

**Generierung zweier *knock in* Mausmutanten
zur funktionellen Charakterisierung einzelner Domänen
des Gfi1-Zinkfingerproteins**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Biologie und Geographie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Katharina Fiolka

aus Bottrop

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Möröy

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Ehrmann

3. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Frau Prof. Dr. A. E. Ehrenhofer-Murray

Tag der mündlichen Prüfung: 06.04.2006

Für Torsten

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 Die Zinkfingerproteine Gfi1 und Gfi1b	1
1.1.1 Struktur von Gfi1 und Gfi1b	2
1.1.2 Expression von Gfi1 und Gfi1b	3
1.1.3 Der Phänotyp Gfi1 defizienter Mäuse.....	6
1.1.4 Gfi1-Mutationen in Neutropenie-Patienten	8
1.1.5 Der Phänotyp Gfi1b defizienter Mäuse.....	9
1.1.6 Zielgene von Gfi1 und Gfi1b.....	9
1.1.7 Atonal und Math1.....	10
1.2 Zielsetzung der Arbeit.....	11
2 Ergebnisse	13
2.1 Analysen zur gegenseitigen Regulation von Gfi1 und Gfi1b	13
2.2 Analysen der Gfi1:GFP x vav-Gfi1b transgenen Tiere.....	16
2.2.1 Untersuchungen zur Kreuzregulation von Gfi1 und Gfi1b	16
2.2.2 Untersuchungen zur Kompensation des Gfi1 Verlustes durch transgenes Gfi1b.....	17
2.2.2.1 Die Analyse des Thymus der Gfi1 ^{GFP/GFP} x vav-Gfi1b Mäuse	17
2.2.2.2 Die Analyse des Knochenmarks der Gfi1 ^{GFP/GFP} x vav-Gfi1b Mäuse	19
2.3 Generierung der Gfi1:Gfi1b <i>knock in</i> Mausmutante	20
2.3.1 Herstellung des Gfi1:Gfi1b <i>knock in</i> Konstruktes.....	20
2.3.2 Erzeugung und Genotypisierung von ES-Zellen mit einem Gfi1:Gfi1b Allel	22
2.3.3 Nachweis der Protein-Expression in Gfi1:Gfi1b <i>knock in</i> Mäusen	24
2.4 Generierung der Gfi1:P2A Mausmutante	25
2.4.1 Herstellung des Gfi1:P2A Konstruktes	25

2.4.2	Erzeugung und Genotypisierung von ES-Zellen mit einem Gfi1:P2A Allel.	27
2.4.3	Nachweis der Funktionalität des P2A Allels	28
2.5	Analyse des Thymus beider Mausmutanten.	29
2.6	Analyse des Knochenmarks	32
2.7	Analyse der Innenohren	37
3	Diskussion	43
3.1	Rolle der Expressionsspezifität und -stärke im Mausmodell	44
3.2	<i>Knock in</i> Mausmutanten.	46
3.2.1	Analyse der funktionellen Homologie zweier Proteine.	46
3.2.2	Analyse der Auswirkung einer Punktmutation auf die Proteinfunktion	47
3.2.3	Kritische Aspekte	48
3.3	Auto- und Kreuzregulation von Gfi1 und Gfi1b	48
3.4	Gründe für eine nur partielle funktionelle Homologie von Gfi1 und Gfi1b ..	50
3.5	Bestätigung des Hertzano-Modells zur Regulation von Gfi1 im Innenohr ...	53
3.6	Übertragbarkeit gewonnener Erkenntnisse auf andere Spezies	54
3.7	Ausblick	55
4	Zusammenfassung	57
5	Material und Methoden	58
5.1	Material	58
5.1.1	Häufig verwendete Lösungen und Medien	58
5.1.1.1	Verwendete Molekulargewichtsmarker	62
5.1.2	Organismen	62
5.1.2.1	Bakterien	62
5.1.2.2	Mausstämme	62
5.1.2.3	Zell-Linien:	62
5.1.3	Zellkultur	63
5.1.3.1	Material aus der Instituts-Medienküche.	63
5.1.4	Chemikalien für die ES-Zellkultur	63
5.1.5	Verwendete Antikörper	64
5.1.5.1	Immunoblot-Antikörper	64
5.1.5.2	Durchflußzytometrie-Antikörper.	65
5.1.5.3	Verwendete Oligonukleotide	65
5.2	Methoden.	66
5.2.1	Mikrobiologische Arbeitstechniken	66

