination endogener „Pseudo-lox-Stellen“ im Genom und zu dadurch bedingten negativen Effekten kommt (Thyagarajan et al., 2000; Schmidt et al., 2000; Loonstra et al., 2001).

Ein weiterer Vorteil des Cre/lox und Flp/FRT-Systems ist die Tatsache, daß für die Rekombination keinerlei Cofaktoren benötigt werden, wie dies häufig bei bakteriellen Rekombinasen der Fall ist. Zudem ist die Reaktion unabhängig von der DNA-Topologie und funktioniert auch über Abstände im Megabasen-Bereich.

Cre ist ein Phagenenzym und sein Temperaturoptimum liegt bei 37 °C, ein Vorteil wenn es um die Anwendung in Säugerzellen geht. Da Flp ein Hefeenzym ist und das Temperaturoptimum der Hefe bei 30 °C liegt, ist natives Flp-Enzym temperaturlabil bei höheren Temperaturen. Um dies zu umgehen, wurde die kodierende Sequenz von Flp durch in-vitro Evolution derart verändert, daß Flp auch bei 37 °C ausreichend stabil und enzymatisch aktiv ist (Buchholz et al., 1998). Das entstandene „Flpe“ wurde in dieser Arbeit ausschließlich verwendet.

2.4 Rekombinase vermittelter Kassettenaustausch

Wie bereits oben erwähnt funktioniert Cre/lox-vermittelte Rekombination in all ihren Spielarten (Exzision, Inversion, Translokation) auch in Säugerzellen. Dies gilt jedoch nur begrenzt für die Anwendung von Integrationsreaktionen in einem spezifischen Kontext. Dies hat mehrere Gründe: Erstens, das thermodynamische Gleichgewicht der Integration/Exzision-Reaktion liegt stark auf der Seite der Exzision, was Integrationen thermodynamisch benachteiligt. Wenn eine intermolekulare Integration über zwei auf verschiedenen Molekülen liegenden loxP-Stellen erfolgt, entstehen zwei loxP-Stellen in gleicher Orientierung auf einem Molekül, was wiederum ein ideales Substrat für Exzision darstellt. Der zweite Grund liegt darin, daß bei einer Integration eines zirkulären Plasmids in ein lineares Chromosom die gesamte Plasmidsequenz integriert wird. Dies ist insbesondere nachteilig, wenn möglichst wenig heterologe Sequenz (wie z.B. Plasmidrückgratsequenzen) eingebracht werden soll. Einflüsse von bakteriellen Selektionsmarkern können so gering gehalten und der resultierende Phänotyp eindeutig mit dem Transgen in Verbindung gebracht werden.

Einen Ausweg aus dieser Problematik bietet die Methodik des Rekombinase vermittelten Kassettenaustausches (Recombinase-mediated cassette exchange, RMCE) (Bode et al., 2000; Baer & Bode, 2001). Hier wird das Transgen (die „Kassette“) von zwei SSR-Erkennungsstellen flankiert und durch intermolekulare Rekombination auf beiden Seiten mit der jeweiligen Erkennungsstelle im Genom („Double Crossover“) wird nicht das gesamte Plasmid, sondern nur die Kassette integriert (Abb. 2.3). Voraussetzung für RMCE ist die Nicht-Kompatibilität (Exklusivität) der verwendeten Stellen, um ein Herausschneiden der Kassette zu verhindern. Im Fall der Cre- oder Flp-Rekombination kann dies z.B. durch Mutagenese der loxP- bzw. der FRT-Sequenz geschehen (Bethke & Sauer, 1997; Seibler et al., 1998). Diese heterospezifischen Erkennungsstellen sollen nur mit identischen, nicht aber mit mutanten Erkennungsstellen rekombinieren (Abb. 2.3).

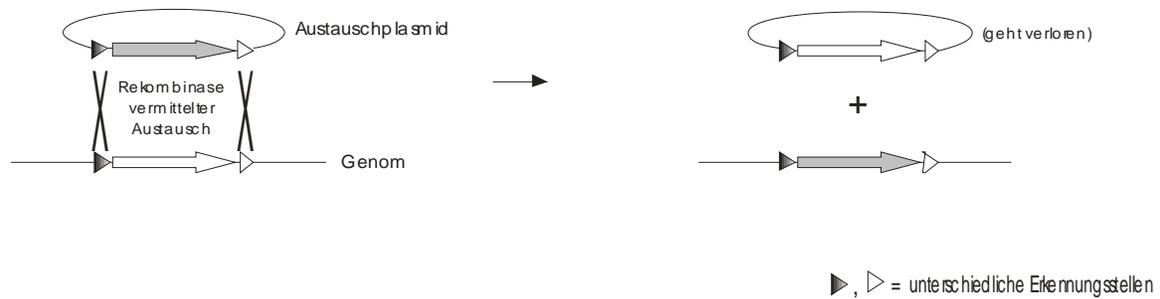


Abb 2.3. Ablauf eines Rekombinase vermittelten Kassettenaustausches. Die im Genom residierende Kassettenkassette (weißer Pfeil) wird gegen die auf dem Plasmid lokalisierte Kassettenkassette (grauer Pfeil) ausgetauscht. Die Dreiecke stellen Erkennungsstellen dar, welche nur mit gleichen Erkennungsstellen rekombinieren können.

Ein erfolgreiches RMCE-System könnte bei der Herstellung allelischer Serien im Mausgenom zur Anwendung kommen. Wenn das Ziel die Etablierung transgener Mauslinien ist, kann der Kassettenaustausch sowohl in ES-Zellen, als auch in Einzellembryonen durchgeführt werden. Besonders der letztgenannte Ansatz würde eine substantielle Vereinfachung gegenüber bestehenden Methoden darstellen, da die langwierige ES-Zellkultur entfallen würde. Eine solche Technik könnte bei der Beantwortung zahlreicher biologischer Fragestellungen hilfreich sein (Abb. 2.4).

In dieser Arbeit sollen zwei RMCE-Ansätze vorgestellt werden: Der erste Ansatz basiert auf der Verwendung von loxP und lox511, zwei lox-Stellen, die sich in einer Base des Spacers unterscheiden (Abb. 2.2, Hoess et al., 1986) und daher nur mit ihresgleichen rekombinieren sollten. Der zweite Ansatz verwendet zwei komplett unterschiedliche Rekombinationssysteme: Das Cre/loxP-System auf der einen, das FLP/FRT-System auf der anderen Seite. Damit besitzen die Erkennungsstellen keinerlei Sequenzhomologie, was die Exklusivität beträchtlich steigern sollte.

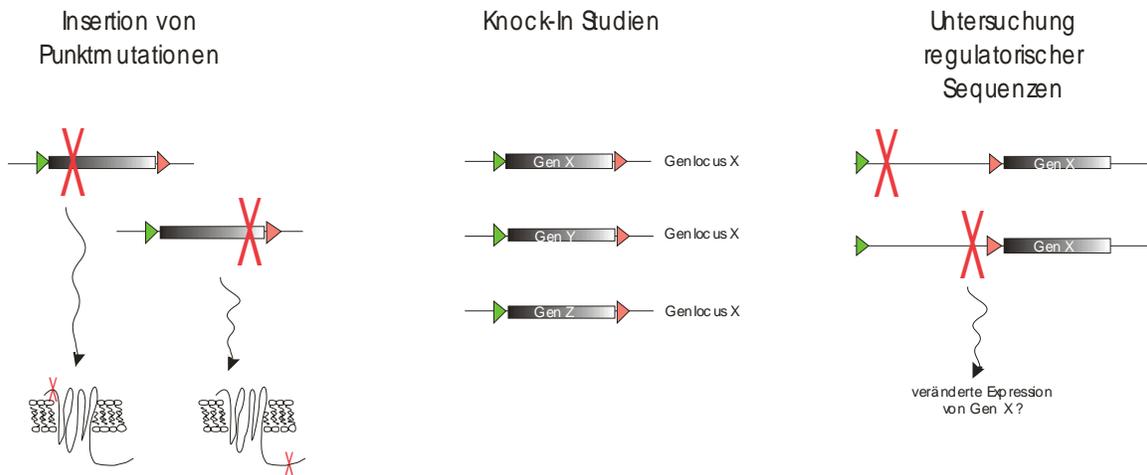


Abb 2.4. RMCE-Anwendungsmöglichkeiten. Durch Einführung verschiedener Punktmutationen in den kodierenden Bereich lassen sich zahlreiche mutante Proteine erzeugen (links als Membranprotein gezeigt). In der Mitte ist ein Beispiel einer allelischen Serie für knock-in Studien dargestellt: Insertion verschiedener Gene in einen bestimmten Genlocus. Rechts ist ein drittes mögliches Anwendungsgebiet aufgezeigt: Durch Mutationsanalyse regulatorischer Bereiche und daraus resultierender veränderter Genexpression lassen sich Aussagen über Genregulation machen.

3 Zielsetzung der Arbeit

Genomweite Datensätze, die sich beispielsweise aus der Sequenzierung des Humangenoms oder DNA-Chip-Analysen ergeben, werfen komplexe Fragestellungen über Gen-Funktion, Regulation und Interaktion auf. Zur Untersuchung dieser Vorgänge sind neue Ansätze in der „Functional Genomics“ notwendig. Eine Möglichkeit, die in vivo Relevanz eines Genes zu beurteilen, liegt in der Herstellung von mutanten Mauslinien. Obwohl dies seit längerem möglich ist, ist die Modifikation eines bestimmten Genortes auch heute noch eine arbeits-, zeit- und kostenintensive Prozedur. Dies stellt insbesondere bei der Herstellung allelischer Serien, also der seriellen Einführung verschiedener Mutationen in einen Genort, ein ernsthaftes Hindernis dar. An diesem Punkt setzt die hier vorgestellte Arbeit an: Durch den Einsatz sequenz-spezifischer DNA-Rekombination sollte eine Methodik erarbeitet werden, welche die Einführung von Mutationen in spezifische genetische Loci erleichtert. Dazu sollte ein gewünschter Genort mit Rekombinations-Erkennungsstellen flankiert und anschließend, vermittelt durch sequenz-spezifische Rekombination, gegen Austauschsequenzen ersetzt werden. Ein derartiger Rekombinase vermittelter Kassettenaustausch, bei welchem die mutationstragenden DNA-Kassetten schnell und effizient gegeneinander ausgetauscht werden können, sollte hierbei entweder auf Ebene embryonaler Stammzellen oder früher Mausembryonen etabliert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

Agarose-Gelkammern (Werkstatt des MPI für Neurobiologie, Martinsried)

Film-Entwicklungsgerät X-Omat M35 (Kodak)

French Press (Arbeitsgruppe Baumeister, MPI für Biochemie, Martinsried)

Gene Pulser (BioRad)

Heizrührer IKA-Combimag RCT (IKA)

Inkubatoren: Heraeus Cytoperm 2 und Sanyo MCO-17AIC

Mikroskope: Axiophot und Axiovert 35M mit Kamera (Zeiss)

Mikrowellenherd 700W (Bosch)

MilliQ Wasseraufbereitungsanlage (Millipore)

Netzgerät Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150 (Pharmacia)

PCR: GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer), Mastercycler Gradient (Eppendorf)

pH-Meter 632 (Metrohm) mit Einstabmeßkette (Ingold)

Phosphoimager FujiX BAS 1000 (Fuji)

Proteingelelektrophorese: Mini-Protean electrophoresis system (BioRad)

Röntgengenerator STABILIPAN 2 (Siemens) mit Röntgenröhre TR300f (Siemens)

Schüttler: Innova 4000 (New Brunswick Scientific)

SpeedVac Vakuumzentrifuge Univapo 100H (Uniequip)

Spektrophotometer Ultrospec 3000 (Pharmacia)

UV Transilluminator 302 nm (Bachofer)

Vortex-Genie (Bender&Hobein)

Waagen: Analysenwaage H64 (Mettler), Feinwaage PL 1200 (Mettler)

Western Blot Apparatur (Werkstatt des MPI für Neurobiologie)

Zentrifugen: RC-5B (Sorvall), RC-5B Plus (Sorvall), 5415C (Eppendorf), Micro Rapid/K

(Hettich), Varifuge 3.0R (Heraeus), Rotanta/K (Hettich)

4.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die Chemikalien stammen, sofern nicht anders angegeben, von Serva, Sigma und Merck. Zellkultureinwegmaterialien wurden von Falcon, Costar, Nunc und Greiner bezogen.

Acrylamid/Bisacrylamid (30%), (Sigma)

Agarose Ultra Pure (Invitrogen)

Ammoniumperoxodisulfat (APS), (Sigma)

Ampicillin (Sigma)

[α -³²P]-dCTP (Hartmann Analytik)

Bromphenolblau (Sigma)

Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma)

Dimethylsulfoxid (Sigma)

dNTP's (New England Biolabs)

ECL Western Blot Detektion (Amersham Pharmacia Biotech)

Ethidiumbromid (Sigma)

Elektroporationsküvetten (BioRad)

Fötale Kälberserum (FCS) (Boehringer Mannheim)

Fugene 6 Transfektionsreagens (Roche)

Gelatine für die Mikrobiologie (Merck)

Geneticinsulfat G418 (Invitrogen)

Ganciclovir (Syntex)

GeneAmp Carryover Prevention Kit (Perkin Elmer)

Gewebekulturschalen (Falcon, Nunc, Costar, Greiner)

HybondN+[®] Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech)

4-Hydroxy-Tamoxifen (OHT) (Sigma)

Hygromycin B (Invitrogen)

Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) (Boehringer Mannheim)

L-Glutamin (100x) (Invitrogen)

Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) (ESGRO[®] von Invitrogen, 10⁷ U/ml)

2-Mercaptoethanol (Roth)

Molekulargewichtsmarker DNA (Boehringer Mannheim, MBI Fermentas, New England Biolabs)

Molekulargewichtsmarker Protein (BioRad)
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)
Natriumdodecylsulfat (SDS) (BioRad)
Natriumpyruvat (1 mM = 100x) (Invitrogen)
Nicht essentielle Aminosäuren (0,1 mM = 100x) (Invitrogen)
N-Laurylsarcosin (Sigma)
Orange G (Sigma)
Parafilm[®] (American National Can)
Paraformaldehyd (Merck)
Penicillin/Streptomycin (100x) (Invitrogen)
Phenol (Roth)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma)
Plasmidisolierungskit (Qiagen)
ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham Pharmacia Biotech)
Puromycin (Sigma)
Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
Rediprime II Random Prime Labelling Kit (Amersham Pharmacia Biotech)
Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma)
Röntgenfilme Fuji RX, PPM
Sarkosyl (Serva)
Spermidin (Sigma)
Streptomycin (Sigma)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Sigma)
Ultrafree-MC Centrifugal Filter (0,22 µm) (Millipore)
Whatman 3MMChr[®] (Whatman)

4.1.3 Enzyme

CIP (Calf intestinal phosphatase) (Boehringer Mannheim, New England Biolabs)
Cre DNA-Rekombinase (Novagen)
DNA-Polymerase I, Großes (Klenow) Fragment (Amersham, New England Biolabs)

Pfu-Turbo[®] DNA-Polymerase (Stratagene)
Proteinase K (Boehringer Mannheim)
Restriktionsenzyme (Boehringer Mannheim, New England Biolabs)
RNase A (Boehringer Mannheim)
Taq[®] DNA-Polymerase und Puffer (Invitrogen)
T4 DNA Ligase (New England Biolabs)
Trypsin/EDTA für Zellkultur (Invitrogen)

4.1.4 Bakterien

Folgende E.coli-Bakterienstämme wurden verwendet:

DH5 α F'IQ (Invitrogen)
JC 8679 (F. Stewart, EMBL, Heidelberg)
M16[pREP4] (Qiagen)
Sure (Stratagene)
TOP 10 (Invitrogen)
XL1-Blue (Stratagene)

4.1.5 Plasmide

kommerziell erhältliche Plasmide:

Bluescript SK⁻ und KS⁻ Plasmide (Stratagene)
pCMV β Plasmid (Clontech)
pEGFP-N3 (Clontech)
pDsRed-N1 (Clontech)
pQE-30 (Qiagen)

Plasmide, welche von anderen Forschungsinstitutionen/Gruppen freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden:

pBS500 (B. Sauer, NIH, Bethesda)
pCre-ER^{T2} (R. Feil, TU München)
pPGK-Pax1 (F. Stewart, EMBL, Heidelberg)

pCAGGS-Flpe (F. Stewart, EMBL, Heidelberg)

pGK-FRT (F. Stewart, EMBL, Heidelberg)

pMC-Cre (K. Rajewsky, Universität Köln)

pLTV (L. Lindemann, MPI, Martinsried)

pFroxCV1 (F. Spreafico, MPI, Martinsried)

pWL512 (K.L. Tucker, MPI, Martinsried)

Selbst konstruierte Plasmide:

PN2Flox

pCMV β I

pQE-Cre

pFRT

pFRT-STOP

pPGK-FroxNeo

pFrox-EGFP

pFrox-Hygro

pCre/Flp

Eine Beschreibung der Plasmide und ihrer Herstellung befindet sich im Appendix.

4.1.6 Zelllinien

HEK 293T

Embryonale Fibroblasten („EMFIS“, EF-Zellen) (mit G418-Resistenz): Von Karin Mörl aus einer Sv129xC57Bl/6-Mauslinie des MPI für Neurobiologie isolierte Fibroblasten. Es handelt sich hierbei um eine Knock-Out-Mauslinie, bei der das Calbindin durch ein Neomycin-Resistenzgen (G418-Resistenz) ersetzt ist.

ES-Zellen:

E14.1 (freundlicherweise erhalten von K. Rajewsky, Uni Köln)

R1 (freundlicherweise erhalten von A. Nagy, Mount Sinai Hospital, Toronto)

4.1.7 Verwendete Mausstämme

Inzuchtstämme: C57Bl/6, Sv129, FVB

Auszuchtstämme: CD1, NMRI

F1-Hybride: B6D2F1 (F1-Generation einer Kreuzung aus C57Bl/6 und DBA2)

4.1.8 Medien und Substrate

Medium für die Bakterienanzucht:

Bacto-Agar (Difco)

Bacto-Trypton (Difco)

Hefeextract (Difco)

Medium für die in vitro Embryonenkultur:

M2 Medium (Sigma)

M16 Medium (Sigma)

Grundmedium für die Kultur eukaryotischer Zellen:

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (High Glucose) (Invitrogen)

LB-Medium (1 Liter)

10 g Bactotrypton

5 g Bacto-Hefeextract

10 g NaCl

ad 1 l

Folgende Antibiotikaendkonzentrationen wurden verwendet: Ampicillin 100 mg/l, Kanamycin 30 mg/l, Streptomycin 10 mg/l.

LB-Agar

Für Agarplatten wurde LB-Medium mit 1,5% Agar versetzt. Anschließend wurde autoklaviert, auf 50°C abgekühlt, Antibiotikum zugegeben und die Platten gegossen.

Folgende Antibiotikaendkonzentrationen wurden verwendet: Ampicillin 75 mg/l, Kanamycin 30 mg/l, Streptomycin 10 mg/l.

4.1.9 Lösungen

Alle gängigen, hier nicht explizit aufgeführten, Lösungen sind nach Sambrook et al. (2001) hergestellt.

Aufbewahrungslösung für Proteingele

20 % Methanol

3 % Glycerin

ad 1 l mit Wasser auffüllen

CI

Chloroform:Isoamylalkohol im Volumenverhältnis 24:1

Coomassie-Färbelösung

0,25 % Coomassie Brilliant Blue R250 (zuerst in Methanol lösen)

50 % Methanol

40 % Wasser

10 % Eisessig

Gel 20-30 min bei RT färben

Coomassie-Entfärber

5 % Eisessig

10 % Methanol

Gel wie gewünscht entfärben

Cre-Reaktionspuffer (10x)

500 mM Tris-HCl pH 7,5

330 mM NaCl

100 mM MgCl₂

Dialysepuffer

50 mM Tris pH 7,4

30 mM NaCl

0,25 mM EDTA

Elutionspuffer für Ni-NTA-Säule

50 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 8,0

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

Fixierlösung für histochemische LacZ-Färbung

2 % Formaldehyd (als Paraformaldehyd)

0,2 % Glutaraldehyd

in PBS pH 7,3

Gelauftragungspuffer DNA (10x)

50 % Glycerin mit Orange G-Farbstoff versetzt

Gelauftragungspuffer Protein (5x)

250 mM Tris-HCl pH 6,8

10 % SDS

30 % Glycerin

0,001 % Bromphenolblau

5 % β -Mercaptoethanol

Lösung bei -20 °C oder 4 °C aufbewahren

IPTG

Stock-Lösung ist 500 mM in Wasser

LacZ-Färbelösung

1 mg/ml X-Gal

5 mM gelbes Blutlaugensalz

5 mM rotes Blutlaugensalz

2 mM MgCl₂

in PBS pH 7,3, das X-Gal wird in einer Konzentration von 40 mg/ml in DMSO gelöst und anschließend auf die obige Konzentration verdünnt.

Laufpuffer (10x) für Proteingele

0,25 M Tris

1,92 M Glycin

1 % SDS

ad 1 l mit Wasser auffüllen

Lysepuffer 1 (DNA-Isolierung 96-well)

10 mM Tris-HCl pH 7,5

10 mM EDTA

10 mM NaCl

0,5 % Sarkosyl

1 mg/ml Proteinase K

Lysepuffer 2 (DNA-Isolierung aus Zellpellet und Gewebebiopsien)

100 mM Tris-HCl pH 8,5

5 mM EDTA

200 mM NaCl

0,2 % SDS

100 µg/ml Proteinase K

Lysepuffer Protein

50 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 8,0

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

Miniprep-Puffer A

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

20 mM EDTA

Miniprep-Puffer B

0,2 M NaOH

1 % SDS

Miniprep-Puffer C

3 M Kaliumacetat

1,8 M Ameisensäure

OHT (4-Hydroxy-Tamoxifen)

Stock-Lösung war 1 mM in 100 % Ethanol, bei -20 °C gelagert.

PCI

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Volumenverhältnis 25:24:1

PMSF

Stock-Lösung ist 100 mM in Isopropanol. Die Arbeitskonzentration beträgt 1 mM.

Präzipitationsmix (DNA-Isolierung 96-well)

1,5 µl 5 M NaCl zu 100 µl EtOH (100 %); EtOH bei -20°C gekühlt, NaCl immer frisch zugeben

Pronukleusinjektionslösung

10 mM Tris pH 8,0

0,25 mM EDTA

Restriktionsmix (für eine 96-well-Platte nach DNA-Isolierung)

38,5 µl 100 mM Spermidin-Lösung
38,5 µl 10 mg/ml BSA
2,75 µl 100 mg/ml RNase A
385 µl 10x Puffer des jeweiligen Restriktionsenzym
132 µl Restriktionsenzym
3254 µl Wasser

RF 1

30 mM Kaliumacetat
50 mM Manganchlorid
100 mM Rubidiumchlorid
10 mM Calciumchlorid
15 % Glycerin
auf pH 5,8 einstellen

RF 2

10 mM Rubidiumchlorid
75 mM Calciumchlorid
10 mM MOPS (pH 7,0)
15 % Glycerin
auf pH 6,8 einstellen

RNase A

100 mg/ml RNase A in Wasser lösen und zur Entfernung eventueller DNase-Kontaminationen danach 15 Minuten kochen

Sammelgel (4 %) für Proteingele

625 µl 1 M Tris pH 6,8

25 µl 20 % SDS

650 µl 30 % Acrylamid/Bisacrylamid

25 µl 10 % APS

5 µl TEMED

3,67 ml H₂O

Diese Menge reicht für zwei Gele

SOB

2 % Bactotrypton

0,5 % Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

pH 6,8 – 7,0 einstellen, danach Autoklavieren und

10 mM Magnesiumchlorid

10 mM Magnesiumsulfat zugeben.