5.2.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.	66
5.2.1.2	Transformation.	66
5.2.2	DNA-/RNA-Arbeitstechniken	66
5.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA nach der klassischen Methode .	66
5.2.2.2	Plasmid DNA-Aufreinigung im großen Maßstab	67
5.2.2.3	Restriktionsendonuklease-Reaktion von DNA.	67
5.2.2.4	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	67
5.2.2.5	Auffüllen von 5´überhängenden DNA-Enden.	67
5.2.2.6	Glätten von 3´überhängenden Enden.	67
5.2.2.7	Dephosphorylierung von DNA.	68
5.2.2.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	68
5.2.2.9	DNA-Sequenzierung	68
5.2.2.10	Ligation	68
5.2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).	68
5.2.2.12	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	69
5.2.2.13	Transfer und Immobilisierung von DNA	69
5.2.2.14	Prähybridisierung und Waschen der hybridisierten Nylonmembranen	70
5.2.2.15	Isolierung von RNA.	70
5.2.2.16	Reverse Transkription	70
5.2.2.17	Isolierung von genomischer DNA.	70
5.2.2.18	Quantitative Real-Time-PCR.	71
5.2.2.19	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	71
5.2.3	Zellkultur-Techniken	71
5.2.3.1	Kultivierung von Zellen	71
5.2.3.2	Transfektion von Zellen durch Elektroporation.	71
5.2.3.3	ES-Zellkultur.	72
5.2.3.4	Transfektion und Selektion von ES-Zellen	72
5.2.3.5	Herstellung embryonaler Maus-Fibroblasten (MEFs)	72
5.2.3.6	Passagieren von Zellen.	73
5.2.3.7	Einfrieren und Auftauen von Zellen	73
5.2.4	Durchflußzytometrie.	73
5.2.4.1	Isolation von Zellen aus Organen	73
5.2.4.2	Erythrozytenlyse.	73

5.2.5	Aufnahme und Analyse von Zellen mittels FACS	74
5.2.6	Protein-Arbeitstechniken	74
5.2.6.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	74
5.2.6.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	74
5.2.6.3	Transfer der Proteine und Proteinnachweis (Western Blot-Immunoblot)	75
5.2.6.4	Gesamtproteinextraktion aus Zellen	75
5.2.7	Luziferase-Reportergenanalyse.....	76
5.2.8	Arbeitstechniken zur Innenohr-Analyse	76
5.2.8.1	Fixierung von Gewebe mittels Paraformaldehyd (PFA).....	76
5.2.8.2	Auditory Brainstem Response (ABR)	77
5.2.8.3	Morphologische Analyse der hämatopoetischen Zellen.....	77
5.2.8.4	Immunfluoreszenz	77
6	Literatur	78
7	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	84
7.1	Fachartikel	84
7.2	Poster	84

Abkürzungen

A	Alanin oder Adenin (Adenosin)
A. dest	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytidin (Cytosin)
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Nomenklatur für Oberflächenmarker)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Cre	<i>cyclization recombination</i>
C-Terminus	carboxyl-Terminus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure x Na ₂ -Salz
ES	embryonale Stammzellen
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5phenylphenatridiumbromid)
et al	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>

FCS	fötales Kälberserum (<i>Fetal-Calf-Serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HCl	Salzsäure
HEPES	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)
G	Guanidin (Guanin)
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NaOH	Natronlauge
Neo	Neomycinresistenzkassette
OD	optische Dichte
P	Prolin
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
pH	$-\log [H^+]$
polyA	Polyadenylierungssignal
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfat</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SV 40	Simian Virus 40
SSC	Citrat-gepufferte Kochsalzlösung
T	Thymidin (Thymin)
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Tween	20 Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Uracil
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
VT	Versene Trypsine
v/v	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewichtsprozent (<i>weight per volume</i>)

1 Einleitung

1.1 Die Zinkfingerproteine Gfi1 und Gfi1b

Bereits 1993 wurde Gfi1 (*Growth Factor Independence 1*) zum ersten Mal als ein 423 Aminosäuren großes Protein beschrieben (Gilks *et al.* 1993). Es sollten mittels retroviraler Insertionsmutagenese unter Verwendung des murinen Moloney Leukämie-Virus (Mo-MuLV) Faktoren gefunden werden, die Interleukin-2 unabhängiges T-Lymphozytenwachstum erlauben. Der Integrationsort des Virus in einem der IL-2 unabhängigen Zellklone wurde schließlich als Gfi1 bezeichnet. Es zeigte sich, dass die Integration der proviralen DNA zu einer erhöhten Expression von Gfi1 führte. Diese Beobachtungen konnten später durch weitere Mo-MuLV-Experimente verifiziert werden, bei denen in pim1/L-myc doppeltransgenen Mäusen eine schnellere Tumorentstehung nach der Infektion festgestellt wurde (Zörnig *et al.* 1996). Man erklärte diese Tatsache damit, dass die Insertion des Virus Onkogene aktiviert, die mit myc und pim-1 in der Tumorentstehung kooperieren (Zörnig *et al.* 1996; Scheijen *et al.* 1997; Schmidt *et al.* 1998a; Schmidt *et al.* 1998b). Eines dieser potentiellen Onkogene scheint nun Gfi1 zu sein, da es in der Studie als häufigster Integrationsort identifiziert wurde. Lokalisiert ist Gfi1 beim Menschen auf Chromosom 1p22, bei der Maus auf Chromosom 5 (Bell *et al.* 1995; Roberts and Cowell 1997).

In den vergangenen Jahren konnte Gfi1 aus verschiedenen Spezies kloniert und untersucht werden; darunter nicht nur die oben genannten Proteine aus der Maus und dem Menschen, sondern auch Gfi1 aus der Ratte (Bell *et al.* 1995), dem Huhn (Fuchs *et al.* 1997), der Stubenfliege (Kasai and Scott 2001) und erst im letzten Jahr aus dem Zebrafisch (Dufourcq *et al.* 2004). Stark homologe Proteine wurden auch aus *Drosophila* (Nolo *et al.* 2000) und *Caenorhabditis elegans* (Jia *et al.* 1997) isoliert und als Senseless bzw. Pag-3 bezeichnet. Ein sehr eng mit Gfi1 verwandtes Gen, das als Gfi1b bezeichnet wird, wurde 1998 von einer Gruppe aus humanem Nabelschnurblut isoliert und von einer anderen in einer Maus-cDNA-Bibliothek entdeckt (Rödel *et al.* 1998; Tong *et al.* 1998).

1.1.1 Struktur von Gfi1 und Gfi1b

Strukturell sind sich Gfi1b und Gfi1 sehr ähnlich (Abb.1.1). Beide weisen am N-Terminus eine sogenannte SNAG-Domäne auf (Zweidler-Mckay *et al.* 1996; Tong *et al.* 1998), die in ihrer Aminosäuresequenz zu 90% identisch ist (Grimes *et al.* 1996); die Bezeichnung SNAG resultiert aus dem Vorhandensein dieser Domäne in der Snail-Slug Proteinfamilie, die mit Gfi1 eng verwandt ist (Snail/Gfi1-SNAG). Verantwortlich ist die SNAG-Domäne für die Fähigkeit beider Gfi1-Proteine als positionsunabhängige transkriptionelle Repressoren zu wirken. Wichtig für die Funktionalität dieser Domäne scheint die Aminosäure Prolin an Position zwei zu sein (Abb.1.1). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass eine Mutation, welche zu einem Austausch dieses Prolins gegen ein Alanin (P2A) führt, den Verlust der transkriptionellen Repressoraktivität zur Folge hat (Grimes *et al.* 1996; Zweidler-Mckay *et al.* 1996).