Southern Denaturierungspuffer

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

Southern Transferpuffer

0,25 M NaOH

1,5 M NaCl

Southern Hybridisierungspuffer (auch Prähybridisierungspuffer)

10 ml 25 % Dextransulfat

5 ml 5 M NaCl

1,25 ml 1 M Tris-HCl pH 7,6

6,25 ml Wasser

2,5 ml 10 % SDS

Diesen Ansatz aufkochen, bis er klar wird

Southern Waschpuffer 1

100 ml 20xSSC

50 ml 10 % SDS

auf 1 l mit Wasser auffüllen

Southern Waschpuffer 2

5 ml 20xSSC

50 ml 10 % SDS

auf 1 l mit Wasser auffüllen

Southern Strip-Puffer

0,5 ml 20 % SDS auf 100 ml Wasser

Spermidin-Lösung

0,1 M Spermidin (Trihydrochlorid, Crystalline) (MW 254,6)

509,2 mg in 10 ml Wasser lösen und mit 1 M Tris pH 8 auf pH 7-8 bringen und mit Wasser auf 20 ml Endvolumen auffüllen

TBST-Puffer

25 mM Tris-HCl pH 8,0

150 mM NaCl

0,1 % Tween-20

Transferpuffer für Western Blots

5,82 g Tris

2,93 g Glycin

200 ml Methanol

375 µl 10 % SDS

ad 1 l mit Wasser auffüllen

Trenngel (10 %) für Proteingel

2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8

50 µl 20 % SDS

3,3 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid

50 µl 10 % APS

5 µl TEMED

4,06 ml H₂O

Diese Menge reicht für zwei Biorad-MiniGele

Waschpuffer für Ni-NTA-Säule

50 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 8,0

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

4.1.10 Lösungen für die Zellkultur/Stammzellkultur**EF-Medium (500 ml)**

50 ml hitzeinaktiviertes FCS

10 ml Glutamin (100x)

5 ml Pyruvat (100x)

5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

ad 500 ml mit DMEM auffüllen und steril filtrieren

Einfriermedium

10 % DMSO

90 % FCS

Elektroporations-Medium (Stammzellen)

10 ml EF-Medium (ohne Penicillin/Streptomycin)

50 µl NaCl einer 5M Stock-Lösung

ES-Medium (500 ml)

75 ml hitzeinaktiviertes FCS
10 ml Glutamin (100x) (Endkonz. 20 μ M)
5 ml Pyruvat (100x) (Endkonz. 10 μ M)
5 ml nicht essentielle Aminosäuren (100x) (Endkonz. 1 μ M)
5 ml LIF (10^5 U/ml) (Endkonz. 10^3 U/ml)
5 μ l Mercaptoethanol (Endkonz. 10^{-4} M)
ad 500 ml mit DMEM auffüllen und steril filtrieren

FCS

FCS 40 Minuten bei 56 °C inaktivieren

Gelatine

0,2 % Gelatine in H₂O, anschließend autoklavieren

Glutamin

2,92 g Glutamin in 100ml Wasser, dann steril filtrieren

LIF

100 ml DMEM
15 % FCS (hitzeinakt.)
1 ml LIF (10^7 U/ml) (Endkonz.: 10^5 U/ml)
steril filtrieren und bei -20°C lagern. Nach dem Auftauen nicht nochmals einfrieren,
sondern bei 4°C lagern.

PBS (1 Liter)

8 g NaCl
0,2 g KCl
0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat
1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
ad 1000 ml mit Wasser, dann steril filtrieren

Penicillin/Streptomycin

1,33 g Streptomycin

0,65 g Penicillin

ad 100 ml mit Wasser, dann steril filtrieren

4.1.11 Primersequenzen (5' → 3')

EGFP2: ACTTGTGGCCGTTTACGTC
EGFP4: TCGGCATGGACGAGCTGTAC
Gal 2: ACATCCACTGAGGAGCAGTTC
Gal 3: GCATTCATTTTATGTTTCAGGTTC
Gal 4: GTTCACTAAACGAGCTCTGCTT
Gal 5: ACAAACTCGGCCTCGACTCTA
Gal18: TGAGGGGACGACGACAGTATC
Hygro3: TATCCACGCCCTCCTACATCG
L3P2: CTCACTCCAGGCTCTCTTGAG
NEO+: ACATCGCATCGAGCGAGCAC
NEO-: AAGGCGATGCGCTGCGAATC
NGF P1: CATCTCCCAGTACACAGCAGA
NGF P2: CAGGATGGATGGATTATTTGACA
NGF J1: TGGGCAATGCAGCTTCTGCA
PGK1: GCTTCAAAGCGCACGTCTG
SV40pA1: ACGCCGGCTGGATGATCC
Tkneo1: GAATGGAAGGATTGGAGCTAC
Tn5anti: GCTTCCCAACCTTACCAGAG
T3: AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7: GTAATACGACTCACTATAGGGC

4.1.12 Southern Blot-Sonden

NGF-Allel-Sonde: 1,5 kb HincII-Fragment, welches ca. 6 kb stromaufwärts von NGF Exon Ia liegt (siehe Abb. 5.1).

Neo-Sonde: PCR-amplifiziertes Neo-Fragment (Codon 142-259 der Neo kodierenden Sequenz (Accession No. AF335419)). Verwendete Primer: Neo+/Neo-.

Hygro-Sonde: BamHI/SalI-Fragment (1 kb) aus pWL512. Dies entspricht der kodierenden Sequenz des Hygro-Gens.

EGFP-Sonde: EcoRI/NotI-Fragment (770 bp) aus pEGFP-N3. Dies entspricht der kodierenden Sequenz des EGFP-Gens.

4.2 Methoden

4.2.1 Klonierungsarbeiten

Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Transformationskompetente Bakterien wurden auf einer der beiden folgenden Arten hergestellt:

a.) „Rubidiumchlorid-Methode“:

Es wurden E.coli-Bakterien auf einer Selektivmedium enthaltenden Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. 100 ml SOB-Medium wurden mit zehn Kolonien dieses frischen Ausstriches inokuliert. Unter Schütteln bei 37°C wurde bis zu einer OD_{550nm} von 0,5 gewartet.

Alle weiteren Schritte wurden unter Kühlung auf Eis und unter der Verwendung von kalten Lösungen durchgeführt. Es folgte eine Zentrifugation der Bakteriensuspension bei 2800 g für 10 min (4 °C) in zwei eisgekühlten 50 ml Falcon-Röhrchen. Die Pellets wurden in je 12,5 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert und vereinigt. Anschließend wurde bei 2800 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 ml eisgekühlter RF2-Lösung resuspendiert. Am Schluß wurden Aliquots von je 100 µl auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert.

b.) Herstellung elektrokompeter Bakterienzellen:

Die Herstellung elektrokompeter Bakterien erfolgte nach Sambrook et al. (2001).

Transformation von Bakterien

Die Transformation wurde nach der Calciumchlorid-Methode (Sambrook et al., 2001) oder mittels Elektroporation durchgeführt (2,5 kV, 25 µF, 200 Ohm).

Animpfen der Vorkultur (Miniprep)

Mit der gewünschten Bakterienkolonie wurde mittels einer Impföse 5 ml Antibiotikum enthaltendes LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Miniprep (Plasmidpräparation in geringeren Mengen)

Es wurde entweder das modifizierte alkalische Lysis-Verfahren von Birnboim & Doly (1979) oder das Qiaprep Spin Miniprep Kit von Qiagen verwendet.

Animpfen der Hauptkultur (Maxiprep)

100 ml Selektiv-Medium wurden mit 10 µl einer Über-Nacht-Kultur inokuliert und im Schüttler bei 37°C über Nacht inkubiert.

Maxiprep (Herstellung größerer Plasmidmengen)

Zur Durchführung dieser Präparation wurde das Maxiprep Purification Kit von Qiagen verwendet.

Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionen erfolgten nach Angaben der Enzym-Hersteller in den jeweiligen Inkubationspuffern.

Beim Verdau genomischer DNA wurde zusätzlich Spermidin (1 mM Endkonz.) zugegeben.

Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Molekülen

Die Agarosekonzentration der Gelmatrix richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente (Ausubel et al., 1993). Maximal wurde eine Agarosekonzentration von 2%, minimal eine von 0,6% verwendet. Als Standard-Elektrophorese-Puffer diente 1xTAE, für genomische Southern Blots 1xTBE.

Die Elektrophorese erfolgte nach Sambrook et al. (2001).

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden unter UV-Beleuchtung aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus der Agarose erfolgte mittels des Qiaquick Gel Extraction Kit von Qiagen.

Dephosphorylierung

Zur Ligation zweier DNA-Fragmente mit stumpfen Enden wurde die Vektor-DNA mit CIP (calf intestine phosphatase) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert.

Erzeugung stumpfer Enden mittels Klenow

Beim Auftreten nicht-kompatibler Enden kann durch die Erzeugung von stumpfen Enden durch Auffüllen oder Abtragen des DNA-Überhangs eine Ligation erreicht werden. 5'-Überhänge wurden mit dem Klenow-Enzym, 3'-Überhänge mit der T4 DNA-Polymerase stumpf gemacht. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von 5' und 3' Enden wurde die T4 Polymerase eingesetzt. Alle Reaktionen erfolgten nach Angaben der Hersteller.

Ligation von DNA-Molekülen

Die Reaktionsbedingungen bei einer Ligation sind stark von der Art der verwendeten Enden, Art und Größe der DNA-Fragmente abhängig. Standardmäßig wurde versucht, ein Reaktionsvolumen von 10 µl und eine T4 DNA-Ligase-Konzentration von 1U/10µl zu erreichen. Die optimale Vektorkonzentration liegt bei ungefähr 50 ng für ein 3 kb großes Fragment. Die molare Insertkonzentration sollte drei- bis zehnmal höher als die des Vektorstücks sein.

Ligationen mit klebrigen Enden wurden bei 4°C über Nacht, Reaktionen mit stumpfen Enden bei Raumtemperatur über Nacht durchgeführt. Ligationen, bei denen beide Arten von Enden vorkamen, wurden bei 16 °C über Nacht durchgeführt.

DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden am Max-Planck-Institut für Neurobiologie von Hr. Richter bzw. Fr. Tyrlas nach der Didesoxymethode von Sanger (Sanger et al., 1977) auf einem automatischen Sequenzierer durchgeführt.

Klonierung durch homologe Rekombination in Bakterien

Diese spezielle Art des Klonierens, bei der keine Restriktionsendonukleasen benötigt werden, basiert auf der Fähigkeit von Bakterien, unter bestimmten Voraussetzungen homologe Bereiche von linearen PCR-Fragmenten und zirkulären Plasmiden miteinander zu rekombinieren. Methodisch vorgegangen wurde hierbei wie in Zhang et al. (1998) und Muylers et al. (2000) beschrieben. Als rekombinogener Hintergrund wurde der Bakterienstamm JC 8679 verwendet.

4.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Alle Polymerase-Ketten-Reaktionen (Saiki et al., 1988) wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Angaben des Polymerase-Herstellers durchgeführt. Die Zyklenzahl lag bei 25-40 Zyklen. Die optimale Primer-Anlagerungstemperatur wurde mittels des Eppendorf Mastercycler Gradient-PCR-Systems ermittelt, welches die simultane Ausführung verschiedener Temperaturen zuläßt.

Nested-PCR

Bei der Nested-PCR („Verschachtelte PCR“) verwendet man zwei Primerpaare zur Amplifikation: Ein äußeres und ein inneres. Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer erhöhten Spezifität und Sensitivität, da das durch das äußere Primerpaar amplifizierte Stück als Template für das innere Primerpaar dient. Dadurch entfallen unspezifische Amplifikationen, da nach der ersten PCR-Reaktion (äußeres Primerpaar) das gewünschte Amplifikationsprodukt isoliert und in die zweite PCR-Reaktion (inneres Primerpaar) als Template eingesetzt wird. Somit lassen sich auch geringste Mengen an DNA nachweisen. Nach Auftragung des PCR-Ansatzes mit dem äußeren Primerpaar auf ein Agarosegel wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten, mit 500 µl Wasser versetzt und 5 min gekocht. Davon wurden 5-10 µl als DNA-Template in die PCR (50 µl) mit dem inneren Primerpaar eingesetzt. Die Konzentrationen der anderen Reagenzien und die Reaktionsbedingungen waren identisch mit der ersten PCR.

Nach Beendigung der PCR mit dem inneren Primerpaar wurde diese auf ein Agarosegel aufgetragen und die gewünschte Bande ausgeschnitten und die DNA eluiert. Nach quantitativer Bestimmung mittels Agarosegel wurde ein Aliquot der eluierten DNA zum Sequenzieren gegeben.

Bei Genloci, welche wiederholt amplifiziert wurden, wurde zur Verhinderung von Kontaminationen durch vorherige PCR-Reaktionen das GeneAmp Prevention Kit von Perkin Elmer verwendet.

4.2.3 Proteinarbeiten

Alle hier nicht explizit aufgeführten Techniken wurden nach Coligan et al. (1996) durchgeführt.

Überexpression von Cre

Das bakterielle Cre-Expressionsplasmid pQE-30 wurde in den Bakterienstamm M15[pREP4] transformiert. Dieser für Proteinexpression produzierte Stamm ist defizient in zahlreichen Proteasen und die Überexpression ist über ein lac-Operon gut steuerbar.

Test-Induktion

5 ml Kultur wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 wachsen gelassen und dann mit IPTG (Endkonz. 1 mM) induziert. 300-500 µl dieser Kultur wurden pelletiert, in 130 µl PBS resuspendiert, 70 µl Probenpuffer zugefügt, aufgekocht und davon 15 µl auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen.

Expression und Aufreinigung größerer Proteinmengen

In einem Gesamtansatz von 1 l wurden pQE-30-transformierte M15[pREP4]-Bakterien bei 37 °C hochgezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7 wurde durch IPTG-Zugabe (0,5 M Endkonzentration) die Expression induziert und anschließend bei Raumtemperatur für 4 h inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert und in 20 ml Lysepuffer aufgenommen. Der Lyse zugesetzt waren Lysozym (Endkonz. 750 µg/ml), DnaseI (Endkonz. 25 µg/ml) und PMSF (Endkonz. 1mM). Die Zellen wurden mechanisch mittels einer French Press aufgebrochen. Das Lysat wurde 30 min bei 10000 g zentrifugiert, der Überstand über einen 0,45 µm Filter gereinigt und anschließend auf eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgebracht. Nach der Bindung des his-tag-Cre an das Säulenmaterial (1,5 h), wurde die Säule gewaschen (3 h) und das Protein eluiert. Elutionsfraktionen wurden gesammelt und auf einem SDS-Gel analysiert. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereint und gegen 5 l Dialysepuffer dialysiert. In diesem Puffer wurde das Protein bei -70 °C gelagert (Proteinabbau bei +4 °C).

In vitro Cre-Reaktion

In die Reaktion mit 1x Reaktionspuffer wurde eingesetzt: Die jeweilige Menge an DNA, Cre-Protein, Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 30 μ l. Danach wurde bei 37 °C für 1h inkubiert und anschließend das Enzym durch fünfminütiges Erhitzen auf 70 °C inaktiviert. In Integrationsreaktionen wurden 0,25 μ g PN2Flox und 1,84 μ g CMV β I, in Excisionsreaktionen 1,84 μ g PN2Flox eingesetzt. Wenn verschiedene Plasmidverhältnisse eingesetzt wurden, wurde als Basis zur Berechnung der anderen Plasmidmengen 0,25 μ g PN2Flox verwendet. Für nachfolgende PCR-Reaktionen (30 Zyklen, 66°C, Int.+Exc.) wurden 5 μ l des Reaktionsansatzes verwendet.

Cre-Immunoblot

Western Blotting wurde im Semi-Dry-Verfahren nach Coligan et al. (1996) durchgeführt. Es wurde auf PVDF-Membranen geblottet. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler anti-Cre Antikörper (aus Maus) (Babco), Verdünnung 1:1000, verwendet. Der sekundäre Antikörper war ein 1:10000 verdünnter, Peroxidase-gekoppelter anti-Maus Antikörper (ECL-System, Amersham). Die Detektion erfolgte mittels des ECL-Kits von Amersham-Pharmacia.

4.2.4 Zellkultur

Alle Zellen wurden standardmäßig bei 37°C, 10% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zellkulturprozeduren wie Auftauen, Einfrieren, Passagieren von Zellen wurden nach Joyner (2000) durchgeführt.

Inaktivierung von EF-Zellen (neo-EF, EMFIS)

Embryonale Stammzellen werden optimalerweise auf einer Schicht teilungsunfähiger (inaktivierter) Embryonalfibroblasten (EF) kultiviert. Für die Inaktivierung mittels ionisierender Strahlung wurden EF-Zellen bei Passage 3 inaktiviert, vereinzelt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde durch Röntgenbestrahlung von 5500 rad inaktiviert.

Die verwendeten EF-Zellen besaßen das Gen für Neomycin-Phosphotransferase (siehe Material) und konnten daher für G418 Selektionen verwendet werden. Für Hygromycin- und Puromycin-Selektionen wurden Stammzellen auf Gelatineplatten kultiviert.

Allgemeine Transfektionsbedingungen

Um embryonale Stammzellen zu transfizieren, wurde entweder Elektroporation oder Lipofektion (mit Fugene 6, Roche) angewandt. Die Bedingungen für die Elektroporation sind in Lauth et al. (2000) angegeben, die Durchführung der Lipofektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

HEK 293T Zellen wurden durch Lipofektion transfiziert.

Transfektion für Frox-Rekombination

$3-4 \times 10^5$ PGK-FroxNeo ES Zellen wurden auf Gelatine-beschichteten 3,3 cm Schalen mit 1 µg Austauschplasmid und 1 µg pCre/Flp mit Fugene 6 transfiziert (12 µl Fugene auf 2 µg Gesamt-DNA). In einigen Fällen (siehe Ergebnisteil) wurden Zellen nach 1 Tag einer 24-stündigen Puromycin-Selektion unterzogen. Dieser Schritt entfiel bei allen anderen Experimenten.

48 h nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen auf 10 cm Schalen transferiert und ohne Selektion (im Falle des EGFP-Austausches) oder unter Hygromycin-Selektion (im Falle des Hygro-Austausches) für 10 d kultiviert.

Selektion transfizierter Stammzellen

Im Falle einer G418 Selektion wurde dem Medium 380 mg/l Geneticinsulfat zugesetzt. Die Konzentration wurde nach dem Isolieren einzelner Klone auf 300 mg/l reduziert. Für Selektionen mit Hygromycin B wurden 200 mg/l eingesetzt, Puromycin-Selektionen wurden mit 1 mg/l durchgeführt.

Isolation genomischer DNA aus Säugerzellen

Die Gewinnung von DNA aus Zellklonen auf einer 96 well Platte wurde nach Ramirez-Solis et al. (1992) durchgeführt.

Die Isolation von DNA aus Gewebeproben und Zellpellets erfolgte nach Laird et al. (1991).

Hirt-Extraktion

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus eukaryotischen Zellen wurde nach dem Protokoll von Hirt (1967) durchgeführt. Der am Schluß entstehende, Plasmid enthaltende Überstand wurde gefällt und für Bakterientransformationen benutzt.

LacZ-Färbung

Die histochemische Färbung der Zellen erfolgte nach Sanes et al. (1986).

Durchflußzytometrie

Zellen wurden trypsiniert und in PBS/0,5 mM EDTA in einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro ml resuspendiert. Zellen wurden mittels eines Becton Dickinson FACScan gezählt. Die Anregung erfolgte durch einen Argon Laser (488 nm). Die Detektion von GFP wurde mittels eines 530 nm Bandpass Emissionsfilters erreicht. Zwischen 200.000 und 650.000 Ereignisse wurden pro Lauf gezählt. Die Analyse der Daten erfolgte mittels Cellquest Software. Die Durchflußzytometrie wurde von Fr. Gryzina Galatowicz am Institute of Ophthalmology, University College London, durchgeführt.

Bestimmung der Cotransfektionsrate mittels Durchflußzytometrie: PGK-FroxNeo-Zellen wurden mit 1 µg pEGFP-N3 und 1 µg pDsRed-N1 durch Lipofektion (wie oben beschrieben) transfiziert. 2,5 Tage nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen mittels Durchflußzytometrie gezählt. Dazu wurde ein 530 nm Bandpass Filter für die GFP-Detektion und ein 585 nm Bandpass Filter für die DsRed-Detektion verwendet. Die Anregung erfolgte durch den 488 nm Argon Laser.

4.2.5 Southern Blot genomischer DNA

Southern Blot-Agarosegel und Kapillarblotting

10 µg genomische DNA (zuvor über Nacht verdaut) wurde auf 0,6 %igen TBE-Agarosegelen aufgetrennt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel 20 min in Denaturierungspuffer, anschließend 10 min in Transferpuffer geschwenkt. Die DNA wurde danach durch Kapillarblotting mit Transferpuffer auf positiv geladene Nylon-Membran übertragen (nach Sambrook et al., 2001).

Herstellung der radioaktiven Sonden

Die radioaktive Markierung der Sonden mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP wurde mittels des Random Prime Labelling Kit von Amersham Pharmacia nach Angaben der Firma durchgeführt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden anschließend über Gelfiltration abgetrennt (ProbeQuant G-50 Micro Columns). Die verwendeten Sonden sind im Materialteil angegeben.

Prähybridisierung und Hybridisierung

Der getrocknete Blot wurde für mindestens 3 h mit ca. 25 ml Hybridisierungslösung (vor Benutzung bis zum Aufklaren aufgekocht) bei 65°C prähybridisiert, anschließend wurde die Prähybridisierungslösung abgegossen und 6-7 ml dieser Lösung wurden mit der radioaktiv markierten Sonde versetzt und wieder zurück auf den Blot gegeben. Die hergestellte Sonde wurde vor Zugabe nochmals für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (mind. 6 h) bei 65°C.

Radioaktiv markierten Blot waschen und Exponieren

Nach der Hybridisierung wurde die Sonde abgegossen und der Blot einmal 5 min mit der Southern Blot Waschlösung 1 bei Raumtemperatur und zweimal 30 min mit der Waschlösung 2 bei 65°C gewaschen. Danach wurde der Blot in Folie eingewickelt und zur Exponierung auf einen Röntgenfilm oder eine Phosphoimager-Platte gelegt.

Southern Blot strippen

Zur Entfernung einer bereits gebundenen Sonde wurde der Blot in siedenden Southern Blot Strip-Puffer gelegt und für 30 min ohne weitere Wärmezufuhr liegen gelassen.

4.2.6 Methoden zur Herstellung genetisch modifizierter Mäuse

Blastozysteninjektion

Die Herstellung von genetisch modifizierten Mäusen durch Injektion von ES-Zellen in Blastozysten wurde von Fr. Birgit Kunkel, MPI für Neurobiologie, Martinsried, nach Joyner (2000) durchgeführt. Die Linie „PN2Flox“ trägt am NGF-Genlocus ein lox511/loxP flankiertes Tkneo-Gen und ist durch Gene Targeting entstanden.

Pronukleusinjektion

Männchen der PN2Flox-Linie wurden mit superovulierten wildtyp-Weibchen gekreuzt, die befruchteten Eizellen isoliert und mit den entsprechenden Plasmiden injiziert. Anschließend wurden die Embryonen bis zum 2-4-Zellstadium *in vitro* kultiviert. Diese wurden entweder in Empfängerweibchen transferiert oder weiter unter *in vitro* Bedingungen bis zum gewünschten Embryonalstadium kultiviert.

Die Plasmidinjektion in Vorkerne von befruchteten Oozyten der PN2Flox-Linie wurde von Fr. Birgit Kunkel, MPI für Neurobiologie, Martinsried, nach Joyner (2000) durchgeführt. Die anschließende Embryokultur erfolgte nach Hogan et al. (1994).

Vorbereitung der Plasmid-DNA für die Vorkerninjektion:

Die Plasmid-DNA wurde Ethanol-gefällt, in Pronukleus-Puffer resuspendiert, quantifiziert und durch einen 0,22 µm Spin-Filter (Ultrafree-MC, Millipore) gereinigt. Die Quantifikation erfolgte sowohl spektrophotometrisch als auch durch ein analytisches Gel. Die Kalkulation der injizierten Plasmidmenge erfolgte unter der Annahme, dass ca. 1(-2) pl an Flüssigkeit in eine Eizelle injiziert werden.

OHT-Behandlung injizierter Oozyten

Zur Aktivierung einer Fusion von Cre und der steroid-bindenden-Domäne des Östrogenrezeptors (Cre-ER^{T2}) wurden injizierte Eizellen über verschiedene Zeiträume mit dem Induktor 4-Hydroxytamoxifen (OHT) behandelt. Die Embryonen wurden in M16-Medium mit 1 µM OHT kultiviert. Zum Entfernen des Induktors wurden die Embryonen zweimal mit M16 gewaschen. Anschließend wurde in M16 bis zum gewünschten Entwicklungsstadium kultiviert.

Genotypisierung früher Embryonen

Die Genotypisierung der Embryonen vom 2-Zellstadium bis zum Blastozystenstadium ist in Lauth et al. (2000) beschrieben.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisteil I

5.1.1 Bisherige Vorarbeiten

Ziel der Arbeit war die Etablierung einer effektiven und zuverlässigen Methode zum seriellen Austausch von DNA-Elementen an vordefinierten Orten auf genomischer Ebene. In Fällen, in denen am Ende eine transgene Mauslinie erzeugt werden soll, kann ein solcher Austausch theoretisch entweder auf Stammzellebene oder in Einzelembryonen vorgenommen werden. Zur Anwendung kommen sollte ein als Rekombinase vermittelter Kassettenaustausch (recombinase-mediated cassette exchange, RMCE) in der Literatur bekannter Vorgang. Dieses ist ein Zwei-Schritt-Verfahren: Zuerst wird ein Genlocus so modifiziert, dass er die gewünschten Erkennungsstellen für Sequenz-spezifische Rekombinasen (SSR) enthält. Anschließend wird das Segment („die Kasette“), welches von den SSR-Erkennungsstellen flankiert wird, gegen eine von außen eingebrachte, ebenfalls von diesen SSR-Erkennungsstellen flankierte Sequenz ausgetauscht. Der Austausch wird von einer transient zur Verfügung gestellten DNA-Rekombinase ausgeführt. RMCE wurde zu Beginn dieses Projektes nur für einige Zelllinien (Bethke & Sauer, 1997; Feng et al., 1999; Seibler et al., 1997), nicht aber für ES Zellen oder gar Mausembryonen beschrieben. In Lauth (1999) konnte gezeigt werden, dass Cre vermittelter Kassettenaustausch (CMCE) in ES Zellen möglich ist. Dort wurde zuerst der interessierende Genlocus, der Promotorbereich des Nerve Growth Factor (NGF)-Gens, durch ein lox511/loxP flankiertes Selektionsgen ersetzt. Dies geschah durch konventionelles Gene Targeting. Danach wurden die entsprechenden ES Zellen mit einem Cre-Expressionsplasmid und einem Plasmid, welches die gleichen lox-Stellen und eine dazwischenliegende Austauschsequenz trägt, transfiziert. Molekularbiologisch konnten die Rekombinationsübergänge detektiert und positive Aussagen über die Anwendbarkeit der Methodik gemacht werden. Ein methodisch ähnlicher Ansatz und seine Anwendung in Stammzellen findet sich in Soukharev et al. (1999).

Unklar blieb die Effizienz der Methodik bei der Vorkerninjektion. Zu diesem Zweck wurden aus den homolog rekombinierten Stammzellen über Blastozysteninjektion eine

transgene Mauslinie etabliert. Diese sollte dann mit wildtyp Tieren verpaart und befruchtete Eizellen für die Vorkerninjektion isoliert werden.

5.1.2 Generation der PN2Flox-Mauslinie

Wie bereits in Lauth (1999) und Lauth et al. (2000) beschrieben, wurde ein 2,1 kb großes genomisches Stück aus dem NGF-Genlocus gegen ein lox511/loxP flankiertes Tkneo-Gen ersetzt. Von 600 untersuchten ES-Zellklonen zeigten vier korrekte homologe Rekombination. Diese Klone wurden in C57Bl/6-Blastozysten injiziert, und es wurde Keimbahntransmission mit drei dieser Klone erreicht. Die erzeugte mutante Linie trägt den Namen PN2Flox. Das Gene Targeting ist in Abbildung 5.1 gezeigt.

5.1.3 Demonstration der korrekten Expression und subzellulären Lokalisation der Cre-Rekombinase in frühen Embryonen

Zur Untersuchung, ob das verwendete Cre-Plasmid (pBS500) in frühen Embryonen korrekt exprimiert wird, wurde eine GFP-Cre-Fusion eingesetzt, deren Expression und Lokalisation über Fluoreszenzanalyse verfolgt werden kann. Befruchtete Eizellen wurden mit 10.000 Kopien pBS500 injiziert und im konfokalen Mikroskop untersucht. Wie in Abbildung 5.2 zu erkennen ist, kann man Cre-GFP-Fluoreszenz bereits im 2-Zellstadium nach Plasmidinjektion in den Kernen der Blastomeren erkennen. Die Lokalisation im Kern wird höchstwahrscheinlich durch Cre-interne Kernlokalisationselemente bewirkt (Le et al., 1999).

Somit war demonstriert, daß Cre-Rekombinase von diesem Plasmid korrekt exprimiert wird. Daß Cre in frühen Embryonen katalytisch aktiv ist wurde bereits von Araki et al. (1995) gezeigt.

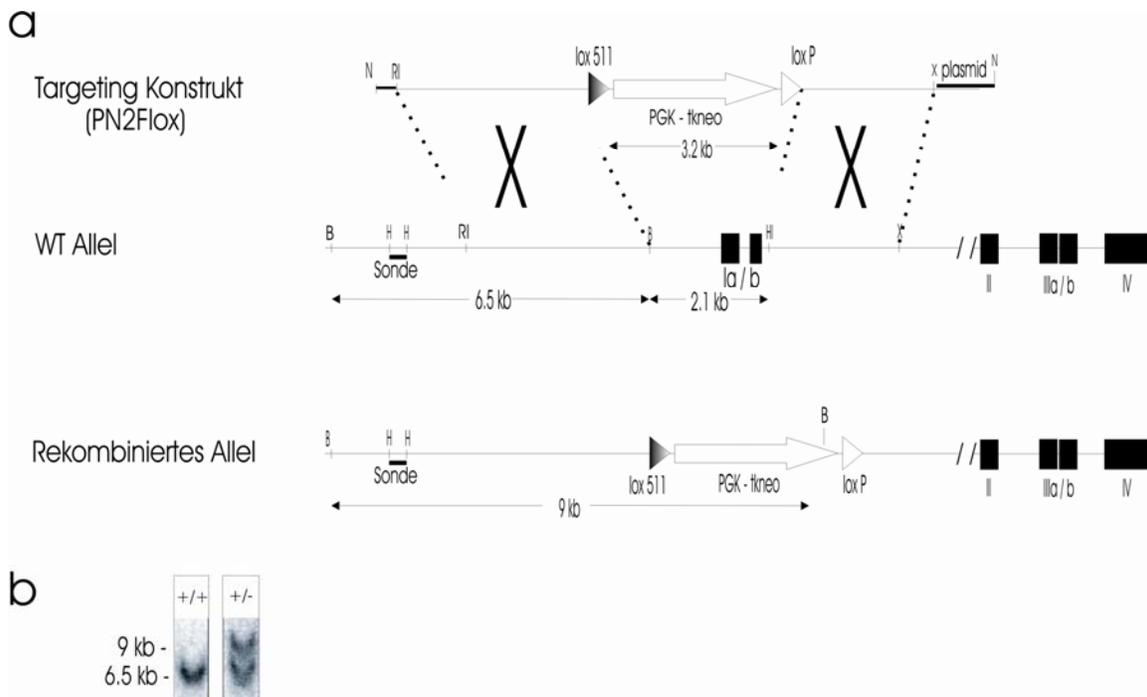


Abb 5.1. Targeting der NGF-Promotorregion durch homologe Rekombination in ES Zellen. (a) Schematische Darstellung des Targeting Vektors (PN2Flox, linearisiert mit NotI), des wild-typ Allels (wt) und des nach korrekter Rekombination resultierenden Allels. 2,1 kb der genomischen Sequenz wurden gegen einen Selektionsmarker ersetzt. NGF-Exone sind als schwarze Blöcke zu erkennen, loxP-Stellen durch Dreiecke. (b) Southern Blot Analyse rekombinierter Zellen. Wildtyp-Zellen zeigen nach BglII-Verdau ein 6,5 kb langes Restriktionsfragment während heterozygote Zellen ein 6,5 kb (wt-Allel) und ein 9 kb (rekombiniertes Allel) langes Stück zeigen. Restriktionsstellen sind: B BglII, H HincII, H1 BamHI, N NotI, X XhoI.

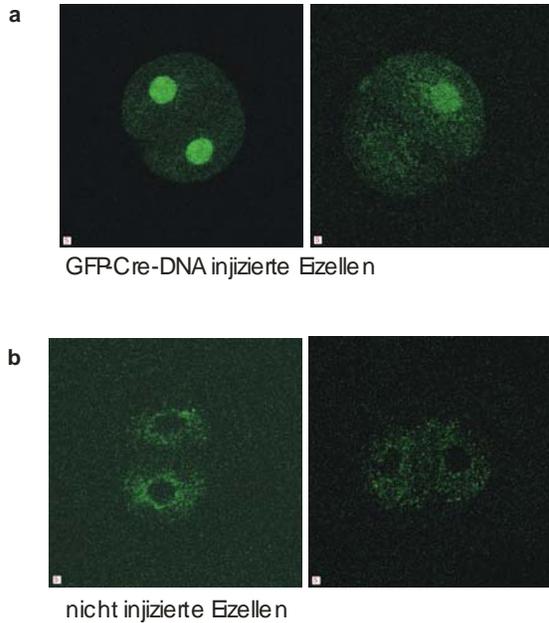


Abb. 5.2. Subzelluläre Lokalisation von GFP-Cre. (a) Befruchtete Eizellen von B6D2F1 Weibchen, welche mit Männchen der PN2Flox-Linie gekreuzt waren, wurden mit 10.000 Kopien des GFP-Cre-Expressionsplasmids (pBS500) injiziert.

Embryonen wurden im 2-Zellstadium analysiert. GFP-Fluoreszenz ist deutlich in den Kernen zu erkennen. In einigen Fällen wurde GFP-Fluoreszenz nur in einem der beiden Kerne beobachtet (a, rechts). (b) Nicht injizierte Eizellen zeigten keinerlei GFP-Kern-Fluoreszenz. Das Cytosol zeigte eine schwache Hintergrundautofluoreszenz.

5.1.4 Cre vermittelte Integration

Das Ziel des Ansatzes, welcher in Abbildung 5.3 gezeigt ist, war die Durchführung eines Cre vermittelten Kassettenaustausches in frühen Mausembryonen. Die benötigten Plasmide wurden hierbei durch Mikroinjektion in die Vorkerne der Einzellembrionen bereit gestellt. Hierzu wurden B6D2F1 x PN2Flox-Oocyten mit pBS500 (GFP-Cre-Plasmid, 5 ng/ μ l (entspricht 670 Kopien/pl)) und pCMV β I (Austauschplasmid, 8 ng/ μ l (entspricht 930 Kopien/pl)) injiziert. Die Detektion der Rekombinationsereignisse wurde mittels PCR durchgeführt. Die dazu verwendeten Primer und ihre Bindestellen sind in Abbildung 5.3 gezeigt. Einer der Primer band an die flankierende genomische Sequenz, während der andere Primer an die zwischen den lox-Stellen liegende Austauschsequenz hybridisierte. So konnte eine Amplifikation nur nach korrekter Integration in das Genom erfolgen.

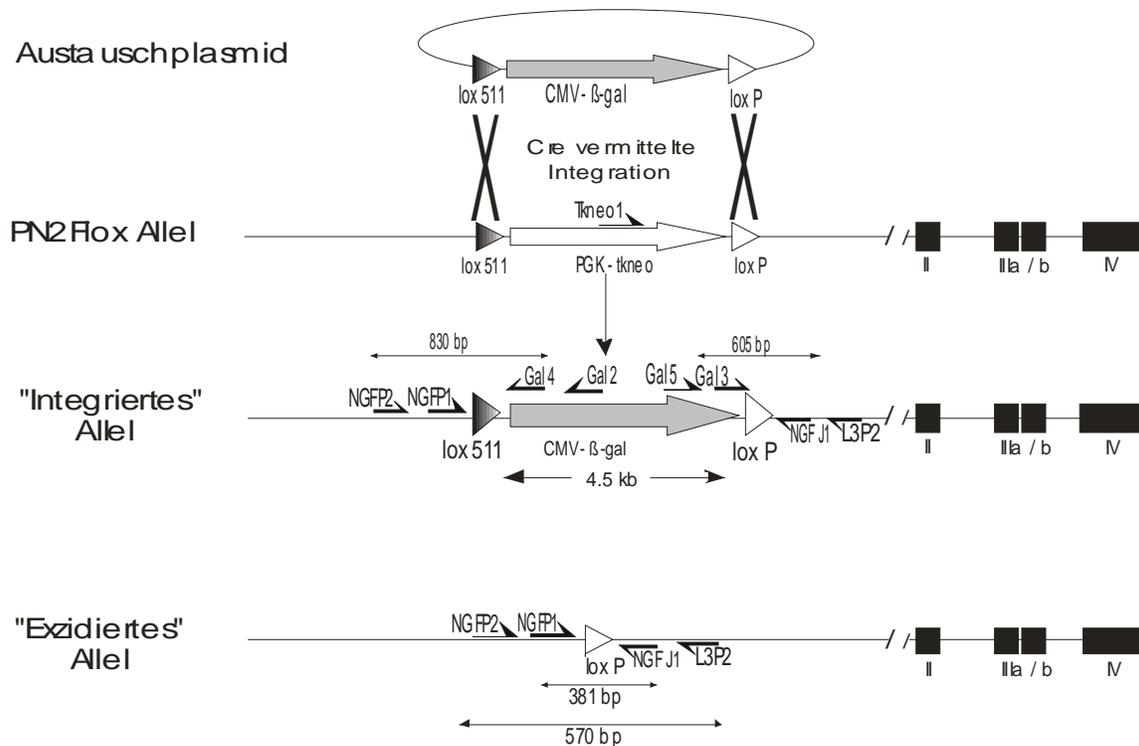


Abb. 5.3. Schematische Darstellung der Cre vermittelten Austauschreaktion am NGF-Genlocus. Die Struktur des zirkulären Austauschplasmids (pCMVβ) ist ganz oben gezeigt. Transiente Cre Expression resultiert in einem Austausch der PGK-Tkneo-Kassette gegen das CMV-β-Galactosidase-Konstrukt (Integriertes Allel, „Integration“). Das exzidierte Allel („Exzision“), welches nach Rekombination zwischen lox511 und loxP entsteht, ist unten abgebildet. Schwarze Pfeile stellen die für die jeweiligen PCR-Reaktionen verwendeten Primer dar. Die Länge der amplifizierten Stücke ist ebenfalls gezeigt.

Von 109 analysierten frühen Embryonen zeigten 10 den korrekten Rekombinationsübergang via loxP (Abb. 5.4 und Tab. 5.1). Dies wurde zusätzlich durch Sequenzierung der PCR-Produkte nachgewiesen. Zudem wurden 104 Embryonen auf den loxP-, wie auch auf den lox511-Übergang untersucht. In 8 Fällen fanden sich beide Übergänge, bei 3 Embryonen war nur der loxP-Übergang wiederzufinden. Der lox511-Übergang trat niemals alleine auf, was darauf hindeutet, daß loxP/loxP-Rekombination effektiver als lox511/lox511-Rekombination zu sein scheint. Zusammengenommen ergeben diese Daten eine Integrationseffizienz von 15-20 % der injizierten Oozyten. Eingerechnet wurde hierbei die Tatsache, daß nur heterozygote Tiere verpaart wurden (siehe Tab. 5.1).

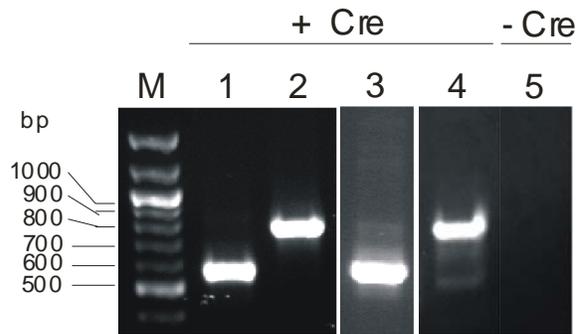


Abb. 5.4. Detektion von Integrationsallelen durch Nested-PCR-Amplifikation. Nur die PCR-Produkte der Reaktion mit dem internen Primerpaar sind gezeigt. Die Lage der Primer kann in Abbildung 5.3 ersehen werden. M = DNA-Marker. 1 = PCR mit Primern Gal3/NGFJ1 (indikativ für Rekombination über loxP, PCR-Produkt: 605 bp). 2 = PCR mit Primern NGFP2/Gal4 (indikativ für Rekombination über lox511, PCR-Produkt: 830 bp). 3 = Positivkontrolle für PCR 1*. 4 = Positivkontrolle für PCR 2*. 5 = Kontroll-PCR von Embryonen, welche mit Austauschplasmid, aber ohne Cre-Plasmid, injiziert wurden. Alle PCR-Produkte wurden sequenziert und entsprachen den erwarteten Übergängen.

*DNA aus transfizierten Stammzellen, bei denen CMCE stattgefunden hatte.

Exp. Nr.	Anzahl der analysierten Embryonen	Anzahl der Embryonen mit korrekter Integration	Integration (%)	korrigierte Integrationsrate ^a (%)
1	109	via loxP: 10	9.2	18.4
2	104	via loxP + lox511: 8 nur via loxP: 3 nur via lox511: 0	7.7 2.9	15.4 5.8
3	128	Kein Cre-Expressionsplasmid injiziert	0	0

Tab. 5.1. Integrationshäufigkeiten. Die Untersuchung der Rekombinationsereignisse wurde im 2-4-Zellstadium durchgeführt. In Experiment 1 wurden nur die Integrationen via loxP, in Experiment 2 beide lox-Übergänge untersucht. Experiment 3 stellt ein Kontrollexperiment dar, welches die Cre-Abhängigkeit der Gesamtreaktion zeigt.

^aDie befruchteten Eizellen stammten aus B6D2F1- oder FVB-Weibchen, die mit männlichen +/- PN2FloxF1 Tieren gekreuzt wurden. Daher trugen nur 50 % der injizierten frühen Embryonen das PN2Flox-Allel. Die anderen 50 % bestanden aus wildtyp Embryonen. Man könnte daher die Integrationseffizienz verdoppeln, wenn man mit -/- Tieren arbeiten würde, da dann jede befruchtete Eizelle das benötigte Allel tragen würde. Wir waren jedoch gezwungen, heterozygote Tiere zu verwenden, da NGF-Promotor-KO-Mäuse kurz nach der Geburt sterben.

Zur Demonstration, daß die beobachteten Integrationsreaktionen nicht zufällig, sondern Cre vermittelt waren, wurden 128 Einzellembryonen mit Austauschplasmid, aber nicht mit Cre-Expressionsplasmid, injiziert. In keinem der Fälle konnte man ein Integrationsereignis feststellen. Alle Embryonen wurden im 2-4-Zellstadium analysiert.

5.1.5 Rekombinationsereignisse in Postimplantationsembryonen

Zur Bestimmung der Stabilität der integrierten Sequenz wurden Einzellembryonen mit pBS500 und pCMV β I (Konz. wie in Abschn. 5.1.3.) injiziert und spätere Embryonalstadien auf ihren Genotyp am NGF-Allel untersucht. Überraschenderweise konnte bei Embryonen im Alter von E8-E10 keine Integration festgestellt werden (Tab. 5.2). Genauere Analysen zeigten, daß als Rekombinationsergebnis nur exzidierte Allele auftraten. Der Grund, weswegen man in späten Entwicklungsstadien keine Integrierten finden konnte, könnte darin gelegen haben, daß zwar Integration im ersten Schritt stattfand (Ergebnisse der 2-4-Zellembryonen), im zweiten Schritt jedoch Rekombination zwischen loxP und lox511 die dazwischenliegende Sequenz herausgeschnitten hat. Als Resultat blieb in diesen Fällen eine loxP-Stelle (durch Sequenzierung verifiziert), welche ohne Selektionsdruck nahezu inert für Integrationsreaktionen ist (Baer & Bode, 2001). Der Grund für die exzisivon Rekombinationsvorgänge könnte ein verändertes Verhältnis zwischen Austausch- und Expressionsplasmid gewesen sein: Während mit zunehmender Zellteilung im Embryo die Konzentration des Austauschplasmids abnimmt, kann Cre-Rekombinase weiter exprimiert werden. Damit entsteht ein Übermaß an Enzym verglichen mit der Menge an vorhandenem Austauschsubstrat. Unter der Annahme, daß zu große Mengen an Cre-Rekombinase für die Rekombination der heterospezifischen lox-Stellen verantwortlich waren, wurden befruchtete Oozyten mit einer Plasmidmischung mit reduzierter Cre-Plasmid-Konzentration (135 Kopien/pl pBS500, 930 Kopien/pl CMV β I) injiziert.

Wie in Tabelle 5.2 zu ersehen ist, wurde mit dieser Injektionsmischung die Gesamtzahl der Rekombinationsereignisse reduziert. Die Zahl der Exzisionen war im Vergleich zur

vorherigen Mischung verringert. Integrationen konnten nicht detektiert werden. Untersucht wurden E8-Embryonen und Blastozysten.

Exp. Nr.	Entwicklungsstadium/Inj.mix	wt/wt	wt/tkneo	Integration	Exzision	Gesamt (mosaisch)
1	E10 / M1	17	10	0	11	36 (2)
2	E8 / M1	44	43	0	28	99 (16)
3	E8 / M2	53	30	0	5	86 (2)
4	Blasto / M2	--	--	0	--	51

Tab 5.2. Untersuchung der Rekombinationsereignisse in Postimplantationsembryonen. Es wurden verschiedene Entwicklungsstadien untersucht: E8 = Embryonaltag 8; E10 = Embryonaltag 10; Blasto = Blastozystenstadium. Ebenso wurden unterschiedliche Mengen an Cre Expressionsplasmid injiziert: M1 = Mischung aus 670 Kopien/pl pBS500 und 930 Kopien/pl CMVβI; M2 = Mischung aus 135 Kopien/pl pBS500 und 930 Kopien/pl CMVβI. Die Anzahl der Embryonen mit folgendem Genotyp ist in der Tabelle aufgeführt: wt/wt = Embryonen homozygot für das wild-type NGF allele; wt/tkneo = Embryonen heterozygot für das wt und das tkneo allele; Integration = Embryonen heterozygot für das CMVβI-integrierte Allel (via loxP); Exzision = Embryonen heterozygot für das exzidierte Allel nach Rekombination zwischen lox511 and loxP. Einige Tiere zeigten Mosaizismus: Sie besaßen das tkneo- sowie das exzisions-Allel (d.h. exzisive Rekombination fand nicht in allen Zellen des Embryos statt). Im Blastozystenstadium wurde nur die Integrationsreaktion untersucht.

5.1.6 Herstellung und Injektion von Cre-Protein

Wie in den beiden vorherigen Abschnitten gezeigt, ist Cre-medierte Integration eines Transgens in frühen Embryonen möglich. Diese ist jedoch instabil und unterliegt exzisivem Rekombinationsvorgängen. Der Grund könnte eine zu lang anhaltende Aktivität der Cre-Rekombinase bei gleichzeitiger Abnahme der Austauschplasmidkonzentration gewesen sein. Als Idealverlauf einer Cre-Aktivitätskurve wäre somit ein scharfer, hoher Aktivitätsgipfel in den allerersten Entwicklungsstadien

anzusehen. Daher sollte eine Injektion von Cre-Protein, und nicht DNA, einen solchen Verlauf gewährleisten, da nach Injektion das Enzym sofort zur Verfügung stünde und anschließend durch Proteinabbau rasch entfernt würde. Eine kontinuierliche Produktion des Enzyms (wie bei einem Expressionsplasmid) wäre hier nicht möglich.

Zu diesem Zweck wurde die Cre-kodierende Sequenz in einen bakteriellen Expressionsvektor (pQE-30) kloniert. Die Aufreinigung des 38 kD großen, mit his-tag- und N-terminaler NLS-versehenen Proteins ist in Abbildung 5.5 gezeigt.