Abb. 1.1: Schematischer Aufbau der Gfi1 und Gfi1b Proteine, sowie der Gfi1 Mutante mit einer P2A Mutation in der SNAG-Domäne (Mitte). Die 20 Aminosäuren umfassende, N-terminale SNAG-Domäne ist grün hervorgehoben. Die am C-Terminus befindlichen sechs Zinkfingerdomänen (blau) weisen eine zu 97% identische Aminosäuresequenz auf. Die dargestellte P2A Mutation hat den vollkommenen Verlust der transkriptionellen Repressoraktivität zur Folge.

Auch die Sequenzen der C-terminalen Bereiche von Gfi1 und Gfi1b sind in ihrer Sequenz fast identisch. An ihrem carboxyl-Ende besitzen beide Gfi1 Proteine sechs bis zu 97% identische C₂H₂-Zinkfinger, die ihnen die Fähigkeit zur sequenzspezifischen DNA-Bindung verleihen. Mutationsstudien, in denen einzelne Zinkfinger deletiert wurden, zeigten, dass für die DNA-Bindung der Proteine insbesondere die Zinkfinger drei bis fünf essentiell sind (Zweidler-Mckay *et al.* 1996).

Im Gegensatz dazu weist die Region zwischen SNAG-Domäne und den sechs Zinkfingern keine nennenswerte Übereinstimmung in der Sequenz auf und ist bislang auch nur

sehr wenig charakterisiert. Bislang wurde die Funktion dieser intermediären Region in zwei Untersuchungen beschrieben, wobei man für den Mittelteil des Proteins eine Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen vermutet.

In der ersten Studie konnte eine Interaktion von Gfi1 mit PIAS3 (protein inhibitor of activated STAT3) gezeigt werden, welche die intermediäre Region, d.h. die Aminosäuren 20-257 von Gfi1, benötigt (Rödel *et al.* 2000). PIAS3 ist in der Lage, an aktivierte, phosphorylierte STAT3 (*signal transducers and activators of transcription*) Dimere zu binden und damit für eine Abnahme der STAT3-Aktivität zu sorgen; STAT3 selbst fungiert als transkriptioneller Transaktivator (Chung *et al.* 1997). Interagiert Gfi1 mit PIAS3, so führt dies zu einer Aktivierung des STAT3 Signalweges, da die inhibierende Wirkung, die PIAS3 normalerweise auf STAT3 ausübt, durch Gfi1 aufgehoben wird (Rödel *et al.* 2000).

In der zweiten Studie wurde eine Interaktion zwischen Gfi1 und Ataxin-1 über die intermediäre Domäne von Gfi1 und die AXH-Domäne von Ataxin-1 postuliert (Tsuda *et al.* 2005). Tsuda und Mitarbeiter gehen davon aus, dass diese Interaktion dazu führen könnte, die Degradation von Gfi1 durch das Proteasom zu beschleunigen und so Gfi1 indirekt eine Rolle in der Pathogenese der spinocerebellären Ataxie Typ 1 spielen könnte (Tsuda *et al.* 2005).

1.1.2 Expression von Gfi1 und Gfi1b

Das Expressionsmuster von Gfi1 und Gfi1b kann in großen Teilen als komplementär bezeichnet werden; nur in wenigen Zelltypen werden beide Proteine coexprimiert (Duan and Horwitz 2003; Möröy 2005).

Gfi1 ist besonders stark im Thymus exprimiert; es kann schon in T-Zellvorläufern in einem sehr frühen Stadium der T-Lymphozytenentwicklung detektiert werden und wird bis zur Entwicklung von Zellen, die CD4- und CD8- Marker auf ihrer Oberfläche besitzen, exprimiert (Schmidt *et al.* 1998b; Karsunky *et al.* 2002). In reifen, CD4 oder CD8 positiven Zellen geht die Expression von Gfi1 stark zurück, ist aber noch messbar; in B-Zellen ist dagegen keine messbare Gfi1-Expression vorhanden (Yücel *et al.* 2004). Durch Stimulierung des T-Zellrezeptors kann eine Gfi1-Expression in diesen Zellen aber sehr schnell induziert werden (Karsunky *et al.* 2002; Doan *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu ist Gfi1b im Thymus kaum nachweisbar (Tong *et al.* 1998); es wurde bisher nur in einer Studie beschrieben, dass eine Gfi1b-Expression in einem frühen Stadium der Thymozytenentwicklung detektiert werden konnte (Doan *et al.* 2003).