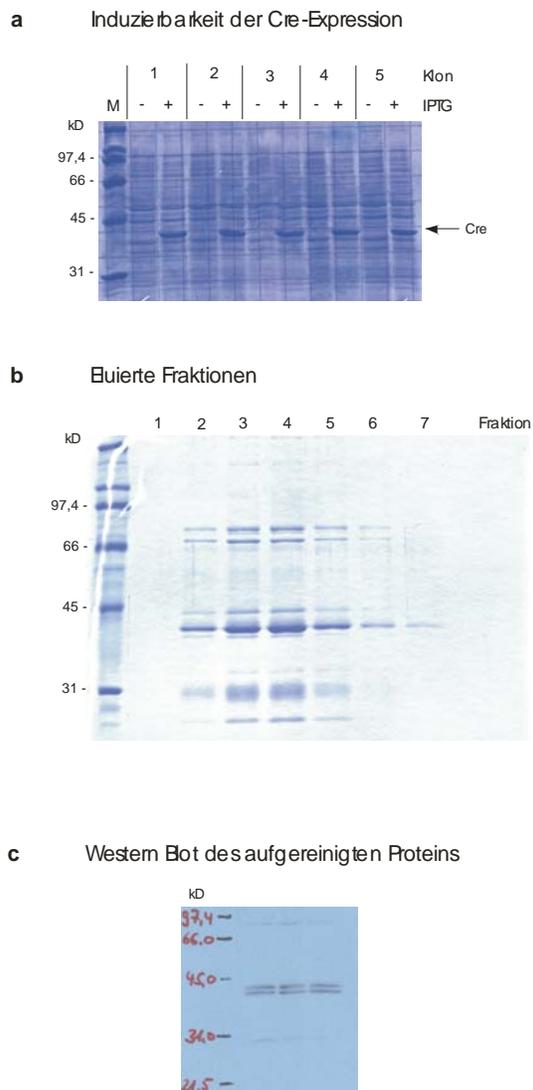


Abb 5.5. Aufreinigung des Cre-Proteins. (a) und (b) stellen Coomassie-gefärbte Gele dar. (a) Cre-Protein läßt sich durch IPTG-Induktion in Bakterien überexprimieren. Bei allen untersuchten Klonen zeigt sich eine starke Bande der richtigen Größe. Aufgetragen wurde das Bakterien-Gesamtlysat. (b) Auftragung verschiedener eluierter Fraktionen. His-Tag-Cre wurde über eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt. Außer der Bande bei 38 kD zeigen sich noch andere Nebenbanden. (c) Immunoblot-Analyse des aufgereinigten Proteins mit anti-Cre-Antikörpern. Man erkennt, daß auch die Nebenbanden aus (b) Cre-Protein darstellen. Dies sind höchstwahrscheinlich unterschiedliche Konformationen (Doppelbande bei 38/40 kD) und Dimere (76 kD). Bei 30 kD ist eventuell ein proteolytisches Fragment zu erkennen.

Die aufgereinigte Cre-Rekombinase wurde anschließend funktionellen Tests unterzogen. Hierzu wurde versucht, die *in vivo* Situation für CMCE nachzustellen: Zwei DNA-Konstrukte (hier Plasmide), welche lox511 und loxP-Stellen trugen, wurden in einem zellfreien System mit rekombinanter Cre-Rekombinase gemischt und inkubiert. Die Aktivität von Cre wurde bestimmt, indem Rekombinationsprodukte per PCR nachgewiesen wurden. Wie in Abbildung 5.6 zu erkennen ist, ließ sich deutlich eine Cre-Aktivität nachweisen, was bedeutet, daß das aufgereinigte Protein enzymatisch aktiv war. Im durchgeführten *in vitro* Versuch konnte man zusätzlich eine klare Konzentrationsabhängigkeit der Integrations- und Exzisionsreaktion erkennen. Wie schon von den *in vivo* Daten zu erwarten war, nahm beides mit zunehmender Enzymkonzentration zu (Abb. 5.6b). Ebenso ließ sich der Einfluß der Austauschplasmidkonzentration auf den Ausgang der Rekombination darstellen: Mit steigender Austauschplasmidkonzentration nahm die Integration zu und die Exzision ab (Abb. 5.6c). Dies spiegelt den *in vivo* Verlauf nach Oozyteninjektion wider, wo vermutlich die Abnahme der Austauschplasmidmenge bei nahezu konstanter Enzymmenge eine Verschiebung von Integration zu Exzision bewirkte.

Nachdem gezeigt war, daß die hergestellte Cre-Rekombinase katalytisch aktiv war, wurden Einzelembryonen mit einer 140 ng/ μ l His-Cre-Lösung injiziert und im 2-4-Zellstadium analysiert. Die Injektion wurde ohne Austauschplasmid durchgeführt, weswegen nur Exzisionsreaktionen untersucht wurden. Als Injektionspuffer diente der Cre-Dialysepuffer. Zusätzlich wurde kommerziell erhältliches Cre-Protein der Firma Novagen injiziert. Hier wurde das Austauschplasmid coinjiziert (8 ng/ μ l). Daher wurden Integrations- und Exzisionsreaktionen untersucht. Wie in Tabelle 5.3 zu sehen ist konnte in keinem der Fälle eine Exzisions- bzw. Integrationsreaktion nachgewiesen werden.

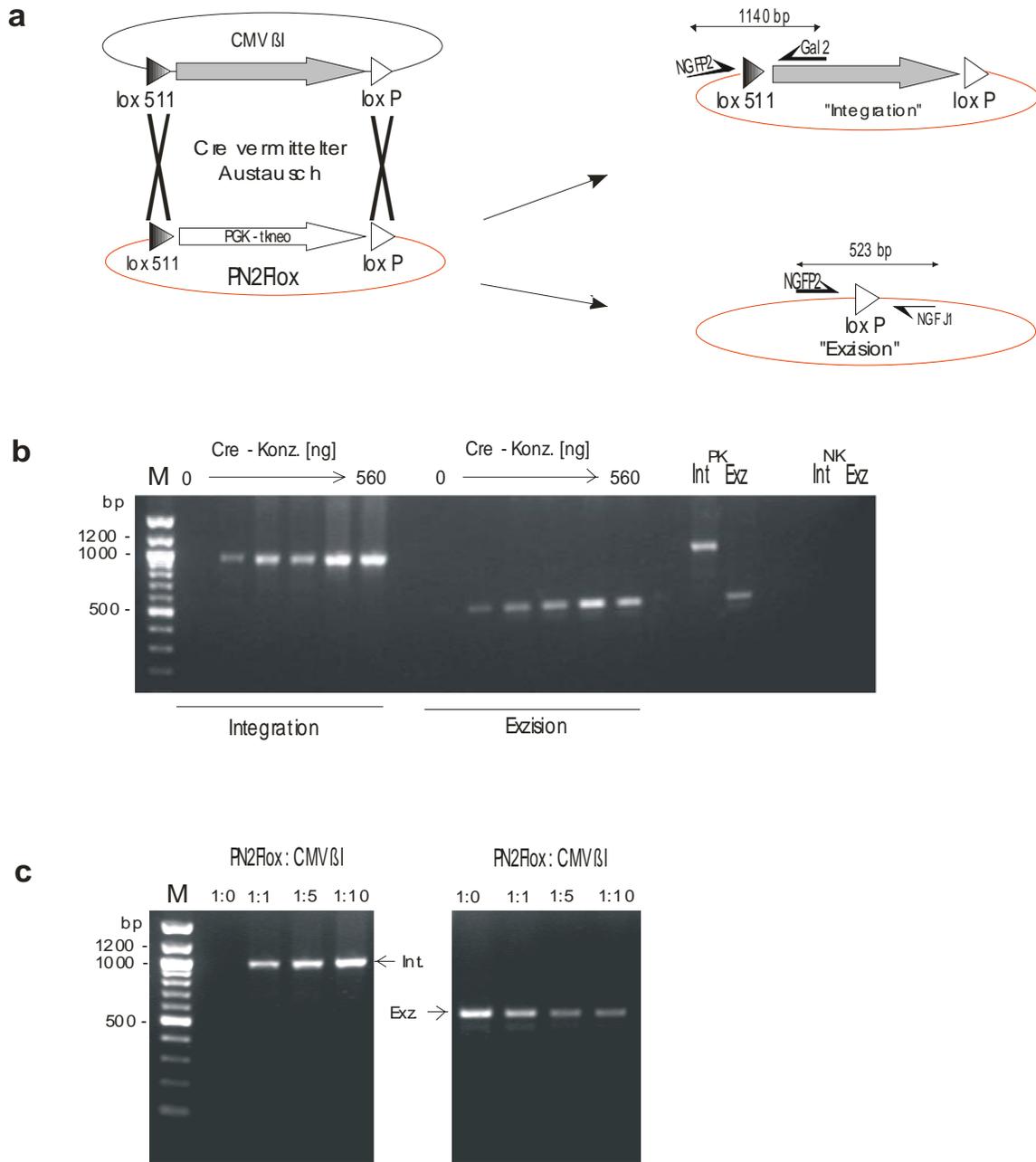


Abb 5.6. In vitro DNA-Rekombination. (a) Schematische Darstellung der möglichen Reaktionswege. In die Reaktion wurden eingesetzt: Rekombinantes Cre und die beiden Plasmide CMVβI und PN2Flox (rot). Die Detektion der Reaktionsprodukte erfolgte über PCR-Analyse der Rekombinationsübergänge am PN2Flox-Plasmid. Durch die Lage der Primer konnten die Edukt-Plasmide kein Amplifikationsprodukt ergeben. Im Falle der Exzision war die Elongationszeit der PCR zu kurz, um das PGK-Tkneo-Segment zu amplifizieren. (b) Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionen. Die Menge an eingesetztem Cre ist oben gezeigt und steigt in 70 ng Schritten von 0 auf 560 ng an. PK = Positivkontrolle mit ES-DNA, NK = Negativkontrolle ohne DNA, Int = Integration, Exz = Exzision. (c) Einfluß der molaren Plasmidverhältnisse auf die Gesamtreaktion. Die molaren Verhältnisse der Plasmide sind oben angegeben. Mit steigender Austauschplasmidkonzentration (CMVβI) steigt die Integrationsrate und sinkt die Exzisionsrate. Die Cre-Konzentration war hier konstant.

Injektion von	Anzahl der analysierten Embryonen	Rekomb.
Cre-Protein (von Firma Novagen) + pCMV β I	94 (2-4 cell)	0 Int.
	78 (2-4 cell)	0 Exz.
His-tag-Cre (hausgemacht) - pCMV β I	15 (2-4 cell)	0 Exz.

Tab. 5.3. Pronukleusinjektion von Cre-Protein. Injektion von Cre Protein und Detektion nachfolgender Rekombinationsereignisse. Int = Integration via loxP, Exz = Exzision des PN2Flox-Allels.

5.1.7 Verwendung eines Liganden induzierbaren Cre-Systems

Nachdem der Ansatz der Cre-Protein-Injektion nicht zum gewünschten Erfolg geführt hatte, wurde ein anderes Konzept in Erwägung gezogen: Durch die Fusion einer Ligandenbindungs-Domäne (LBD) eines Steroidrezeptors an die kodierende Sequenz von Cre kann diese in ihrer Aktivierung an das Vorhandensein des Steroid-Induktors gekoppelt werden (Logie & Stewart, 1995). Die LBD hält, zusammen mit Proteinen der hsp90-Familie, die Cre-LBD Fusion im Cytosol zurück. Durch Zugabe des Liganden transloziert das Fusionsprotein in den Kern und führt seine spezifische Reaktion aus. In dieser Arbeit wurde mit einer Fusion aus Cre und der LBD des Östrogenrezeptors gearbeitet (Cre-ER^{T2}) (Indra et al., 1999; Feil et al., 1997). Da ursprünglich für die Anwendung im Tier entwickelt, wurde die LBD hier derart mutiert, daß endogenes Östradiol sehr schlecht bindet und die Aktivierung mittels des Östrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen bzw. dessen physiologischen Folgeproduktes 4-Hydroxytamoxifen (OHT) erfolgt.

Mit einem solchen Ansatz könnte durch Zugabe des Liganden eine Aktivierung, durch Wegnahme des Liganden eine Inaktivierung der Cre-Aktivität erreicht werden. Ein solches System wäre demnach perfekt, um eine zeitliche Kontrolle über die Aktivität

eines fusionierten Enzyms zu erhalten. Für unseren Ansatz war vor allem die Inaktivierung der Cre-Aktivität von entscheidender Wichtigkeit.

Die Plasmide pCMV β I und pSV40-Cre-ER^{T2} wurden in befruchtete Eizellen einer PN2Flox-Kreuzung injiziert. Die Analyse der resultierenden Embryonen erfolgte im 2-4-Zellstadium. Die Aktivierung erfolgte durch Zugabe von OHT in das Embryonenmedium, die Entfernung des Liganden durch Waschen der Embryonen und Mediumwechsel. Wie in Tabelle 5.4 gezeigt wurden verschiedene OHT-Inkubationszeiträume getestet. Es konnte eine Cre-Aktivierung erreicht werden, welche den Injektionsexperimenten mit ursprünglichem Cre-Expressionsplasmid (pBS500) entsprach. Dennoch konnte in späteren Zeitpunkten keine Integration detektiert werden, auch nicht, wenn das Zeitfenster der OHT-Exposition variiert wurde.

Länge der OHT- Behandlung [in h nach Injektion]	OHT Konzentration	Resultate	
		Anzahl der analysierten Embryonen (Stadium)	Integration via loxP
8 → 47 (gesamt: 39 h)	1 μ M	14 (2-4 Zell)	1
8 → 23 (15 h)	1 μ M	26 (2-4 Zell) 9 (Morula)	2 0
4 → 8 (4 h)	1 μ M	41 (2-4 Zell)	1
4 → 12 (8 h)	1 μ M	27 (2-4 Zell) 3 (6-8 Zell) 15 (Morula)	0 0 1
4 → 10 (6 h)	1 μ M	33 (2-4 Zell) 15 (6-8 Zell) 62 (Morula) 14 (Blasto)	3 0 0 0

Tab 5.4. Tamoxifen-Induzierbarkeit des Cre vermittelten Kassettenaustausches. Detektion der Integrationshäufigkeit (via loxP) unter Verwendung einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase (pSV40-CreER^{T2}). Die injizierten Plasmidkonzentrationen waren: pCMV β I 930 Kopien/pl, pSV40-CreER^{T2} 1000 Kopien/pl.

5.1.8 Kurzzusammenfassung des 1. Ergebnisteils und weiterführende Überlegungen zur Stabilität Rekombinase vermittelter Austauschprodukte

Zusammenfassend ließ sich sagen, daß CMCE in frühen Embryonen möglich ist, aber diese Integrationsereignisse nachfolgenden exzisivem Vorgängen unterworfen sind. Alle methodischen Ansätze, diese erste Integration zu stabilisieren, führten nicht zum gewünschten Erfolg. Die molekulare Grundlage der Instabilität des Transgens lag in der promiskuitiven Rekombination der heterospezifischen lox-Stellen (lox511 und loxP). Dieses schien daher ein intrinsisches Problem des Ansatzes darzustellen, welcher auf der Exklusivität der verwendeten lox-Stellen aufgebaut war. Theoretisch könnte durch Einführung zusätzlicher Mutationen eine Steigerung der Exklusivität erreicht werden (Kolb, 2001; Langer et al., 2002), doch konnte ebenso gezeigt werden, daß unter bestimmten Bedingungen auch sehr unterschiedliche lox-Stellen miteinander rekombiniert werden können (Lee & Saito, 1998; Siegel et al., 2001; Mlynarova et al., 2002). Ein anderer Aspekt bei der Verwendung heterospezifischer Erkennungsstellen ist, daß die Effizienz der Rekombination mit Einführung von Mutationen in die lox-Sequenz abnehmen kann (Lee & Saito, (1998), Tab. 5.1). Daher war es grundsätzlich fraglich, ob man mit einer Sequenz-spezifischen Rekombinase, welche auf beiden Seiten des Transgens angreift, eine erfolgreiche und stabile Integration erzielen kann. Aus diesen Überlegungen ergab sich, daß eine exzisive Rekombination nur dann effektiv verhindert werden kann, wenn die SSR-Erkennungsstellen auf der 5' und 3' Seite des zu austauschenden Segments zu unterschiedlichen Rekombinationssystemen gehören und nur von den jeweiligen Rekombinasen erkannt werden. Ein solches System soll in Teil II des Ergebnisteils dieser Arbeit präsentiert werden.

5.2 Ergebnisteil II

5.2.1 Grundschemata eines erweiterten RMCE-Ansatzes

Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt war das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit eine verbesserte RMCE-Methode durch Steigerung der Exklusivität der 5'- und 3'-Rekombinase-Erkennungsstellen. Dies sollte durch den parallelen Einsatz zweier mechanistisch unabhängiger Rekombinationssysteme erfolgen. Dazu wurde neben dem Cre/loxP-System aus dem Bakteriophagen P1 das Flp/FRT-System aus *S.cerevisiae* eingesetzt. Cre/lox-Rekombination würde hierbei die 5' Seite des Transgens, Flp/FRT-Rekombination die 3' Seite rekombinieren. Eine Interaktion der Rekombinationssysteme kann bei einem solchen Ansatz ausgeschlossen werden, weswegen exzessive Vorgänge nicht auftreten sollten. Das Grundschemata der Reaktion ist in Abbildung 5.7 gezeigt. Ausgangspunkt für den RMCE ist eine in das Genom integrierte, von loxP und FRT flankierte Sequenz A. Durch Transfektion mit Cre-Rekombinase, Flp-Rekombinase und dem Austauschplasmid, welches eine von loxP und FRT flankierte Sequenz B enthält, kann der Kassettenaustausch in Gang gesetzt werden. Zuerst rekombiniert Cre die beiden loxP-Stellen miteinander und integriert das gesamte Austauschplasmid in das Genom. Es entsteht ein intermediäres Cointegrat. Sollte erneut Cre dieses Zwischenprodukt angreifen, so resultiert die Ausgangsform, welche in einen neuen Reaktionszyklus eintreten kann. Greift Flp-Rekombinase am Cointegrat an, so wird der Plasmidteil und Segment A herausgeschnitten und das Endprodukt entsteht. Es findet ein Netto-Austausch von Sequenz A gegen B statt. Das resultierende Plasmid mit Sequenz A, welches als Nebenprodukt entsteht, kann in eukaryotischen Zellen nicht replizieren und geht während der folgenden Zellteilungen verloren.

Da dieser Ansatz die beiden SSR-Erkennungsstellen **FRT** und **loxP** verwendet, wurde die Methodik „*Froxing*“ getauft. Eine von FRT und loxP flankierte Sequenz wird von nun an als „gefroxte“ Sequenz bezeichnet.

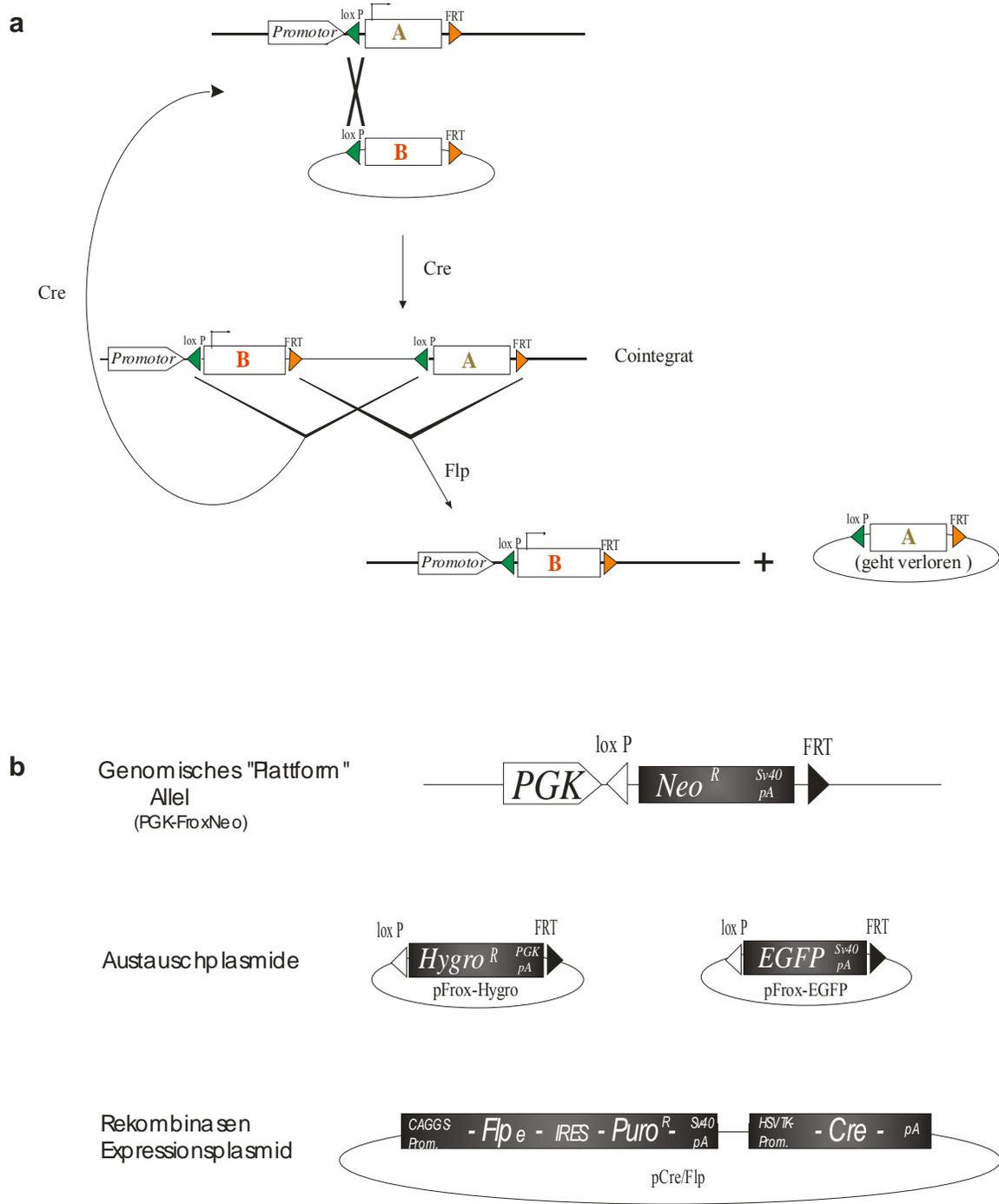


Abb. 5.7. (a) Schematische Darstellung des erweiterten RMCE-Ansatzes. Das Genom ist durch eine dicke schwarze Linie repräsentiert, während dünne schwarze Linien Plasmid-Sequenzen darstellen. Im Genom befindet sich Sequenz A, welche durch die auf dem Austauschplasmid liegende Sequenz B ersetzt werden soll. Der gewählte experimentelle Ansatz entspricht einem „Promoter-Rescue“: Das Austauschplasmid ist promotorlos und kann nur nach erfolgter Rekombination unter den Einfluß des im Genom residierenden Promotors gelangen. Somit wird nach eventueller Zufallsintegrationen Sequenz B nicht exprimiert (sofern keine Zufallsintegration in einen transkriptionell aktiven Bereich auftritt). **(b)** Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Frox-Konstrukte.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, liegt das Temperaturoptimum des Hefeenzym Flp bei 30 °C. Buchholz et al. (1998) entwickelten durch Mutagenese der Flp-kodierenden Sequenz eine thermostabile Variante des Enzyms. Dieses als Flpe publizierte Enzym wurde hier ausnahmslos verwendet (die Begriffe Flp und Flpe werden in dieser Arbeit synonym verwendet). Ebenfalls von Bedeutung ist die Tatsache, daß die native Hefe-FRT-Sequenz 48 bp lang ist. Diese kann allerdings auf 34 bp reduziert werden, was zur Folge hat, daß mit dieser minimalen FRT-Stelle nur exzidiert, nicht aber integriert werden kann (Jayaram, 1985). In dieser Arbeit wurde die 34 bp-Variante verwendet um möglichst wenige zusätzliche Basenpaare ins Genom einführen zu müssen. Dies könnte bei der späteren Anwendung der Methodik in regulatorischen Bereichen von Vorteil sein.

5.2.2 Das Expressionsplasmid

Froxing basiert auf der gleichzeitigen Präsenz von Cre, Flp und Austauschplasmid. Wenn alle drei Komponenten von eigenen Plasmiden kodiert würden, müßte bei Anwendungen in der Zellkultur eine Tripeltransfektion erreicht werden. Bei schwer zu transfizierenden Zellen, wie z.B. ES Zellen, stellt dies ein Hindernis dar. Um die Transfektionsrate und daher die Effizienz der Methode zu erhöhen, wurde ein Plasmid konstruiert (pCre/Flp, siehe Abb. 5.7b und Appendix), welches beide Rekombinasen exprimiert. Dadurch wurde sicher gestellt, daß beide SSR simultan in der Zelle präsent sind. Zudem war Flp hier unter der Kontrolle eines stärkeren Promotors (CAGGS-Promoter) als Cre (HSV-Tk-Promoter) (Araki et al., 1997b). Dadurch sollte ein höheres Expressionsniveau für Flp erreicht werden, da Flp in Säugerzellen eine geringere Aktivität als Cre besitzt (Andreas et al., 2002; Schaft et al., 2001). Zum Testen der Funktionalität des Expressionsplasmides wurde der in Abbildung 5.8 gezeigte Versuch durchgeführt. Ein Reporterplasmid für Cre bzw. für Flp-Rekombination wurde zusammen mit pCre/Flp in HEK 293T Zellen transfiziert. Diese Säugerzelllinie wurde gewählt, da sie leicht zu transfizieren ist. Als Positivkontrolle wurden die Cre- oder Flp-Expressionsplasmide verwendet, welche zur Herstellung von pCre/Flp dienten.

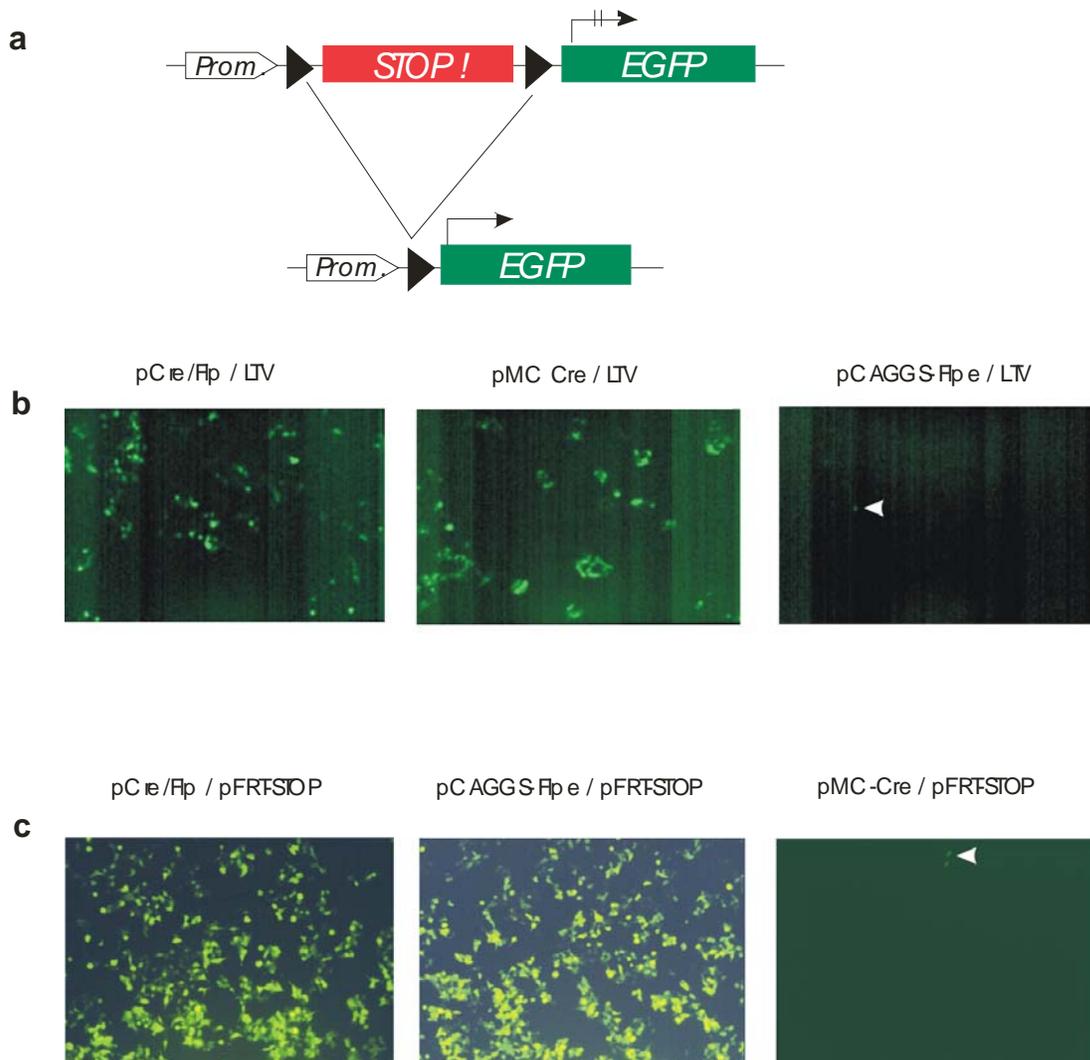


Abb. 5.8. Funktionalitätstest des klonierten dualen Expressionplasmides pCre/Flp. (a) Schematische Darstellung des Reporterplasmides vor und nach sequenz-spezifischer Rekombination. Eine transkriptionelle Stop-Kassette ist flankiert von loxP (Plasmid LTV in (b)) oder FRT-Stellen (Plasmid pFRT-STOP in (c)) (loxP und FRT sind als schwarze Dreiecke dargestellt). Dadurch kann das stromabwärts liegende EGFP nicht exprimiert werden. Durch Rekombination wird die Stop-Kassette entfernt und EGFP kann exprimiert werden. (b) und (c) EGFP-Fluoreszenzanalyse der transfizierten HEK 293 Zellen. (b) Cre-Funktionalitätstest. LTV = Cre-Reporterplasmid, pMC-Cre = Cre-Expressionsplasmid als Positivkontrolle (c) Flp-Funktionalitätstest. pFRT-STOP = Flp-Reporterplasmid, pCAGGS-Flpe = Flp-Expressionsplasmid als Positivkontrolle. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle das Reporterplasmid mit der jeweils „falschen“ Rekombinase cotransfiziert ((b) und (c) rechts außen). Dies verdeutlicht den unspezifischen Hintergrund, der durch Autofluoreszenz oder transkriptionelles Überlesen der Stop-Kassette bedingt ist. Wie ganz rechts zu sehen ist (weiße Pfeilköpfe), war dieser Hintergrund minimal.

5.2.3 „Transienter“ Frox-Assay

Um zu testen, ob der in Abbildung 5.7a dargestellte Frox-Mechanismus prinzipiell möglich ist und ob die beiden Rekombinasen zusammen an einem DNA-Molekül enzymatisch aktiv sein können (und sich z.B. nicht sterisch behindern), wurde eine vereinfachte Frox-Reaktion in HEK 293 Zellen durchgeführt. Dazu wurden zwei Frox-Plasmide (pPGK-FroxNeo, pFrox-EGFP) und pCre/Flp in 293 Zellen cotransfiziert (Abb. 5.9). Eine korrekte Frox-Reaktion sollte die Neo- gegen die EGFP-kodierende Sequenz austauschen. Bei diesem Ansatz waren alle Komponenten transient vorhanden und nicht im Genom verankert. Als erstes wurde untersucht, ob sich die entstehenden vier neuen Rekombinationsübergänge nachweisen lassen. Wie in Abbildung 5.9 zu sehen ist, konnten alle vier nach korrekter Rekombination entstehenden Übergänge detektiert werden.

Die PCR-Detektion der Rekombinationsübergänge wurde auf einem Gemisch von Plasmiden durchgeführt. Daher ließ sich zu diesem Zeitpunkt noch keine Aussage darüber machen, ob man wirklich auf einem einzigen Plasmid-Molekül beide Frox-Rekombinationsübergänge finden kann. Zu diesem Zweck wurde der Plasmid-Pool in Bakterien transformiert und einzelne Bakterienklone analysiert. Wie in Abbildung 5.10 zu erkennen ist, ließ sich durch Restriktionsverdau ein korrektes Rekombinationsprodukt (pFrox-Neo) nachweisen. Damit konnte belegt werden, daß der Frox-Mechanismus erfolgreich durchlaufen werden kann und die beiden SSR nicht negativ interagieren.

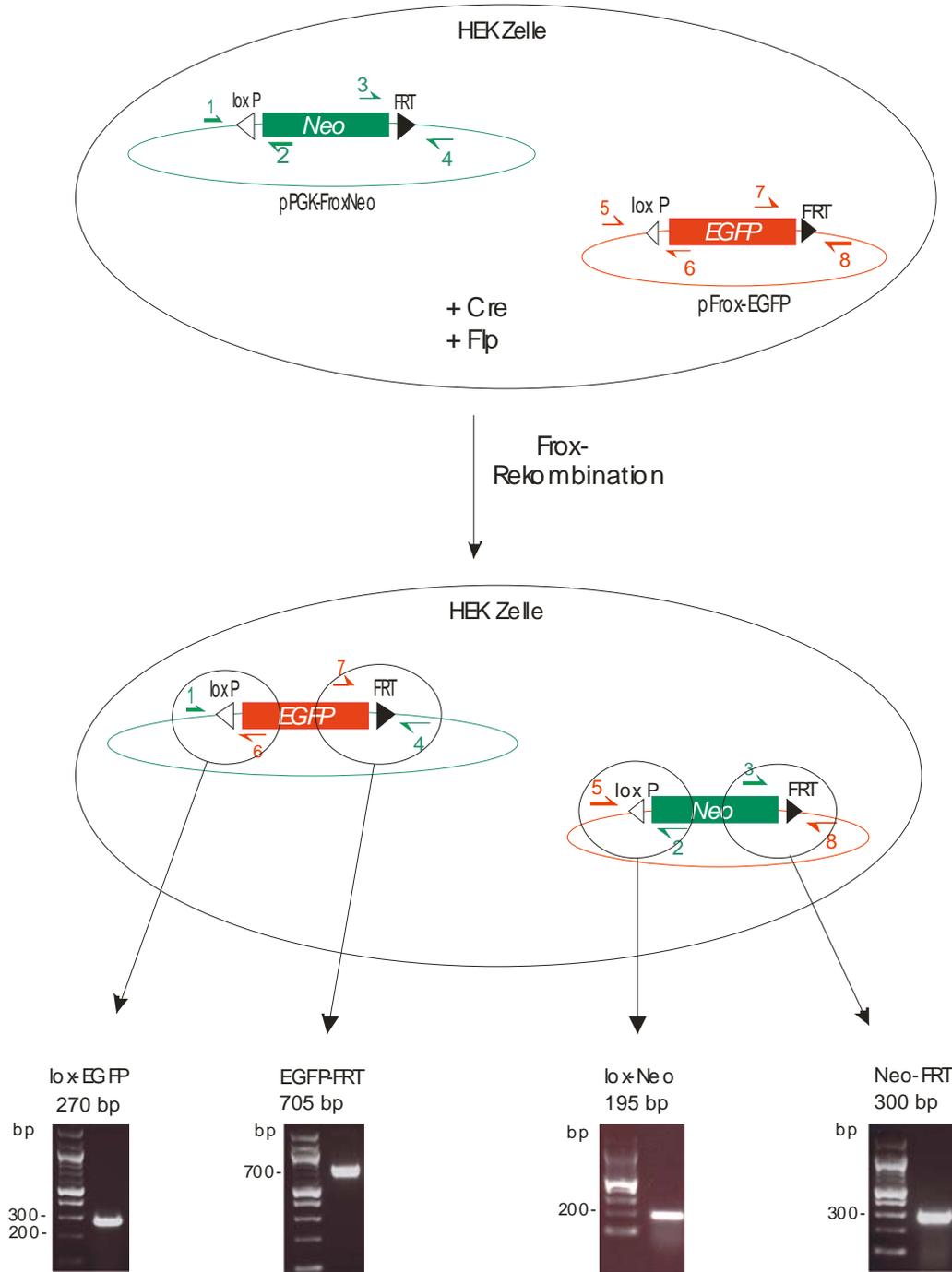


Abb. 5.9. Nachweis der Rekombinationsübergänge nach transienter Frox-Reaktion. HEK 293 Zellen wurden mit pPGK-FroxNeo (grün), pFrox-EGFP (rot) und pCre/Flp transfiziert. Anschließend wurden Plasmide durch HIRT-Extraktion isoliert und die Übergänge per PCR nachgewiesen. Die PCR-Produkte konnten durch die Wahl der Primer (grüne und rote Pfeile) nur nach erfolgreicher Rekombination entstehen. Zusätzlich wurden alle PCR-Produkte sequenziert. Verwendete Primer: 1=PGK1, 2=Tn5anti, 3=SV40pA1, 4=Gal18, 5=T3, 6=EGFP2, 7=EGFP4, 8=T7.

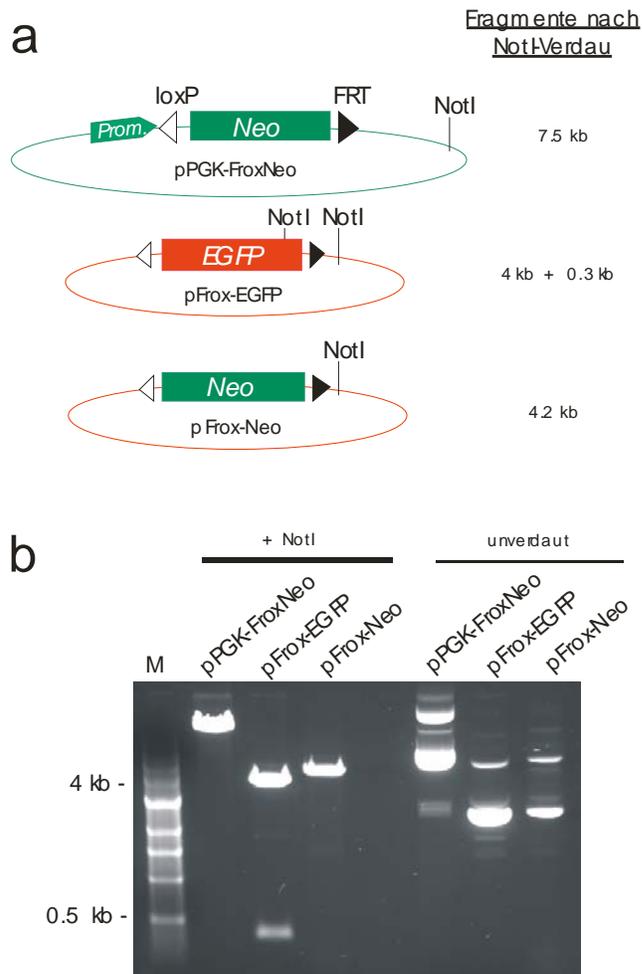


Abb. 5.10. Nachweis der beidseitigen Vollständigkeit des Frox-Reaktionsproduktes.

(a) Oben sind die beiden Ursprungsplasmide (pPGK-FroxNeo (grün) und pFrox-EGFP (rot)) zu sehen, darunter das resultierende Rekombinationsprodukt pFrox-Neo. Neben den Plasmiden ist die jeweilige Fragmentlänge nach NotI-Verdau angezeigt.

(b) Restriktionsanalyse der drei Plasmide nach NotI-Verdau. Man erkennt deutlich das erwartete Bandenmuster des korrekten Rekombinationsproduktes, welches nur nach vollständiger Rekombination auf beiden Seiten auftreten kann.

5.2.4 Exklusivität der verwendeten Erkennungssequenzen

Der Vorteil der Frox-Methode gegenüber der vorherigen Anwendung heterospezifischer Erkennungsstellen liegt in der strikten Exklusivität der loxP- und FRT-Stellen. Obwohl diese Exklusivität anhand der vollständig unterschiedlichen Sequenzen vorhergesagt werden könnte, sollen hier dennoch zwei Experimente gezeigt werden, welche dies belegen. Im ersten Experiment wurden ES Zellen, welche im Genom ein gefroxtes Neo-

Gen tragen mit EGFP-Austauschplasmid (pFrox-EGFP, siehe Abb 5.7) und pCre/Flp transfiziert. Per PCR wurde nach exziserer Rekombination gesucht. Wie in Abbildung 5.11 zu sehen ist, kann man sowohl den Neo- als auch den EGFP-Übergang detektieren, nicht aber eine Exzision. Das integrierte Allel ist nur schwach zu erkennen, da ein Großteil der Zellen untransfiziert bleibt. Da das exzidierte Allel aber um einiges kleiner als das integrierte ist und daher effektiver amplifiziert werden sollte, müßte das PCR-Produkt der Exzision mindestens die Intensität der EGFP-Integrationsbande aufweisen. Man kann jedoch in der Höhe von 400-500 bp keine Bande erkennen, was auf die Abwesenheit einer exzisenen Reaktion hinweist.

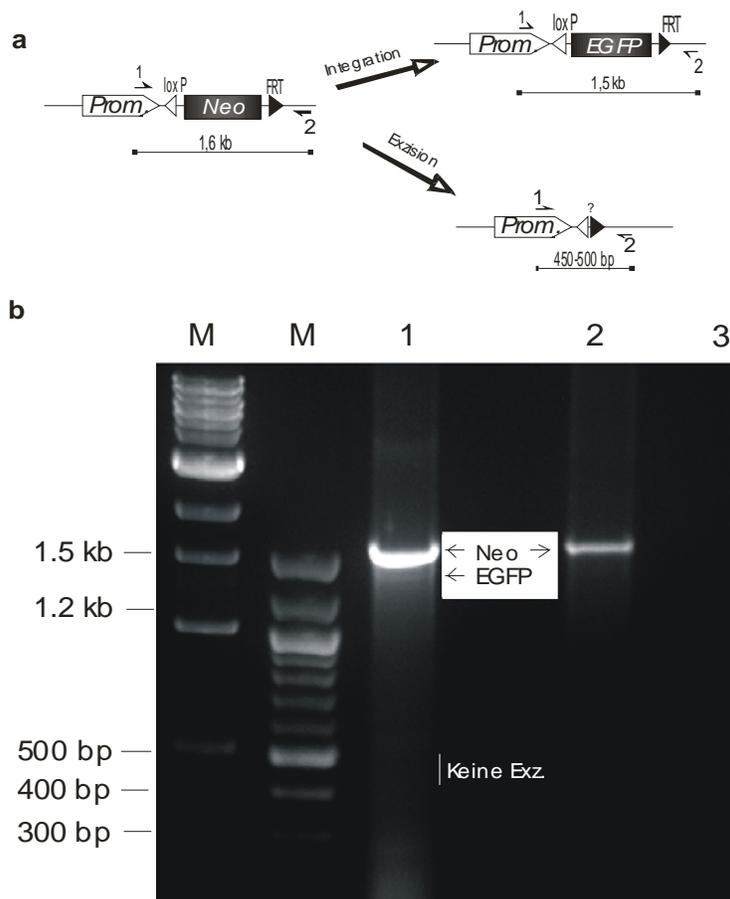


Abb. 5.11. Exzision gegenüber integrativer Rekombination.

(a) Schematische Darstellung der Grundsituation mit im Genom integriertem, gefroxtem Neo-Gen. Durch Transfektion mit pFrox-EGFP und pCre/Flp kann es entweder zur sequenzspezifischen Integration (oben) oder zur Exzision kommen (unten). Angemerkt werden muß, daß der Großteil der Ursprungszellen nicht transfiziert wird. Dies erklärt die Intensitätsunterschiede der Neo- und EGFP-Banden in (b). Die Lage der Primer ist durch schwarze Pfeile verdeutlicht. Die Länge des PCR-Produkts der Exzision ist nicht exakt bekannt, müßte aber bei ca. 430-470 bp liegen.

(b) PCR-Analyse der Rekombinationsvorgänge. M = Marker, 1 = PGK-FroxNeo ES-Zellen nach Transfektion mit pFrox-EGFP und pCre/Flp, 2 = nichttransfizierte PGK-FroxNeo ES-Zellen, 3 = PCR-Negativkontrolle ohne DNA. Verwendete Primer: 1=PGK1, 2=Gal18.

Der zweite Versuch, welcher die Inkompatibilität der beiden Erkennungsstellen demonstrieren sollte, wurde histologisch durchgeführt. Es wurden die gleichen ES Zellen wie im vorigen Versuch verwendet. Diese tragen im Genom integriert ein gefroxtes Neo-Gen, welches als STOP-Kassette für ein stromaufwärts liegendes lacZ-Gens fungiert. Sollte eine exzusive Rekombination nach Transfektion mit Cre und Flp stattfinden, so könnte das lacZ-Gen exprimiert werden und diese Zellen würden bei X-Gal-Färbung blau erscheinen. Wie in Abbildung 5.12 zu sehen ist, konnten nur Zellen, welche das Konstrukt mit homospezifischen loxP-Stellen trugen, blau gefärbt werden. Die gefroxte STOP-Kassette wurde nicht exzidiert, erkennbar durch die nicht gefärbten Zellen.

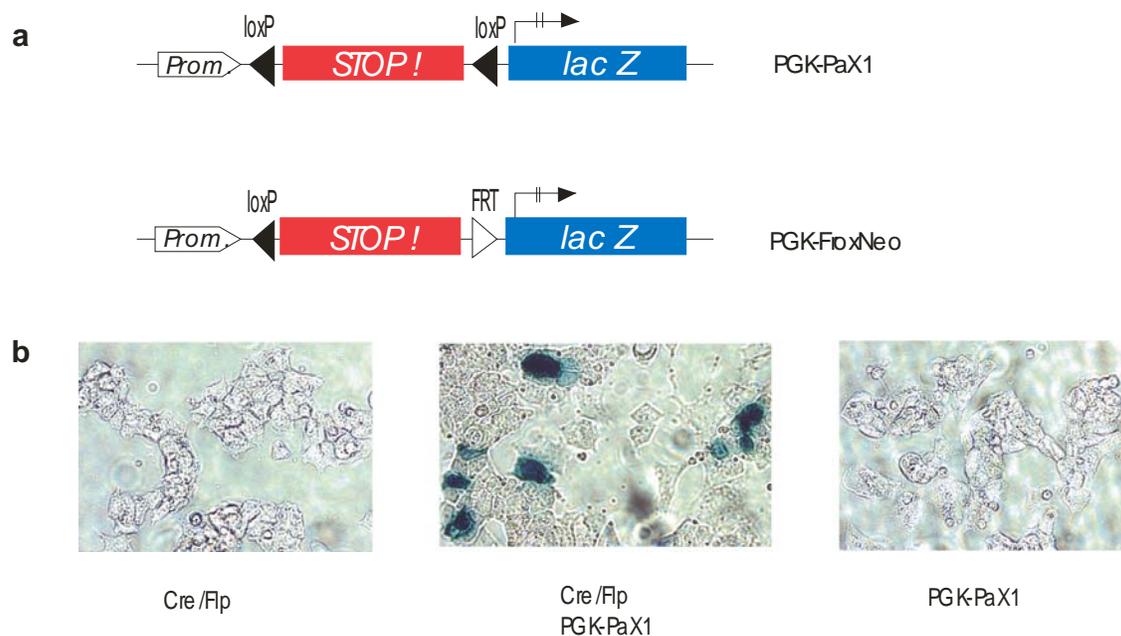


Abb. 5.12. Exklusivität der Erkennungsstellen. (a) Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Oben gezeigt ist das Plasmid zur Positivkontrolle, darunter das gefroxte genomische Konstrukt. (b) X-Gal-Färbung transfizierter Stammzellen. Links: PGK-FroxNeo ES Zellen mit pCre/Flp transfiziert. Mitte: PGK-FroxNeo ES Zellen mit pCre/Flp und pPGK-PaX1 transfiziert (Positivkontrolle). Rechts: PGK-FroxNeo ES Zellen mit pPGK-PaX1 transfiziert (Negativkontrolle).

Die Tatsache, daß loxP und FRT invertiert zueinander dargestellt sind, ist nicht von Bedeutung. Da in der Spacerregion von loxP und FRT keine Sequenzhomologien bestehen, kann man die Orientierung der Erkennungsstellen zueinander nicht als invertiert oder repetitiv festlegen.

Zusammenfassend ließ sich sagen, daß loxP und FRT als inkompatibel angesehen werden konnten, eine wichtige Grundlage für weitere Experimente.

5.2.5 Froxing in ES-Zellen unter Selektionsdruck

Zur Evaluation der Effektivität der Austauschreaktion in ES Zellen wurde zunächst ein experimenteller Ansatz gewählt, welcher eine Selektion für das putative Endprodukt zuließ. Dazu wurden ES Zellen, welche eine Einzelkopie des PGK-FroxNeo-Konstruktes trugen, mit dem Rekombinase-Expressionsplasmid pCre/Flp und dem Austauschplasmid pFrox-Hygro (siehe Abb. 5.7) transfiziert. Um sicherzustellen, daß der zu etablierende RMCE-Ansatz genomweit einsetzbar ist, wurden drei unterschiedliche, aber nicht näher definierte, Integrationsorte (Locus A, B, C) des PGK-FroxNeo-Konstruktes für dieses Experiment benutzt.