Eine besonders starke Expression des Gfi1b Proteins zeigte sich in Western-Blot-Analysen von Milz und Knochenmark (Tong *et al.* 1998); hier ist die Expression beider Gfi1-

Proteine nicht komplementär, denn in den B-Zellvorläufern in der Milz und im Knochenmark kann auch eine Expression von Gfi1 nachgewiesen werden, jedoch ist ein Gfi1-Nachweis in reifen ruhenden B-Zellen nur nach einer Stimulation der Zellen möglich (Yücel *et al.* 2004).

Einzelne Zelltypen im Knochenmark, wie die hämatopoetischen Stammzellen (HSC; Abb.1.2) weisen ebenfalls eine Coexpression beider Proteine auf. In den meisten Knochenmarkszellen ist die Expression von Gfi1 und Gfi1b jedoch komplementär: Während eine starke Expression von Gfi1 in den Vorläuferzellen der lymphoiden Entwicklungsreihe (CLPs; Abb.1.2), in den Vorläuferzellen der Granulozyten und Makrophagen (GMP; Abb.1.2) sowie in den reifen Granulozyten detektierbar ist (Karsunky *et al.* 2002; Zeng *et al.* 2004; Hock *et al.* 2004), kann Gfi1b weder in CLPs, GMPs noch in den ausgereiften Zellen der myeloiden Reifungsreihe nachgewiesen werden.

Eine besonders starke Expression von Gfi1b findet man in den allgemeinen Vorläuferzellen der myeloiden Entwicklungslinie (CMP; Abb.1.2) wie in denen der Erythrozyten und Megakaryozyten (MEP; Saleque *et al.* 2002; Vassen *et al.* in Vorbereitung); Gfi1 ist dagegen während der gesamten Erythropoese nicht exprimiert (Abb.1.2).

Eine Gfi1 Expression außerhalb des hämatopoetischen Systems wurde in Vorläuferzellen sensorischer Neurone, in der Retina, bestimmten Zellen der Lunge und im zentralen Nervensystem beschrieben (Wallis *et al.* 2003; Hertzano *et al.* 2004; Jin *et al.* 2006 im Druck). Das Vorhandensein einer Expression von Gfi1b in sensorischen Geweben wurde hingegen bisher nicht näher untersucht.