Der gewählte Ansatz entsprach einem „Promotor-Rescue“: Das Austauschplasmid war promotorlos und sollte daher nur nach erfolgreicher Integration in den Frox-Locus exprimiert werden, was als Resultat Hygro-resistente Klone zur Folge hat. Die einzige Möglichkeit, wie eine Zufallsintegration bei einem solchen Versuchsansatz zu resistenten Klonen führen kann ist die zufällige Integration in einen transkriptionell aktiven Bereich, ein äußerst seltener Vorgang.

Der Ablauf der Austauschreaktion und ihr Nachweis ist in Abbildung 5.13 dargestellt. Charakteristisch für das Reaktionsprodukt ist die Anwesenheit des Hygro-Gens und die dazugehörigen Rekombinationsübergänge und die Abwesenheit der Neo-kodierenden Sequenz. Hygromycin B-resistente Klone wurden gepickt und auf diese Charakteristika hin analysiert. Die Häufigkeiten der Rekombinationsereignisse an allen drei Loci sind in Tabelle 5.5 zusammengefaßt. Insgesamt ergab sich eine Austauscheffizienz von 61 - 78 %. Bei diesen Klonen fanden sich beide neu entstandenen Rekombinationsübergänge. Die Gesamtanzahl der erhaltenen Klone unterschied sich jedoch bei den unterschiedlichen genomischen Loci. So wuchsen die meisten Klone bei Experimenten mit Locus A, die wenigsten bei Locus C, Locus B lag dazwischen.

Insgesamt zeigten 93 % der untersuchten Klone den richtigen lox-Übergang, 83 % davon trugen auch den korrekten FRT-Übergang. Die Klone, welche den lox-Hygro-Übergang, aber nicht den Hygro-FRT-Übergang trugen, waren Cointegrate (mosaische Klone in Tab. 5.5) und zeigten den Neo-FRT-Übergang (9 % der analysierten Klone). Dies ist in Übereinstimmung mit Schaft et al. (2001), wo gezeigt wurde, daß Flp/FRT-Rekombination in ES Zellen mosaisch ist.

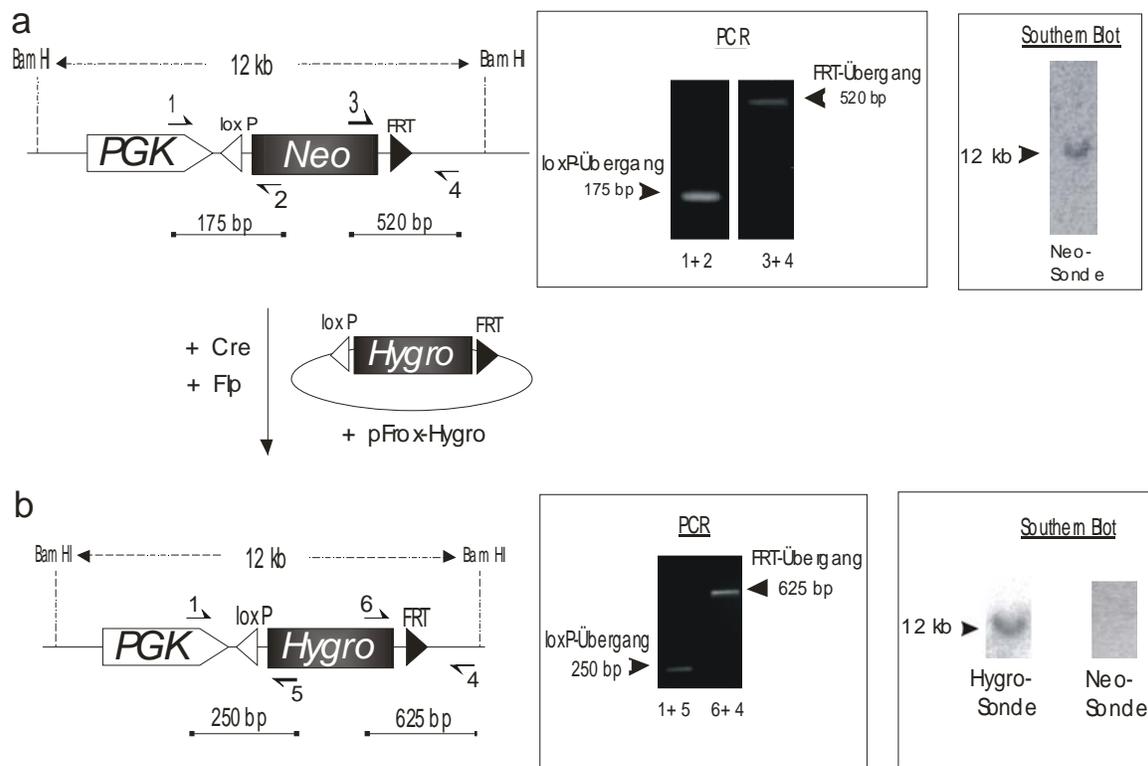


Abb. 5.13. Analyse der sequenz-spezifischen Austauschreaktion in ES Zellen unter Selektionsdruck. Nur Locus A ist gezeigt. **(a)** PGK-FroxNeo-Plattform Transgen. Die amplifizierten Rekombinationsübergänge sind auf der rechten Seite gezeigt. Im Southern Blot ist mit einer Neo-Sonde eine 12 kb Bande nach BamHI-Verdau zu erkennen. **(b)** PGK-FroxHygro Transgen nach erfolgreichem Frox-Austausch von Neo gegen Hygro. Die Charakteristika korrekt rekombinierter Klone sind rechts zu sehen: Anwesenheit von Hygro und den dazugehörigen Rekombinationsübergängen, Abwesenheit von Neo.

Verwendete Primer sind als Pfeile mit den jeweiligen Ziffern dargestellt: 1=PGK1, 2=Tn5anti, 3=SV40pA1, 4=Gal18, 5=Hygro3, 6=Tkneo1.

Genom. Locus	Exp.Nr.	Analysierte Klone gesamt	Klone mit korrektem lox-hygro Übergang	Klone mit korrektem hygro-FRT Übergang	Korrekte lox+FRT Übergänge gesamt (%)	Mosaische Klone ^a
A	I	39	39	38	38/39 (97)	4/39
	II	20	20	10	10/20 (50)	n.b.
					MW. 74 %	
B	I	13	13	13	13/13 (100)	1/13
	II	9	6	2	2/9 (22)	n.b.
					MW. 61 %	
C	I	4	4	4	4/4 (69)	0/4
	II	9	5	5	5/9 (56)	n.b.
					MW. 78 %	

Tab. 5.5. Quantifizierung der Rekombinationsresultate nach Austausch von Neo gegen Hygro und nachfolgender antibiotischer Selektion.

^a Klone, welche den Neo-FRT-Übergang zeigten. Die Anzahl der mosaischen Klone betrug 9 % (5/56). n.b., nicht bestimmt. MW = Mittelwert

Um die SSR-Abhängigkeit der Methode zu demonstrieren, wurden PGK-FroxNeo-Zellen mit pFrox-Hygro, aber nicht mit pCre/Flp, transfiziert. Keine einzige Kolonie wuchs nach Hygro-Selektion. Dies war der Fall für alle drei untersuchten Loci (n = 2 für jeden Locus). Für nachfolgende Experimente wurde nur Locus A untersucht.

5.2.6 Froxing in ES Zellen ohne Selektionsdruck

Die Integration eines nicht-selektierbaren Markers durch RMCE wurde zuvor als sehr ineffektiv beschrieben. So berichtet z.B. Soukharev et al. (1999) von einer Integrationsrate von 2 % der transfizierten ES Zellen. Hier wurden invertierte heterospezifische lox511 und loxP verwendet. Promiskuitive Rekombination zwischen den beiden lox-Stellen könnte dort zu exzisivem oder invertivem Vorgängen geführt

haben, wie dies bereits in Teil I dieser Arbeit beschrieben wurde. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Erkennungsstellen sollte dieses Problem umgehen.

Zur Evaluation dieser Hypothese wurden PGK-FroxNeo ES Zellen mit pCre/Flp und pFrox-EGFP (siehe Abb. 5.7) transfiziert. Durch korrektes RMCE wurde das im Genom residierende Neo gegen das promotorlose EGFP ausgetauscht, was an grün fluoreszierenden Zellen zu erkennen war (Abb. 5.14). Zur Quantifizierung dieses Prozesses wurden GFP-positive Zellen 6-8 Tage nach Transfektion durch Durchflußzytometrie gezählt. Wie in Abbildung 5.15 zu erkennen ist, zeigten untransfizierte PGK-FroxNeo Zellen keinerlei GFP-Fluoreszenz. Der Transfektionsansatz mit EGFP-Austauschplasmid und dem Rekombinasen-Expressionsplasmid besaß jedoch deutlich eine GFP-positive Fraktion. Insgesamt waren zwischen 0,13 und 0,24 % der gezählten Zellen GFP-positiv. Der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten war $0,17\% \pm 0,04\%$ GFP-positive Zellen. Da bei diesem Experiment der größte Teil der Zellen untransfiziert war, konnte die eigentliche Effizienz der Frox-Reaktion nur bei bekannter Transfektionseffizienz berechnet werden. Zu diesem Zweck wurden ES Zellen mit EGFP- und DsRed-Expressionsplasmiden transfiziert. Doppeltransfizierte Zellen wurden per Durchflußzytometer gezählt. Dies entsprach der Bedingung, daß man für Froxing zwei Plasmide in einer Zelle benötigt. Die ermittelte Cotransfektionseffizienz betrug $1,2\% \pm 0,2$ (nicht gezeigt, $n = 2$). Daher ergab sich, daß in 14,2 % der cotransfizierten Zellen eine Frox-Reaktion stattgefunden hatte. Durch kurze Puromycin-Behandlung, welche auf die Anwesenheit des pCre/Flp-Plasmids selektiert, konnte der Prozentsatz an GFP-positiven Zellen leicht angehoben werden ($1,4\% \pm 0,5\%$, Abb. 5.15).

Der Frox-Ansatz ohne Selektion ist, wie der im vorherigen Abschnitt beschriebene Ansatz mit Selektion, eindeutig Rekombinase-vermittelt: PGK-FroxNeo Zellen, welche mit pFrox-EGFP, aber nicht mit pCre/Flp transfiziert wurden, zeigten keine GFP-Fluoreszenz ($n = 2$, nicht gezeigt).

Zur Feststellung des Genotyps der grün leuchtenden Zellen wurden einzelne Kolonien gepickt und auf Rekombinationsereignisse hin untersucht (Abb. 5.14). Von 34 analysierten Klonen zeigten 33 eine vollständige Frox-Rekombination (97 %). Ein Klon besaß nur den Rekombinationsübergang von EGFP via loxP (3 %), nicht aber via FRT.

An dieser Stelle soll darauf aufmerksam gemacht werden, daß die verwendete Transgenstruktur, welche einem Promotor-Rescue entsprach, keinen Einfluß auf die Effizienz der Methode hat. Die Verwendung promotorloser Austauschplasmide hat keine Auswirkung auf den Mechanismus der sequenz-spezifischen Rekombination und daher sollte jede beliebige Kasette ausgetauscht werden können.

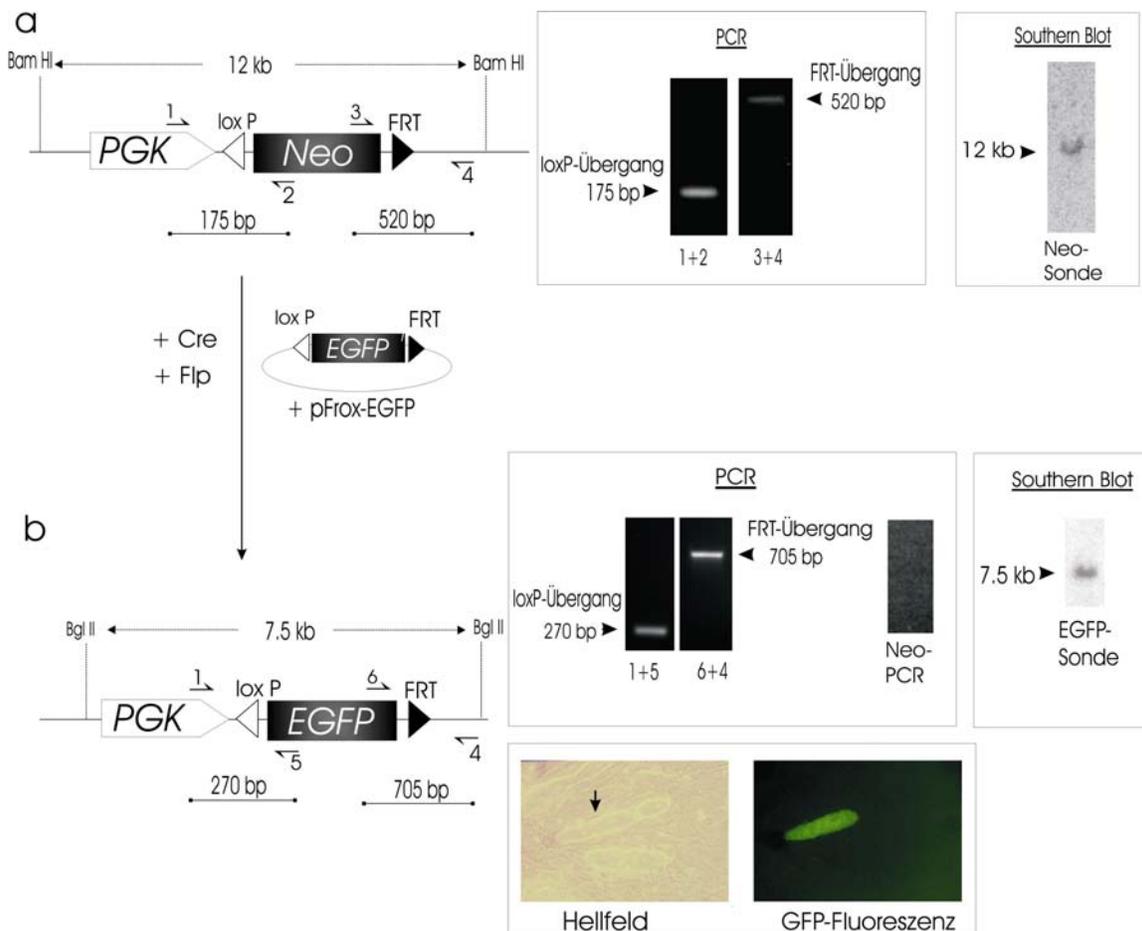


Abb. 5.14. Analyse der sequenz-spezifischen Austauschreaktion in ES Zellen ohne Selektionsdruck. (a) PGK-FroxNeo-Plattform Transgen. (b) PGK-FroxEGFP Transgen nach erfolgreichem Frox-Austausch von Neo gegen EGFP. Die Charakteristika korrekt rekombinierter Klone sind rechts zu sehen: Anwesenheit von EGFP und den dazugehörigen Rekombinationsübergängen, Abwesenheit von Neo. Rechts unten sind Frox-ES Zellklone auf embryonalen Feederzellen nach EGFP-Austausch zu sehen. Einer der Klone (markiert durch Pfeilkopf) zeigt deutliche GFP-Fluoreszenz. Verwendete Primer sind als Pfeile mit den jeweiligen Ziffern dargestellt: 1=PGK1, 2=Tn5anti, 3=SV40pA1, 4=Gal18, 5=EGFP2, 6=EGFP4. Nicht gezeigt sind die Primer zur Detektion der Abwesenheit von Neo (Primer Neo+ und Neo-).

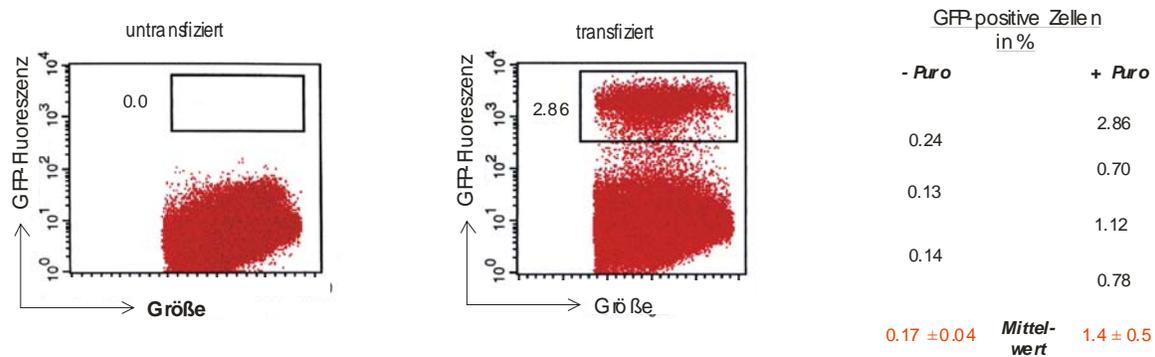


Abb. 5.15. Durchflußzytometrische Analyse sequenz-spezifischer EGFP-Integration in ES Zellen. Links, untransfizierte PGK-FroxNeo Zellen. Mitte, PGK-FroxNeo Zellen, welche mit pCre/Flp und pFrox-EGFP transfiziert wurden. Ein Experiment ist als Beispiel gezeigt. Das Gate wurde so definiert, daß nur lebende Zellen gezählt wurden. Rechts sind die Ergebnisse von mehreren unabhängigen Experimenten mit und ohne Puromycin-Behandlung gezeigt.

5.2.7 Kurzzusammenfassung des 2. Ergebnisteils

Die in Ergebnisteil I vorgestellte Methodik des Rekombinase vermittelten Kassettenaustausches unter Verwendung heterospezifischer lox511 und loxP Stellen sollte in Teil II dieser Arbeit mit Schwerpunkt auf einer Exklusivitätssteigerung der Erkennungsstellen weiterentwickelt werden. Dazu kam neben dem Cre/lox-System auf der 5'-Seite der Kasette das Flp/FRT-System auf der 3'-Seite zum Einsatz. Die vollständig unterschiedliche Sequenz der loxP und FRT Stellen verhinderte effektiv exzusive Vorgänge, welche durch intramolekulare Rekombination verursacht werden. In embryonalen Stammzellen, welche ein loxP/FRT-flankiertes Transgen im Genom integriert tragen, konnte durch Transfektion mit einem Cre- und Flp-Expressionsplasmid und einem loxP/FRT-tragenden Austauschplasmid eine hohe Rate an RMCE mit und ohne Selektion erreicht werden. Insbesondere die Ergebnisse ohne Selektionsdruck belegen die Effektivität der Methode und die Stabilität des integrierten Transgens.

6 Diskussion

Rekombinase vermittelter Kassettenaustausch erlaubt den seriellen Austausch von DNA-Segmenten an spezifischen genomischen Loci, wodurch sehr effizient allelische Serien produziert werden können. Methodisch kann dies auch durch die bereits in der Einleitung besprochenen Knock-In-, Double Replacement- oder Hit-and-Run-Verfahren erreicht werden. Der Nachteil dieser Ansätze ist jedoch, daß für jedes neu einzuführende Allel eine neue Runde homologer Rekombination durchgeführt werden muß. Bei der Herstellung zahlreicher mutanter Allele ist dies extrem arbeits- und zeitaufwendig. RMCE benötigt Gene Targeting nur im ersten Schritt, alle nachfolgenden Targetingschritte sind hingegen Rekombinase vermittelt. RMCE läßt sich sowohl in Zellkultur als auch in frühen Mausembryonen durchführen.

Wird RMCE in ES Zellen angewendet, so entfällt das Screenen von Hunderten von Zellklonen. Mit Froxing konnte eine Integrationseffizienz von 14-15 % ohne Selektion erreicht werden. Würde im Plattform-Allel ein gegenselektierbares Gen verwendet werden, so könnte diese Austauschhäufigkeit um ein Mehrfaches gesteigert werden. Da bei konventionellem Gene Targeting mit positiver und negativer Selektion typischerweise homologe Rekombinationshäufigkeiten von 0,1-10 % erreicht werden, müssen hier weit mehr Klone analysiert werden. Dies ist insbesondere bei schwer durch homologe Rekombination zu treffende Loci ein Hindernis.

Bei der Durchführung Rekombinase vermittelter Austauschreaktionen in frühen Mausembryonen ergibt sich durch die in dieser Arbeit vorgestellten Methodik zusätzliche Zeitersparnis. Ist eine mutante „Plattform“-Mauslinie bereits vorhanden, könnten gezielt mutierte Tiere innerhalb von 3-4 Wochen erhalten werden. Selbst bei der Anwendung neuer Verfahren, wie z.B. tetraploider Komplementation, müssen bereits korrekt rekombinierte ES-Klone vorhanden sein, um im gleichen Zeitraum eine heterozygote Linie zu erhalten. Die sehr arbeitsintensive Zellkultur zur Erzeugung korrekt rekombinierter ES-Klone dauert im Durchschnitt ca. 5-6 Wochen. Diese Phase entfielen bei der RMCE-Anwendung in Embryonen, was ein großer Vorteil bei der Etablierung zahlreicher mutanter Linien wäre.

Ein Nachteil eines RMCE-Ansatzes ist das Verbleiben von SSR-Erkennungssequenzen im Genom. Bei Cre/lox- und Flp/FRT-Rekombination beträgt die Länge jeder dieser heterologer Sequenzen 34 bp. Dies dürfte wahrscheinlich die untere Grenze für Anwendungen im Säuger genom darstellen, da unterhalb einer Minimallänge die Singularität heterolog eingeführter Erkennungsstellen nicht mehr gewährleistet ist. So gibt es in Säurgerenomen sogenannte Pseudolox-Stellen, die lox-Stellen aus dem P1 Phagen ähneln und als Rekombinationssubstrat dienen können, aber vermutlich nicht von ihnen abgeleitet sind (Thyagarajan et al., 2000). Die Sequenzierung bakterieller Genome wird in Zukunft mit Sicherheit weitere sequenz-spezifische Rekombinasen zu Tage fördern, doch wird eine gewisse Länge der Erkennungssequenzen Voraussetzung für eine ausreichende Spezifität sein. Obwohl es bisher keine Berichte über negative Einflüsse von loxP- oder FRT-Stellen auf Genexpression gibt, liegt hier der Vorteil auf Seiten der klassischen Verfahren (insbesondere Hit-and-Run- und Double Replacement), bei welchen ein Allel gänzlich ohne heterologe Sequenzen erzeugt werden kann.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit konnte die Methodik des Rekombinase vermittelten Kassettenaustausches von Zellkultur auf Mausembryonen übertragen werden. Es konnte demonstriert werden, daß Cre in frühen Embryonen exprimiert wird und in den Kern transloziert. Es konnte zudem gezeigt werden, daß Integrationsreaktionen nicht nur in Zellkultur, sondern auch in frühen Mausembryonen möglich sind. Die erreichten Integrationsraten lagen ohne Selektion bei ca. 15-20 %. Das Reaktionsprodukt war jedoch nicht stabil, sondern unterlag nachfolgenden exzisivem Vorgängen durch promiskuitive Rekombination der loxP/lox511-Stellen. Diese „Unspezifität“, also die Fähigkeit, heterologe lox-Sequenzen miteinander zu rekombinieren, ergibt sich wahrscheinlich aus der hohen Aktivität des Cre/lox-Systems. Da diese Nebenreaktion Integrationsprodukte verhindert oder entfernt, stellen die erreichten Integrationsraten eher die Untergrenze der CMCE-Effizienz dar.