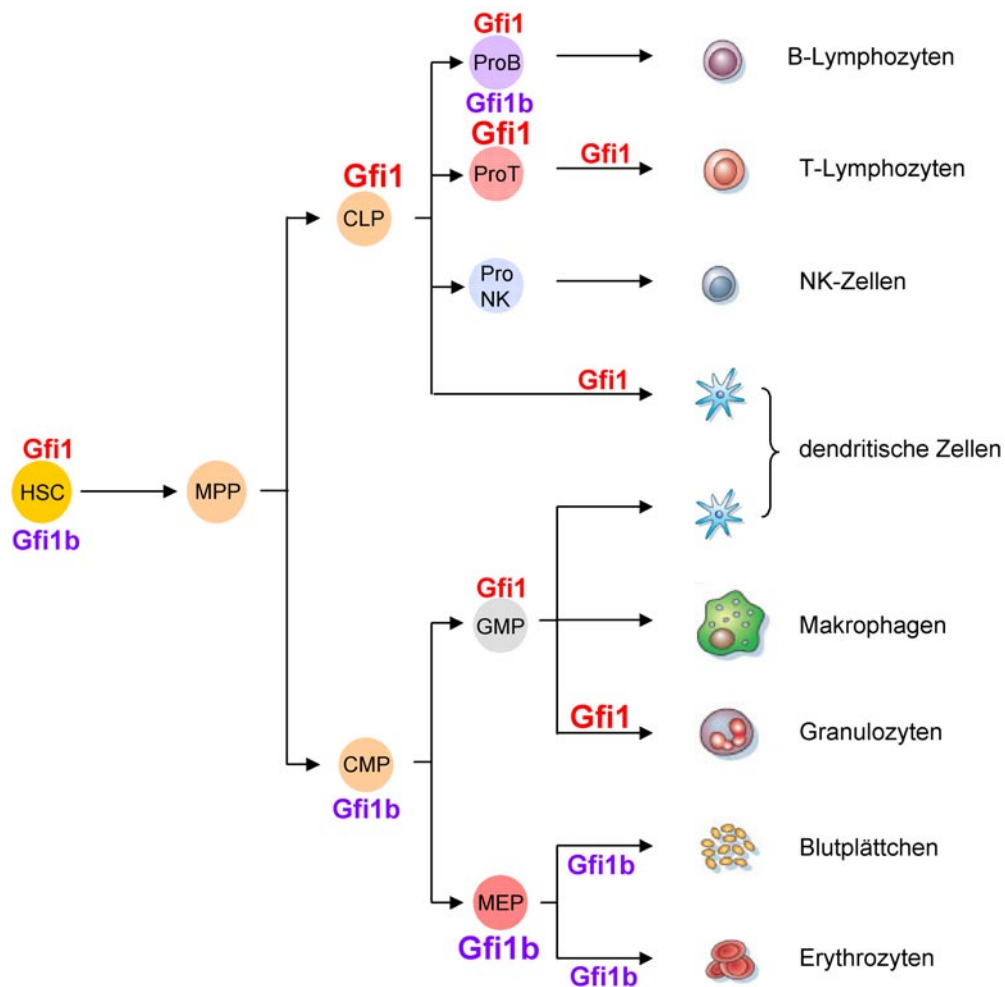


Abb. 1.2: Komplementäre Expression von Gfi1 und Gfi1b während der Hämatopoese. Die Abkürzungen bedeuten im Einzelnen: HSC: *hematopoetic stem cells*, hämatopoetische Stammzellen; CLP: *common lymphoid progenitor*, die Vorläuferzelle der lymphoiden Entwicklungslinie, CMP: *common myeloid progenitor*, die Vorläuferzelle der myeloiden Entwicklungslinie, GMP: *granulocyte macrophage progenitor*, die Vorläuferzelle der Granulozyten sowie Makrophagen; MEP: *megakaryocyte erythrocyte progenitor*, die Vorläuferzelle der Megakaryozyten und Erythrozyten. Während Gfi1 besonders während der T-Lymphozyten- sowie Granulozyten-Entwicklung eine Rolle spielt, ist Gfi1b wichtig für die Differenzierung zu Erythrozyten und Blutplättchen.

Obwohl sich Gfi1 und Gfi1b strukturell sehr ähnlich sind und man z.B. durch die Tatsache, dass beide gleiche DNA-Erkennungssequenzen besitzen, vermuten würde, dass sie auch ähnliche Funktionen besitzen, deutet die sehr unterschiedliche Expression beider Proteine darauf hin, dass Gfi1 und Gfi1b verschiedene Aufgaben in den einzelnen Geweben übernehmen könnten. Studien mit Mäusen, die defizient für Gfi1 oder Gfi1b sind, zeigen, dass der Verlust dieser beiden Transkriptionsfaktoren sehr unterschiedliche Folgen hat.