Der erste Bericht über die Rekombinationseigenschaften von loxP und lox511 (Hoess et al., 1986) beschreibt eine fast einhundertprozentige Exklusivität der beiden Sequenzen. Neben jener Arbeit liegen dieser Doktorarbeit zwei weitere Publikationen über die Verwendung heterospezifischer lox-Stellen zugrunde (Bethke & Sauer (1997) und Lee &

Saito (1998)). In der letztgenannten Arbeit wurde durch in vitro Rekombination die Effektivität der loxP/lox511-Reaktion auf <10 % der loxP/loxP-Reaktion determiniert. Bei Bethke & Sauer (1997) wurde Promiskuität nicht untersucht. Zudem sind die experimentellen Systeme bei diesen drei Arbeiten unterschiedlich: Hoess et al. (1986) gewannen ihre Daten aus einem bakteriellen System, Lee & Saito (1998) aus in vitro Versuchen und Bethke & Sauer (1997) aus eukaryoten Zellen. Damit stellt sich die Frage der Übertragbarkeit der Daten von einem System auf das andere. Mittlerweile zeichnet sich ab, daß heterospezifische lox-Stellen in unterschiedlichen experimentellen Situationen durchaus effektiv einer promiskuitiven Rekombination unterliegen können (Siegel et al., 2001 (Bakterien); Kolb, 2001 (ES Zellen); Mlynarova et al., 2002 (Bakterien); Langer et al., 2002 (Bakterien und eukaryote Zellen)). In Bakterien konnten sogar invertiert zueinander liegende loxP-Sequenzen unter Exzision rekombiniert werden (Aranda et al., 2001). Dennoch soll hier erwähnt werden, daß auch Berichte über erfolgreichen Kassettenaustausch unter Verwendung heterospezifischer lox-Stellen in Zellkultur existieren (invertierte loxP/lox511: Soukharev et al., 1999 und Feng et al., 1999; doppelmutante lox2272/loxP: Kolb, 2001). Gleiches gilt für methodisch ähnliche Ansätze mit mutanten FRT-Stellen (Seibler & Bode, 1997; Seibler et al., 1998). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß loxP/lox511 eine gewisse Spezifität für ihresgleichen aufweisen, die ursprünglich beschriebene absolute Exklusivität jedoch nicht zutrifft. Ob ein erfolgreiches RMCE-Experiment mit dem in dieser Arbeit verwendeten loxP/lox511-Paar etabliert werden kann, hängt somit vermutlich von den experimentellen Randbedingungen ab: Wird auf das Endprodukt selektiert? In welchem Zelltyp und an welchem Genlocus findet die Reaktion statt? Wie stark und lange andauernd ist die Cre-Expression? In welcher Orientierung stehen die lox-Stellen zueinander? Welche Kombination von mutanten Erkennungsstellen wird gewählt? Diese Punkte sollen hier kurz diskutiert werden:

Selektion auf das Endprodukt: In nahezu allen RMCE-Experimenten in Zellkultur wurde eine Antibiotikaselektion auf das gewünschte Rekombinationsresultat durchgeführt (Bethke & Sauer, 1997; Seibler & Bode, 1997; Seibler et al., 1998; Soukharev et al., 1999; Feng et al., 1999; Kolb, 2001). Daher läßt sich aus diesen Daten nur schwer eine Vorhersage der Exklusivität der Erkennungssequenzen machen, da der Versuchsaufbau

nur korrekte Klone detektiert. In frühen Mausembryonen, in denen, wie in der Einleitung erwähnt, erfolgreiches RMCE sehr attraktive Möglichkeiten erschließen würde, kann im allgemeinen nicht selektiert werden. Daher werden in einem solchen System viele Reaktionsprodukte zu Tage treten, die unter Selektion in Zellkultur nicht detektiert würden. Dazu zählen, wie auch in dieser Arbeit gefunden, beispielsweise Produkte der Exzisionsreaktion. Ein solcher Klon würde unter selektiven Bedingungen absterben und nicht gezählt werden, in Embryonen jedoch würde ein solches Ereignis detektiert werden.

Zelltyp- und Genlocuseinfluß auf die Reaktion: Derzeitige Kenntnisse sprechen dafür, daß der Chromatinzustand eines Genlocus, also die Frage, ob sich das Chromatin in einem offenen (Euchromatin) oder geschlossenen (Heterochromatin) Zustand befindet, Einfluß auf die Effizienz der sequenz-spezifische Rekombination hat (Feng et al., 1999; Ringrose et al., 1999; Vooijs et al., 2001). Zudem bestehen Unterschiede im Ausmaß promiskuitiver Rekombination bei Bakterien und Säugerzellen (Langer et al., 2002), was ebenfalls durch unterschiedliche Genomstrukturen zu erklären wäre. Da die Chromatinstruktur früher Embryonen verschieden zu der adulter Zellen ist, lassen sich Ergebnisse aus der Zellkultur nicht unbedingt auf Embryonen extrapolieren. Allerdings fehlen Daten, ob das Genom eines frühen Mausembryos leichter einer SSR-Rekombination unterliegt als das Genom späterer Entwicklungsstadien und ob dort deshalb häufiger promiskuitive Rekombination beobachtet wird. Außer dem Zelltyp scheint zudem die direkte Umgebung der lox-Stellen Einfluß auf die Promiskuität zu besitzen. So berichten Mlynarova et al. (2002) von einer starken Steigerung der Promiskuität von lox511- und lox2272-Stellen in bezug auf loxP durch die Einführung benachbarter Palindromsequenzen.

Stärke und Länge der Cre-Expression: In dieser Arbeit wurde für die Vorkerninjektion ein Cre-Expressionsplasmid mit starkem Promotor verwendet. Dies hat zur Folge, daß Cre-Protein über einen längeren Zeitraum in großer Menge produziert wird. Dies trifft jedoch nicht für das Substrat der Rekombinase, das nicht replizierende Austauschplasmid, zu. Zellteilung im schnell wachsenden Embryo und vermutlich auch die Aktivität von Nukleasen verringern die Konzentration des nichtregenerativen Substrates und verschieben das Konzentrationsverhältnis auf die Seite der Rekombinase. Wie in den in vitro Experimenten gezeigt werden konnte, nimmt mit Abnahme der

Austauschplasmidkonzentration der Anteil exzisivier Vorgänge deutlich zu. Ähnliche Prozesse laufen vermutlich auch im Embryo ab.

Um diese Vorgänge zu verhindern, wurde hier zunächst von einem Ansatz Gebrauch gemacht, in welchem keine Cre-DNA, sondern das Protein injiziert wurde. Zuvor konnte demonstriert werden, daß das rekombinant hergestellte Enzym katalytisch aktiv war. Nach Mikroinjektion dieser Proteinlösung konnte jedoch keine enzymatische Aktivität in frühen Embryonen festgestellt werden. Folgende Faktoren könnten Gründe für den Verlust der Aktivität gewesen sein: 1.) Das Cre-Protein lagerte zu lange bei Raumtemperatur während der Injektionsprozedur und wurde dadurch instabil oder degradiert. 2.) Die Aktivität des aufgereinigten Proteins war zu niedrig. Ein möglicher Grund, weswegen man trotzdem *in vitro* Rekombination mit derselben Proteinlösung beobachten konnte war eventuell der eingefügte PCR-Amplifikationsschritt, welcher die Sensitivität an hob und weswegen man bereits geringe Aktivitäten nachweisen konnte.

Nach dem Scheitern der Proteininjektion wurde ein experimenteller Ansatz mit einem induzierbaren Cre-System gewählt. Dieses Vorgehen hätte nicht nur den Vorteil der kontrollierbaren Enzymaktivität, sondern auch den einer Plasmid-, und damit DNA-, Injektion gehabt. Die Cre-Aktivität konnte allerdings nur induziert, nicht terminiert werden, was darauf schließen läßt, daß die Affinität des Induktors sehr hoch oder die Halbwertszeit des Induktor-Enzym-Komplexes sehr lange sein muß.

Orientierung der lox-Stellen: Dies ist ein besonders kritischer Punkt, da das Produkt der Rekombination von der Orientierung der Erkennungsstellen abhängt. In dieser Arbeit wurden repetitive lox-Stellen verwendet, was zur Folge hat, daß eine promiskuitive Rekombination *in cis* ein exzidiertes Allel ergibt. Dieses Produkt, welches nur noch eine lox-Stelle trägt, ist aus thermodynamischen Gründen kein Substrat für eine Integration (Baer & Bode, 2001). Findet eine solche Exzision im frühen Embryo statt, kann daher in späteren Stadien, auch bei optimalen Konzentrationen von Cre und Austauschplasmid, keine Integration mehr erreicht werden. Bei der Verwendung invertierter lox511/loxP-Sequenzen wird durch promiskuitive Rekombination das Allel nicht ausgeschnitten, sondern lediglich invertiert. Auch wenn das invertierte Allel im Rahmen der spezifischen biologischen Fragestellung unerwünscht ist, geht es, anders als das rekombinierte Allel der Exzision, nicht verloren und kann in einer zweiten Reaktionsrunde in die

Ursprungsorientierung zurückgebracht werden. Beispiele für RMCE mit invertierten heterospezifischen Stellen in Zellkultur finden sich in Feng et al. (1999) und Soukharev et al. (1999). Wie zu erwarten finden sich bei einem solchen Ansatz Zellpopulationen, welche beide Orientierungen tragen (Feng et al., 1999; bei Soukharev et al. (1999) wurde auf die richtige Orientierung selektiert).

Bei der Anwendung invertierter Sequenzen in Mausembryonen würde man aller Wahrscheinlichkeit nach ein mosaikartiges Tier erhalten, dessen Zellen entweder die eine oder andere Orientierungen des Transgens tragen. Sind beide Produkte in Keimbahnzellen vorhanden, läßt sich durch Zucht eine Separation der unterschiedlichen Allele erreichen und die gewünschte Mausmutante etablieren. Da dies einen zusätzlichen Verpaarungsschritt bedeutet, wurde dieser Weg hier nicht besprochen. Unter Berücksichtigung der Daten über promiskuitive Rekombination der verwendeten repetitiven heterospezifischen lox-Stellen könnte ein solcher Ansatz jedoch erfolgversprechend sein.

Die Kombination der SSR-Erkennungssequenzen: Wie bereits vielfach in dieser Arbeit vorgestellt, spielt die Wahl der Erkennungssequenzen die entscheidende Rolle bei der Durchführung eines RMCE. Aus dem bisher Diskutierten ergibt sich, daß einzelmutante heterospezifische lox-Stellen, wenn überhaupt, nur in invertierter Orientierung verwendet werden sollten. Eine Weiterentwicklung der einzelmutanten lox-Stellen sind bestimmte doppelmutante Sequenzen (lox2272), welche eine höhere (Kolb, 2001), wenn auch nicht absolute (Mlynarova et al., 2002), Exklusivität aufzeigen.

Alle bisher besprochenen Mutationen der lox-Sequenzen sind auf die Spacerregion beschränkt. Es kann jedoch auch eine gesteigerte Exklusivität der Stellen erreicht werden, indem die Sequenz der Inverted Repeats verändert wird (Araki et al., 1997a; Zhang & Lutz, 2002): Lox-Stellen, welche im linken Inverted Repeat Punktmutationen tragen („LE“, left element, lox71, 5 Punktmutationen im Vergleich zu loxP), können mit lox-Stellen, welche Mutationen im rechten Inverted Repeat tragen („RE“, right element, lox66, 5 Punktmutationen) rekombinieren und ergeben eine in beiden Wiederholungsteilen mutante lox-Sequenz („LE + RE“, 10 Punktmutationen). Da die Inverted Repeat Strukturen die Bindestellen für Cre darstellen, kann diese doppelseitig mutante lox-Stelle nicht mehr rekombiniert werden. Diese Methodik konnte von Araki et

al. (2002) in einen Kassettenaustausch eingebunden werden. Dort konnte in ES Zellen effektiver RMCE erreicht werden, indem auf der 5'-Seite der Kassette das lox71/lox66- und auf der 3'-Seite das lox2272/lox2272-System zum Einsatz kam. Dieser Ansatz fand unter Selektion statt. Ob sich diese vielversprechende Kombination von unterschiedlichsten lox-Stellen als wirklich exklusiv herausstellt, kann noch nicht beantwortet werden, denn ein intrinsisches Problem des Ansatzes bleibt bestehen: Eine einzige Rekombinase greift auf beiden Seiten der Kassette an und kann somit, zumindest theoretisch, bei hohem Expressionsniveau oder unter bestimmten, durch das Experiment vorgegebenen, Bedingungen eine intramolekulare Reaktion herbeiführen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde daher eine neue Methodik erarbeitet, welche nicht auf putative promiskuitive Rekombination Rücksicht nehmen muß. Der Grund ist die Verwendung von zwei getrennten Rekombinationssystemen auf der 5'- und 3'- Seite des Transgens (Lauth et al, 2002). Mit diesem System konnten in unselektierten ES Zellen höhere Integrationsraten (14-15 %) als mit invertierten lox511/loxP erreicht werden (2 %, Soukharev et al. (1999)). Dies ist umso erstaunlicher, wenn man bedenkt, daß im Frox-System zwei jeweils nicht einhundertprozentig arbeitende Rekombinationssysteme interagieren müssen. Ein Vorteil ist mit Sicherheit, daß im hier vorgestellten Ansatz die nativen loxP und FRT Sequenzen eingesetzt wurden. Im ersten Teil der Arbeit sowie in Lee & Saito (1998) konnte demonstriert werden, daß lox511 x lox511-Rekombination weniger effektiv als loxP x loxP-Rekombination ist.

Bei der Verwendung zweier unabhängiger Rekombinationssysteme läßt sich keine Orientierung der Stellen zueinander festmachen, die Austausch Kassette kann nur in einer Orientierung integriert werden und eine Inversion ist nicht möglich. Die Exklusivität der beiden Erkennungssequenzen (loxP/FRT) konnte in der vorliegenden Arbeit belegt und die Anwendbarkeit der Methodik demonstriert werden. Bei einer Anwendung in frühen Mausembryonen könnte in bezug auf die Orientierung des Transgens sofort ein einheitliches Gründertier erhalten werden.

Die hier verwendete 34 bp lange FRT-Stelle besitzt den Nachteil, daß über sie keine Integrationsreaktionen stattfinden können. Alle Frox-Austauschreaktionen müssen daher über Cre/loxP-Rekombination initiiert werden. Daher wäre der Einsatz einer 48 bp wildtyp FRT-Version unter Umständen effektiver, da dann auch über Flp/FRT-

Rekombination Integrationsreaktionen stattfinden könnten (Jayaram, 1985). Im Hinblick auf die Einführung heterologer Sequenzen in das Genom, insbesondere in regulatorische Bereiche, ist die Verwendung der kurzen FRT-Form jedoch positiv zu bewerten und der langen Form vorzuziehen.

Ein weiteres Rekombinationssystem, welches z.B. an Stelle des Flp/FRT-Systems zusammen mit dem Cre/lox-System zum Einsatz kommen könnte, ist das Integrase-System des Bakteriophagen ϕ C31 (Kuhstoss & Rao, 1991). Dieser Streptomyces infizierende Phage rekombiniert phageneigene attP-Sequenzen mit wirtseigenen attB-Stellen zu attR- und attL-Stellen. AttR und attL benötigen zur Rekombination eine bisher noch nicht bekannte Exzisionase, weswegen die Rückreaktion ausgeschlossen und das Integrationsprodukt stabil ist. Die minimale Länge für eine attB-Stelle wurde auf 34 bp, die einer attP-Stelle auf 39 bp determiniert (Groth et al., 2000) und es konnte gezeigt werden, daß ϕ C31-Integrase in eukaryoten Zellen (Groth et al., 2000; Thyagarajan et al., 2001; Andreas et al., 2002) und in vivo (Olivares et al., 2002) anwendbar ist. Durch die Fusion einer Kernlokalisationssequenz (NLS) an das C-terminale Ende der Integrase erreichten Andreas et al. (2002) eine Rekombinationseffizienz von 87 % der NLS-Cre (100 %)-Effizienz. Dies war weit effektiver als NLS-Flpe-Rekombination (26 %). Somit könnte das Frox-System unter Umständen noch effektiver gestaltet werden, indem das Flp/FRT-System gegen das ϕ C31-System ausgetauscht würde. Die Kombination zweier Rekombinationssysteme ist für das Erreichen eines Kassettenaustausches zwingend notwendig, da bei der Verwendung nur einer SSR das gesamte Plasmid (inklusive Rückgratsequenzen) integriert würde.

Ein komplett neuer Weg, das Problem promiskuitiver Rekombination zu eliminieren, wurde von Buchholz & Stewart (2001) und Santoro & Schultz (2002) besprochen. Der Vollständigkeit wegen sollen diese Ansätze kurz erwähnt werden: Bei Buchholz & Stewart (2001) wurde eine zu loxP in 14 bp (komplette Spacer Sequenz plus jeweils 3 Mutationen in den Inverted Repeats) unterschiedliche lox-Sequenz vorgegeben (loxH) und die Cre-kodierende Sequenz durch Mutagenese evolviert. Damit konnte eine Cre-Variante erzeugt werden, welche sowohl loxP x loxP, als auch loxH x loxH Rekombination bewirken kann. Obwohl Promiskuität nicht explizit untersucht wurde ist

eine loxP x loxH Rekombination aufgrund der starken Sequenzunterschiede sehr unwahrscheinlich. Santoro & Schultz (2002) entwickelten durch in vitro Mutagenese eine Cre-Variante, welche eine in 6 bp mutante lox-Sequenz (je 3 Mutationen in den Inverted Repeats), sowie auch loxP x loxP rekombinieren kann. Solche in vitro Evolutionsansätze sind geeignet, gezielt „Designer-Rekombinasen“ für spezifische Fragestellungen zu entwerfen.

Für den Einsatz der Frox-Technologie speziell in frühen Mausembryonen sollen hier einige weiterführende Überlegungen vorgestellt werden. So könnten z.B. die beiden sequenz-spezifischen Rekombinasen im frühen Embryo stabil exprimiert werden. Die SSRs würden hierbei als gefroxtes Konstrukt mit den für die Expression in frühen Embryonen notwendigen regulatorischen Elementen in den Ziellocus eingebracht werden. Bei der Injektion des Austauschplasmides wären die Rekombinasen schon als Protein vorhanden und die Gefahr der Entstehung eines mosaischen Tieres wäre geringer. Durch korrekten RMCE würde die gefroxte SSR-Kassette eliminiert und die Expression beendet. Zudem könnte die zu injizierende DNA-Menge reduziert werden, was sich günstig auf das Überleben der Embryonen auswirken würde (Hogan et al., 1994). Allerdings muß hier erwähnt werden, daß Berichte über toxische Effekte von Cre in der Keimbahn existieren (Schmidt et al., 2000). Diese Toxizität, welche spekulativ auf alle SSR zutrifft, gibt daher Anlaß zur Vorsicht bei der Planung eines solchen Ansatzes.

Neben dem bisher Erwähnten könnten Verbesserungen der Methodik in Bezug auf die Anwendbarkeit bei „high-throughput“-Ansätzen in Erwägung gezogen werden. Hierzu könnte beispielsweise die Zona Pellucida der Embryonen entfernt und die DNA nicht mittels Mikroinjektion, sondern per Transfektion, eingebracht werden. Ein solcher Prozeß wäre leicht zu automatisieren.

Ein anderer Punkt behandelt die schnelle Herstellung homozygoter (-/-)-Mutanten. Zur Zeit existieren verschiedene Verfahren zur Etablierung homozygoter Allele: Der „klassische“ Weg beinhaltet die Generation heterozygoter Tiere und deren Verpaarung. Eine Möglichkeit, Homozygotität in ES Zellen zu erreichen, kann durch Verwendung bestimmter Neokassetten im Targeting Konstrukt und anschließender Erhöhung der G418-Konzentration erzielt werden (Mortensen et al., 1992). Mitotische Rekombination

oder Chromosomenverlust plus anschließende Duplikation erzeugen dabei einen Verlust der Heterozygotität (LOH, loss of heterozygosity) (Lefebvre et al., 2001). Ein weiteres Verfahren, welches homozygote Allele *in vitro* und *in vivo* erzeugen kann, ist von Liu et al. (2001) beschrieben worden. Dieser Ansatz verwendet Cre Rekombinase für mitotische Rekombination. Werden homologe Chromosomen, welche loxP-Stellen tragen, nach der S-Phase des Zellzyklus rekombiniert, können Zellen mit homozygot mutanten Allelen erhalten werden.

Werden auf eine dieser Weisen homozygote ES Zellen gewonnen, so kann durch die bereits besprochene Tetraploidkomplementation schnell ein homozygotes Tier erhalten werden. Ein Ansatz, mit welchem schnell (-/-)-Tiere aus heterozygoten ES Zellen generiert werden können, nutzt die Tatsache, daß ein geringer Prozentsatz der Zellen einer ES Zelllinie, welche meist den Chromosomensatz (40, XY) tragen, spontan das Y-Chromosom verliert. Dadurch werden aus diesen Zellen nicht, wie sonst üblich, männliche, sondern weibliche Tiere erhalten. Diese können mit den parallel erzeugten Männchen verpaart und es können (-/-)-Tiere erhalten werden (Eggan et al., 2002).

Könnte man mit Froxing durch DNA-Mikroinjektion homozygot mutante Tiere in einem Schritt erhalten? Rein theoretisch wäre dies denkbar: Unter der Verwendung früher Embryonen, welche homozygot für das gefroxtete Allel sind, könnten beide Allele durch Frox-Rekombination ersetzt werden. Allerdings wäre ein solcher Schritt äußerst selten, da beide Allele unabhängig voneinander rekombiniert werden müßten. Zudem könnten komplex mosaikartige Tiere entstehen, wenn nicht beide Allele im Einzellstadium ersetzt würden. Zusätzlich sollte hier bedacht werden, daß bei einem solchen Ansatz zwei loxP- und zwei FRT-Stellen auf homologen Chromosomen vorhanden wären. Bei Anwesenheit von Cre konnte *in vivo* transchromosomale Rekombination ohne Selektion erreicht werden (Herault et al., 1998; Buchholz et al., 2000). Obwohl solche Reaktionen relativ selten stattfinden, könnten sie dennoch bei homozygoten Frox-Allelen auftreten, insbesondere da eine solche Rekombination auch mit Flp/FRT denkbar ist. Daher wäre die Wahrscheinlichkeit transchromosomaler Rekombination im Frox-System höher als bei alleiniger Cre/lox-Anwendung. Zusammenfassend erscheint es somit praktikabler, auf die direkte Etablierung homozygoter Mutanten zu verzichten und zuerst heterozygote Tiere zu erzeugen und diese konventionell zu züchten.

Zuletzt soll hier eine kurze Abwägung der Anwendbarkeit der Flox-Methodik auf bereits existierende und zukünftige Mausmutanten getroffen werden. Als Voraussetzung für die Flox-Technik wird nur eine loxP- und eine FRT-Stelle am gleichen Genlocus benötigt. Die Orientierung der Erkennungsstellen zueinander spielt hierbei keine Rolle. Eine solche Konstellation der Erkennungsstellen fällt oftmals bei der Herstellung konditionaler Allele als „Nebenprodukt“ an (Kwan, 2002). Es gibt im allgemeinen zwei Wege, um konditionale Allele herzustellen: Der erste Weg benutzt eine „drei-lox“-Strategie. Hierbei ist das auszuschaltende Gen/Exon gefloxt (von loxP-Stellen flankiert) und die Selektionskassette, welche benachbart liegt, trägt ebenfalls eine lox-Stelle. Durch Cre-Rekombination in ES Zellen kann die Selektionkassette entfernt werden, was empfehlenswert ist, da das Verbleiben von Selektionsmarkern die Expression benachbarter Gene beeinflussen kann (Fiering et al., 1995). Durch eine drei lox-Stellen enthaltende Anordnung entstehen bei Cre-Rekombination alle möglichen Rekombinationsprodukte, welche auch die Deletion des gesamten geflochten Bereiches, inklusive des Gens/Exons, beinhalten (Kwan, 2002). Dies kann durch einen alternativen Ansatz umgangen werden: Die interessierende Genregion wird gefloxt und der Selektionsmarker geflirtet (von FRT-Stellen flankiert). Flp-vermittelte Deletion führt anschließend zur Entfernung der Selektionskassette unter Erhaltung des geflochten Segments. Mittlerweile gibt es zahlreiche Publikationen über solche Ansätze (Meyers et al., 1998; Minichiello et al., 1999; Ashery-Padan et al., 2000; Kulesa & Hogan, 2002; Rubera et al., 2002). Mit diesen Mauslinien können sowohl generelle Nullmutanten durch Verpaarung mit „Cre-Deleter“-Mäusen (Linien, welche Cre in der Keimbahn exprimieren) (O’Gorman et al., 1997; Sakai & Miyazaki, 1997; Williams-Simons & Westphal, 1999; Tang et al., 2002) als auch konditionelle Knock-Out-Mäuse durch Verpaarung mit gewebe-spezifisch Cre-exprimierenden Linien erhalten werden. Neben diesen Möglichkeiten, die generell auch mit einer „drei lox“-Strategie zu erreichen sind, ergeben sich jedoch mit einem solchen Ansatz weitere Vorteile. Einer dieser Vorteile ist die bereits besprochene Umgehung der Gesamtlocus (Gen/Exon zusammen mit Selektionsmarker)-Exzision in Stammzellen. Der zweite Vorteil liegt in der Tatsache, daß loxP/FRT-tragende Mäuse als Plattformlinie zur Integration verschiedenster Kassetten

per Froxing dienen könnten. Somit eröffnen diese Linien mit Abstand die meisten Möglichkeiten für eine gründliche in vivo Analyse der Genfunktion und sollten daher, nach gründlicher Abwägung aller Optionen, eventuell anderen Ansätzen bevorzugt werden.