1.1.3 Der Phänotyp Gfi1 defizienter Mäuse

Karsunky und Mitarbeitern gelang es 2002 erstmals, eine Gfi1 defiziente Maus zu generieren (Karsunky *et al.* 2002). Kurz darauf beschrieb auch eine andere Arbeitsgruppe die Herstellung und den Phänotyp der Gfi1-Verlustmutanten (*knock out* Mäuse) (Hock *et al.* 2003). Der Verlust von Gfi1 führt in der Maus zu einer starken Neutropenie; die Tiere weisen eine extrem verminderte Anzahl neutrophiler Granulozyten auf, die sich in durchflußzytometrischen Messungen durch das Vorhandensein der Oberflächenmoleküle Mac-1 und Gr-1 charakterisieren lassen. Im Blut sowie im Knochenmark dieser Mäuse akkumulieren unreife, monozytäre Zellen, die eine niedrigere Expression von Mac-1 und Gr-1 aufweisen (Karsunky *et al.* 2002; Hock *et al.* 2003). Insgesamt kommt es zu einer Verschiebung der Blutzellenentwicklung zugunsten der Differenzierung zu Monozyten und Makrophagen. Dies resultiert entweder aus einer Blockade der Granulopoese oder ist das Ergebnis einer bevorzugten Differenzierung der Stammzellen zu Monozyten und Makrophagen. Die genauere Betrachtung der Morphologie dieser angereicherten Zellen läßt keine eindeutige Charakterisierung zu; sie werden als atypische, myeloide Zellen bezeichnet (Karsunky *et al.* 2002; Hock *et al.* 2003). Eine Behandlung dieser Zellen mit dem Wachstumsfaktor G-CSF (granulozytenkoloniestimulierender Faktor), die in der Zellkultur die Reifung von Granulozyten hervorrufen sollte, deutet zwar zunächst auf eine beginnende Granulopoese hin, jedoch sind die myeloiden Vorläuferzellen der Gfi1 defizienten Mäuse nicht in der Lage, die vollständige neutrophile Differenzierung zu durchlaufen. Das Ungleichgewicht zwischen fehlenden Granulozyten, die Teil des unspezifischen Abwehrsystems des Körpers sind, und einer Anhäufung von myeloiden Vorläuferzellen führt zu einem geschwächten Immunsystem dieser Mäuse; sie sind extrem anfällig für Infektionen. Diese Infektionsanfälligkeit wird auch als Ursache für die geringe Lebenserwartung, die in den ersten Generationen der Gfi1 defizienten Mäuse beobachtet wurde, verantwortlich gemacht. Die Lebenserwartung lag zu Beginn bei zwei bis drei Monaten (gesunde Mäuse werden durchschnittlich drei Jahre alt); inzwischen konnte sie jedoch durch verbesserte Haltungsbedingungen erheblich erhöht werden.

Wie schon die besonders hohe Expression von Gfi1 im Thymus vermuten läßt, ist dort der Verlust des Proteins mit einem sehr starken Phänotyp verbunden. Die Gesamt-Thy-mozytenzahl Gfi1 defizienter Mäuse ist auf bis zu 10% der für Wildtyp-Mäuse beschriebenen Anzahl reduziert (Karsunky *et al.* 2002; Hock *et al.* 2003; Yücel *et al.* 2003). Zurückzuführen ist dieser Defekt auf eine erhöhte Zelltodrate, einen Proliferationsverlust und auf eine Störung in der Entwicklung der sehr frühen T-Lymphozyten. Charakterisiert werden können diese frühen T-Lymphozytenvorläuferzellen durch eine hohe c-Kit Ex-

pression und eine noch fehlende Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8; es handelt sich um die ersten zytokinabhängigen T-Lymphozyten, deren T-Zellrezeptor β -Lokus noch nicht einer vollständigen V(D)J Umlagerung unterzogen wurde und die noch nicht selektioniert wurden. Außerdem zeigen Mäuse mit einer Gfi1 Defizienz eine erhöhte Zahl an CD8 einzelpositiven Zellen; Gfi1 spielt dementsprechend eine Rolle im Prozess der positiv-negativ Selektion von T-Lymphozyten und der CD4/CD8 Linienentscheidung (Yücel *et al.* 2003).