7 Appendix

Herstellung und Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Folgende Plasmide sind bereits publiziert und dort beschrieben:

pBS 500 (Bethke & Sauer, 1997)
pCre-ER^{T2} (Indra et al., 1999)
pCre/Flp (Lauth et al., 2002)
pFrox-EGFP (Lauth et al., 2002)
pFrox-Hygro (Lauth et al., 2002)
pPGKpaX1 (Kellendonk et al., 1996)
pCAGGS-Flpe (Schaff et al., 2001)
pMC-Cre (Gu et al., 1993)
PN2Flox (Lauth et al., 2000)
pCMV β I (Lauth et al., 2000)
pPWL512 (Johnson et al., 1995)

Folgende Plasmide sind bisher nicht publiziert. Bei selbst klonierten Konstrukten ist die Klonierungsgeschichte mit angegeben:

pFroxCV1: In diesem Plasmid kann das Insert zwischen der loxP und der FRT-Stelle durch EcoRI-Verdau entfernt und durch andere Inserts ersetzt werden. Aufbau: loxP—Tn5-Promotor—Neo—SV40 polyA—FRT. Herstellung: Ein HindII-Fragment (Neo—pA—FRT) aus pPGK-FroxNeo wurde in die SpeI site von pBSloxP kloniert. pBSloxP ist ein pBluescript-Vektor, der in der multiple cloning site eine loxP Sequenz trägt.

pGK-FRT: Aufbau: FRT—PGK-Promotor—Tn5-Promotor—Neo—SV40 polyA—FRT. Die parallele Anwesenheit eines eukaryotischen und bakteriellen Promotors erlaubt die Selektion mit Kanamycin in Bakterien und G 418 in Zellkultur.

pFRT: Durch Flp-Rekombination aus pPGK-FRT entstanden.

pFRT-STOP: Flp-Reporterplasmid. Aufbau: CMV-Promotor—FRT—STOP-Cassette—FRT—EGFP—SV40 polyA. Die STOP Cassette, welche die Expression von EGFP verhindert, besteht aus einem zum CMV-Promotor gegenläufigen PGK-Promotor und einer Zeo-Expressions-cassette.

pLTV: Cre-Reporterplasmid. Aufbau: CMV-Enhancer-Chicken β -Actin-Promotor—loxP— β geo (Fusion aus β -Galactosidase und Neomycinphosphotransferase)—3x polyA—loxP—EphrinA5-Receptorbody—IRES—EGFP.

pQE-Cre: Plasmid zur bakteriellen Überexpression von Cre. Aufbau: T5-Promotor—lac-Operator-Sequenzen (2x)—Synthetische Ribosomen-Bindestelle—6xHis Tag—Cre—Terminationssignale: t_0 (phage Lambda) und T1 (rrnB operon von E.coli).

8 Abkürzungen

bp	Basenpaar
CMCE	Cre vermittelter Kassettenaustausch (<i>cre-mediated cassette exchange</i>)
CMV	Cytomegalievirus
Cre	Sequenz-spezifische DNA-Rekombinase des P1-Phagen („ <i>causes recombination</i> “)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E8	Embryonaltag 8
E10	Embryonaltag 10
d	Tag
dpc	Tag nach Kopulation (<i>days post coitum</i>)
ES	Embryonale Stammzelle
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer (<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Flp	Sequenz-spezifische DNA-Rekombinase aus <i>S.cerevisiae</i>
FRT	Erkennungssequenz der Flp-Rekombinase (<i>flp recognition target</i>)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
(E)GFP	(Verstärkt) grün fluoreszierendes Protein (<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>)
Gefloxt	Von loxP-Stellen flankiert
Geflirtet	Von FRT-Stellen flankiert
G418	Geneticinsulfat
h	Stunde
Hygro	Hygromycinphosphotransferase; verleiht Resistenz gegen Hygromycin B
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
KO	„Knock-out“ (homozygot mutant)
lacZ	Bakterielle β -Galaktosidase
LH	Luteinisierendes Hormon

LIF	Leukämie inhibierender Faktor (<i>leukemia inhibitory factor</i>)
loxP	Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase (<i>locus of crossing over (x) in P1</i>)
Neo	Neomycinphosphotransferase; verleiht Resistenz gegen G418
PGK	Phosphoglyceratkinase
Puro	Puromycinphosphotransferase; verleiht Resistenz gegen Puromycin
RMCE	Rekombinase vermittelter Kassettenaustausch (<i>recombinase-mediated cassette exchange</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SSR	Orts- bzw. Sequenz-spezifische Rekombinase (<i>site-specific recombinase</i>)
Tk	Thymidinkinase
V	Volt
Wt	Wildtyp
Zeo	Zeocin-Bindeprotein; verleiht Resistenz gegen Zeocin
-/-	Homozygot mutant („Knock-out“)
+/-	Heterozygot
+/+	Homozygot wildtyp

9 Literaturverzeichnis

- Andreas, S., Schwenk, F., Kuter-Luks, B., Faust, N., und Kuhn, R. (2002). Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **30**, 2299-2306.
- Araki, K., Araki, M., Miyazaki, J., und Vassalli, P. (1995). Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 160-164.
- Araki, K., Araki, M., und Yamamura, K. (1997a). Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* **25**, 868-872.
- Araki, K., Imaizumi, T., Okuyama, K., Oike, Y., und Yamamura, K. (1997b). Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *J. Biochem. (Tokyo)* **122**, 977-982.
- Araki, K., Araki, M., und Yamamura, K. (2002). Site-directed integration of the cre gene mediated by Cre recombinase using a combination of mutant lox sites. *Nucleic Acids Res.* **30**, e103.
- Aranda, M., Kanellopoulou, C., Christ, N., Peitz, M., Rajewsky, K., und Droge, P. (2001). Altered directionality in the Cre-LoxP site-specific recombination pathway. *J. Mol. Biol.* **311**, 453-459.

-
- Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X., und Gruss, P. (2000). Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev.* **14**, 2701-2711.
- Austin, S., Ziese, M., und Sternberg, N. (1981). A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* **25**, 729-736.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1993). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, Inc. und John Wiley & Sons.
- Baer, A. & Bode, J. (2001). Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 473-480.
- Bethke, B. & Sauer, B. (1997). Segmental genomic replacement by Cre-mediated recombination: genotoxic stress activation of the p53 promoter in single-copy transformants. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2828-2834.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bode, J., Schlake, T., Iber, M., Schubeler, D., Seibler, J., Snezhkov, E., und Nikolaev, L. (2000). The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biol. Chem.* **381**, 801-813.

-
- Buchholz, F., Angrand, P.O., und Stewart, A.F. (1998). Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* **16**, 657-662.
- Buchholz, F., Refaeli, Y., Trumpp, A., und Bishop, J.M. (2000). Inducible chromosomal translocation of AML1 and ETO genes through Cre/loxP-mediated recombination in the mouse. *EMBO Rep.* **1**, 133-139.
- Buchholz, F. & Stewart, A.F. (2001). Alteration of Cre recombinase site specificity by substrate-linked protein evolution. *Nat. Biotechnol.* **19**, 1047-1052.
- Cao, Y. & Hayes, F. (1999). A newly identified, essential catalytic residue in a critical secondary structure element in the integrase family of site-specific recombinases is conserved in a similar element in eucaryotic type IB topoisomerases. *J. Mol. Biol.* **289**, 517-527.
- Chen, Y., Narendra, U., Iype, L.E., Cox, M.M., und Rice, P.A. (2000). Crystal structure of a Flp recombinase-Holliday junction complex: assembly of an active oligomer by helix swapping. *Mol. Cell* **6**, 885-897.
- Christ, N. & Droge, P. (2002). Genetic manipulation of mouse embryonic stem cells by mutant lambda integrase. *Genesis.* **32**, 203-208.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. und Wingfield, P.T. (eds.) (1996). *Current Protocols in Protein Science*. Vols. 1-2, John Wiley & Sons.

-
- Diaz, V., Rojo, F., Martinez, A., Alonso, J.C., und Bernad, A. (1999). The prokaryotic beta-recombinase catalyzes site-specific recombination in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 6634-6640.
- Doetschman, T., Maeda, N., und Smithies, O. (1988). Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 8583-8587.
- Eggan, K., Akutsu, H., Loring, J., Jackson-Grusby, L., Klemm, M., Rideout, W.M., III, Yanagimachi, R., und Jaenisch, R. (2001). Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 6209-6214.
- Farley, F.W., Soriano, P., Steffen, L.S., und Dymecki, S.M. (2000). Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. *Genesis*. **28**, 106-110.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., und Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 752-757.
- Feng, Y.Q., Seibler, J., Alami, R., Eisen, A., Westerman, K.A., Leboulch, P., Fiering, S., und Bouhassira, E.E. (1999). Site-specific chromosomal integration in mammalian cells: highly efficient CRE recombinase-mediated cassette exchange. *J. Mol. Biol.* **292**, 779-785.

-
- Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D.I., Enver, T., Ley, T.J., und Groudine, M. (1995). Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev.* **9**, 2203-2213.
- Futcher, A.B. (1986). Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Theor. Biol.* **119**, 197-204.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., und Ruddle, F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 7380-7384.
- Groth, A.C., Olivares, E.C., Thyagarajan, B., und Calos, M.P. (2000). A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 5995-6000.
- Gu, H., Zou, Y.R., und Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**, 1155-1164.
- Guo, F., Gopaul, D.N., und van Duyne, G.D. (1997). Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* **389**, 40-46.
- Hamilton, D.L. & Abremski, K. (1984). Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J. Mol. Biol.* **178**, 481-486.

-
- Hasty, P., Ramirez-Solis, R., Krumlauf, R., und Bradley, A. (1991). Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature* **350**, 243-246.
- Herault, Y., Rassoulzadegan, M., Cuzin, F., und Duboule, D. (1998). Engineering chromosomes in mice through targeted meiotic recombination (TAMERE). *Nat. Genet.* **20**, 381-384.
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* **26**, 365-369.
- Hochman, L., Segev, N., Sternberg, N., und Cohen, G. (1983). Site-specific recombinational circularization of bacteriophage P1 DNA. *Virology* **131**, 11-17.
- Hoess, R.H., Wierzbicki, A., und Abremski, K. (1986). The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* **14**, 2287-2300.
- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F. und Lacy, E. (1994). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.M., Xiao, J.H., Chambon, P., und Metzger, D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4324-4327.

-
- Jayaram, M. (1985). Two-micrometer circle site-specific recombination: the minimal substrate and the possible role of flanking sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 5875-5879.
- Johnson, K.A., Lerner, C.P., Di Lacio, L.C., Laird, P.W., Sharpe, A.H., und Simpson, E.M. (1995). Transgenic mice for the preparation of hygromycin-resistant primary embryonic fibroblast feeder layers for embryonic stem cell selections. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1273-1275.
- Joyner, A.L. (ed.) (2000). *Gene Targeting: A Practical Approach*. Second Edition. Oxford University Press.
- Kellendonk, C., Tronche, F., Monaghan, A.P., Angrand, P.O., Stewart, F., und Schutz, G. (1996). Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1404-1411.
- Kilby, N.J., Snaith, M.R., und Murray, J.A. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* **9**, 413-421.
- Kolb, A.F. (2001). Selection-marker-free modification of the murine beta-casein gene using a lox2272 [correction of lox2722] site. *Anal. Biochem.* **290**, 260-271.
- Kuhstoss, S. & Rao, R.N. (1991). Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage phi C31. *J. Mol. Biol.* **222**, 897-908.

-
- Kulesa, H. & Hogan, B.L. (2002). Generation of a loxP flanked *bmp4loxP-lacZ* allele marked by conditional lacZ expression. *Genesis*. **32**, 66-68.
- Kwan, K.M. (2002). Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis*. **32**, 49-62.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., und Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4293.
- Langer, S.J., Ghafoori, A.P., Byrd, M., und Leinwand, L. (2002). A genetic screen identifies novel non-compatible loxP sites. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3067-3077.
- Lauth, M. (1999). Mutagenese definierter nicht-kodierender Bereiche des NGF-Genlocus in embryonalen Stammzellen der Maus. Diplomarbeit. Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main.
- Lauth, M., Moerl, K., Barski, J.J., und Meyer, M. (2000). Characterization of Cre-mediated cassette exchange after plasmid microinjection in fertilized mouse oocytes. *Genesis*. **27**, 153-158.
- Lauth, M., Spreafico, F., Dethleffsen, K., und Meyer, M. (2002). Stable and efficient cassette exchange under non-selectable conditions by combined use of two site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* **30**, E115.

-
- Le, Y., Gagnetten, S., Tombaccini, D., Bethke, B., und Sauer, B. (1999). Nuclear targeting determinants of the phage P1 cre DNA recombinase. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4703-4709.
- Lee, G. & Saito, I. (1998). Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene* **216**, 55-65.
- Lefebvre, L., Dionne, N., Karaskova, J., Squire, J.A., und Nagy, A. (2001). Selection for transgene homozygosity in embryonic stem cells results in extensive loss of heterozygosity. *Nat. Genet.* **27**, 257-258.
- Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 743-755.
- Liu, P., Jenkins, N.A., und Copeland, N.G. (2002). Efficient Cre-loxP-induced mitotic recombination in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* **30**, 66-72.
- Logie, C. & Stewart, A.F. (1995). Ligand-regulated site-specific recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 5940-5944.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H.B., Allak, B.A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A., und Jonkers, J. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 9209-9214.

-
- Mack, A., Sauer, B., Abremski, K., und Hoess, R. (1992). Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4451-4455.
- Meyers, E.N., Lewandoski, M., und Martin, G.R. (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* **18**, 136-141.
- Minichiello, L., Korte, M., Wolfer, D., Kuhn, R., Unsicker, K., Cestari, V., Rossi-Arnaud, C., Lipp, H.P., Bonhoeffer, T., und Klein, R. (1999). Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* **24**, 401-414.
- Mlynarova, L., Libantova, J., Vrba, L., und Nap, J. (2002). The promiscuity of heterospecific lox sites increases dramatically in the presence of palindromic DNA. *Gene* **296**, 129.
- Mortensen, R.M., Conner, D.A., Chao, S., Geisterfer-Lowrance, A.A., und Seidman, J.G. (1992). Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct. *Mol. Cell Biol.* **12**, 2391-2395.
- Muyrers, J.P., Zhang, Y., und Stewart, A.F. (2000). ET-cloning: think recombination first. *Genet. Eng (N. Y.)* **22**, 77-98.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* **26**, 99-109.

-
- Nunes-Düby, S.E., Azaro, M.A., und Landy, A. (1995). Swapping DNA strands and sensing homology without branch migration in lambda site-specific recombination. *Curr. Biol.* **5**, 139-148.
- O'Gorman, S., Dagenais, N.A., Qian, M., und Marchuk, Y. (1997). Protamine-Cre recombinase transgenes efficiently recombine target sequences in the male germ line of mice, but not in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 14602-14607.
- Olivares, E.C., Hollis, R.P., und Calos, M.P. (2001). Phage R4 integrase mediates site-specific integration in human cells. *Gene* **278**, 167-176.
- Olivares, E.C., Hollis, R.P., Chalberg, T.W., Meuse, L., Kay, M.A., und Calos, M.P. (2002). Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1124-1128.
- Palmiter, R.D., Norstedt, G., Gelinias, R.E., Hammer, R.E., und Brinster, R.L. (1983). Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* **222**, 809-814.
- Ramirez-Solis, R., Rivera-Perez, J., Wallace, J.D., Wims, M., Zheng, H., und Bradley, A. (1992). Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. *Anal. Biochem.* **201**, 331-335.
- Ringrose, L., Lounnas, V., Ehrlich, L., Buchholz, F., Wade, R., und 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.

-
- Ringrose, L., Chabanis, S., Angrand, P.O., Woodroffe, C., und Stewart, A.F. (1999). Quantitative comparison of DNA looping in vitro and in vivo: chromatin increases effective DNA flexibility at short distances. *EMBO J.* **18**, 6630-6641.
- Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F., und Dymecki, S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat. Genet.* **25**, 139-140.
- Rubera, I., Meier, E., Vuagniaux, G., Merillat, A.M., Beermann, F., Rossier, B.C., und Hummler, E. (2002). A conditional allele at the mouse channel activating protease 1 (Prss8) gene locus. *Genesis.* **32**, 173-176.
- Sadowski, P.D. (1995). The Flp recombinase of the 2-microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **51**, 53-91.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sakai, K. & Miyazaki, J. (1997). A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 318-324.
- Sambrook, J., Russell, D.W. und Sambrook, J. (eds.) (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

-
- Sanes, J.R., Rubenstein, J.L., und Nicolas, J.F. (1986). Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J.* **5**, 3133-3142.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467.
- Santoro, S.W. & Schultz, P.G. (2002). Directed evolution of the site specificity of Cre recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 4185-4190.
- Schaft, J., Ashery-Padan, R., van der, H.F., Gruss, P., und Stewart, A.F. (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., und Capecchi, M.R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 13702-13707.
- Schwikardi, M. & Droge, P. (2000). Site-specific recombination in mammalian cells catalyzed by gammadelta resolvase mutants: implications for the topology of episomal DNA. *FEBS Lett.* **471**, 147-150.
- Seibler, J. & Bode, J. (1997). Double-reciprocal crossover mediated by FLP-recombinase: a concept and an assay. *Biochemistry* **36**, 1740-1747.

-
- Seibler, J., Schubeler, D., Fiering, S., Groudine, M., und Bode, J. (1998). DNA cassette exchange in ES cells mediated by Flp recombinase: an efficient strategy for repeated modification of tagged loci by marker-free constructs. *Biochemistry* **37**, 6229-6234.
- Shaikh, A.C. & Sadowski, P.D. (2000). Chimeras of the Flp and Cre recombinases: tests of the mode of cleavage by Flp and Cre. *J. Mol. Biol.* **302**, 27-48.
- Siegel, R.W., Jain, R., und Bradbury, A. (2001). Using an in vivo phagemid system to identify non-compatible loxP sequences. *FEBS Lett.* **505**, 467-473.
- Soukharev, S., Miller, J.L., und Sauer, B. (1999). Segmental genomic replacement in embryonic stem cells by double lox targeting. *Nucleic Acids Res.* **27**, e21.
- Stacey, A., Schnieke, A., McWhir, J., Cooper, J., Colman, A., und Melton, D.W. (1994). Use of double-replacement gene targeting to replace the murine alpha-lactalbumin gene with its human counterpart in embryonic stem cells and mice. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1009-1016.
- Tanaka, A.S., Tanaka, M., und Komuro, K. (1998). A highly efficient method for the site-specific integration of transfected plasmids into the genome of mammalian cells using purified retroviral integrase. *Gene* **216**, 67-76.
- Tang, S.H., Silva, F.J., Tsark, W.M., und Mann, J.R. (2002). A Cre/loxP-deleter transgenic line in mouse strain 129S1/SvImJ. *Genesis.* **32**, 199-202.

-
- Thomas, K.R. & Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503-512.
- Thyagarajan, B., Guimaraes, M.J., Groth, A.C., und Calos, M.P. (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* **244**, 47-54.
- Thyagarajan, B., Olivares, E.C., Hollis, R.P., Ginsburg, D.S., und Calos, M.P. (2001). Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol. Cell Biol.* **21**, 3926-3934.
- Valancius, V. & Smithies, O. (1991). Testing an "in-out" targeting procedure for making subtle genomic modifications in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* **11**, 1402-1408.
- van Duyne, G.D. (2001). A structural view of cre-loxp site-specific recombination. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 87-104.
- Vooijs, M., Jonkers, J., und Berns, A. (2001). A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep.* **2**, 292-297.
- Williams-Simons, L. & Westphal, H. (1999). EIIaCre -- utility of a general deleter strain. *Transgenic Res.* **8**, 53-54.

-
- Wu, H., Liu, X., und Jaenisch, R. (1994). Double replacement: strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine Col1a-1 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 2819-2823.
- Yu, Y. & Bradley, A. (2001). Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 780-790.
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P., und Stewart, A.F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* **20**, 123-128.
- Zhang, Z. & Lutz, B. (2002). Cre recombinase-mediated inversion using lox66 and lox71: method to introduce conditional point mutations into the CREB-binding protein. *Nucleic Acids Res.* **30**, E90.

10 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei...

...Michael Meyer für die Betreuung dieser Arbeit und die Unterstützung während dieser Zeit.

...dem Rest der „Truppe“, also Kathrin Dethleffsen, Karin Mörl, Jaroslaw+Ewa Barski, Fabio Spreafico, Andrea Steinberg und Birgit Kunkel. Es war eine lustige und sehr angenehme Zeit mit Euch und ich werde mich gerne daran zurück erinnern.

...allen Kollegen vom MPI für wissenschaftliche und außerwissenschaftliche Gespräche, für Unterstützung und Zusammenarbeit, für Berghüttenabende und Plasmide, einfach für ein super Arbeitsklima.

...Bernd Ludwig für die externe Betreuung dieser Arbeit.

...Barbara Conradt und Hans Thoenen für ihre Bereitschaft, das „Thesis Committee“ zu bilden und für die konstruktiven Gespräche mit ihnen.

...meinem Vater für seine jahrelange Unterstützung und bei ihm und meinem Bruder Thomas für ihre zahlreichen großen und kleinen Hilfen.

...*last but not least*, natürlich bei Heidi. Dafür, daß sie das Zusammenleben mit einem Wissenschaftler geradezu perfekt meisterte und zudem noch laborresultatbedingte Stimmungsschwankungen meinerseits ertrug. Dafür, daß ich ihr immer mehrstündige „Updates“ über meine Arbeit geben durfte und einfach für alles andere, was sowieso nicht die Wissenschaft betrifft...

11 Lebenslauf

21.10.1972	Geboren in Mannheim
1979-1983	Besuch der Grundschule Hirschberg-Großsachsen
1983-1992	Besuch des Albertus Magnus-Gymnasiums in Viernheim
06/1992	Allgemeine Hochschulreife
10/1992-01/1994	Zivildienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe Viernheim
04/1994-04/1996	Studium der Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
04/1996	Vordiplom Chemie (Anorganische Chemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie, Physik)
04/1996-06/1999	Studium der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
06/1998	Diplomprüfungen (Biochemie: Prof. H. Fasold, Biophysikalische Chemie: Prof. E. Bamberg, Pharmakologie/Toxikologie: Prof. E. Lambrecht)
09/1998-06/1999	Diplomarbeit „Mutagenese definierter nicht-kodierender Bereiche des NGF-Genlocus in embryonalen Stammzellen der Maus“. Durchgeführt am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried bei Prof. Yves-Alain Barde in der Gruppe von Dr. Michael Meyer.
06/1999–01/2002	Erster Abschnitt der Dissertation „Rekombinase vermittelter Kassetten Austausch im Mausgenom“, durchgeführt am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried in der Abteilung von Prof. Yves-Alain Barde, Forschungsgruppe Michael Meyer.
ab 01/2002	Zweiter Abschnitt der Dissertation, durchgeführt am University College London, Institute of Ophthalmology, unter Anleitung von PD Dr. Michael Meyer

12 Liste der eigenen Publikationen

Stand: Dezember 2002

Lauth, M., Moerl, K., Barski, J.J., und Meyer, M. (2000). Characterization of Cre-mediated cassette exchange after plasmid microinjection in fertilized mouse oocytes. *Genesis*. **27**, 153-158.

Barski, J.J., **Lauth, M.**, und Meyer, M. (2002). Genetic targeting of cerebellar Purkinje cells: History, current status and novel strategies. *The Cerebellum* **1** (2), 111-118

Lauth, M., Spreafico, F., Dethleffsen, K., und Meyer, M. (2002). Stable and efficient cassette exchange under non-selectable conditions by combined use of two site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* **30**, e115.