Für die Funktionalität von hämatopoetischen Stammzellen ist Gfi1 ebenfalls von großer Bedeutung. In Gfi1 defizienten Mäusen ist die Anzahl hämatopoetischer Stammzellen und allgemeiner, lymphoider sowie myeloider Vorläuferzellen (CLPs und CMPs; Abb.1.2) signifikant reduziert. Knochenmark-Transplantationsexperimente mit diesen Mäusen zeigten, dass Gfi1 die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen beeinflusst und ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung reguliert. Transplantierte hämatopoetische Stammzellen der Gfi1 defizienten Tiere zeigten eine starke Beeinträchtigung der Fähigkeit, die Myelo- und Lymphopoese in den Rezipienten zu gewährleisten, wenn gleichzeitig andere Zellen in Konkurrenz mittransplantiert wurden; die beobachteten Defizite in der Hämatopoese der Gfi1 *knock out* Mäuse sind zellautonom (Hock *et al.* 2004; Zeng *et al.* 2004).

In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung Gfi1 defizienter Mäuse wurde Gfi1 als wichtiger Transkriptionsfaktor für die Entwicklung und Funktion dendritischer Zellen beschrieben (Rathinam *et al.* 2005). Gfi1 Verlustmutanten zeigen eine generelle Reduktion myeloider und lymphoider dendritischer Zellen in allen lymphatischen Organen; die Zahl der epidermalen Langerhanszellen ist dagegen erhöht. Zu den funktionellen Defekten der dendritischen Zellen Gfi1 defizienter Mäuse gehören eine Reifungsstörung und eine erhöhte Zytokinproduktion. Es wurde gezeigt, dass hämatopoetische Stammzellen von Gfi1 *knock out* Mäusen *in vitro* nicht zu dendritischen Zellen differenzieren, sondern sich stattdessen zu Makrophagen entwickeln (Rathinam *et al.* 2005).

Wie schon die Expression von Gfi1 außerhalb des hämatopoetischen Systems vermuten läßt, weisen Mäuse, denen Gfi1 fehlt, weitere starke Defizite auf. Ihr Verhalten ist auffällig: Durch eine Anomalie des Innenohrs sind sie ataxisch; sie drehen sich im Kreis und wippen mit dem Kopf. Außerdem reagieren sie nicht auf Geräusche. In Gfi1 defizienten Mäusen werden zwar Innenohr-Haarzellen im Vestibulum und in der Cochlea gebildet, diese scheinen jedoch nicht normal zu funktionieren. Die äußeren Haarzellen in der Cochlea sind nicht richtig innerviert und exprimieren neuronale Marker, die normalerweise nicht in diesen Zellen exprimiert werden. Außerdem verlieren Gfi1 defiziente Mäu-

se kurz vor oder direkt nach der Geburt alle vorhandenen Haarzellen aufgrund von Apoptose (Wallis *et al.* 2003; Hertzano *et al.* 2004).

Erst vor einigen Monaten wurde ein Defekt im Darm der *Gfi1 knock out* Mäuse entdeckt (Shroyer *et al.* 2005): Der *Gfi1*-Verlust führt zum Verlust von Panethzellen des Dünndarms, die antimikrobielle Peptide absondern. Außerdem sind weniger Becherzellen, die eine Funktion als schleimbildende Drüsenzellen im Darmepithel besitzen, vorhanden. Die Anzahl an entero-endokrinen Zellen ist dagegen erhöht.

Auch im ZNS scheint der Verlust von *Gfi1* schwerwiegende Auswirkungen zu haben. In einem Alter von sechs Monaten weisen die Kleinhirne der *Gfi1* defizienten Tiere einen starken Verlust von Purkinjezellen auf, der mit dem Purkinjezell-spezifischen Phänotyp bei SCA-1 (spinocerebelläre Ataxie Typ 1) in Zusammenhang gebracht wird (Tsuda *et al.* 2005).

1.1.4 Gfi1-Mutationen in Neutropenie-Patienten

Unter einer Neutropenie versteht man den Mangel an neutrophilen Granulozyten. Während im Normalfall die Anzahl neutrophiler Granulozyten bei ca. 3000-9000 Zellen/ μ l Blut liegt, sinkt diese Zahl bei einer Neutropenie auf unter 1000 Zellen/ μ l Blut. Als Hauptursache für humane erbliche Neutropenie-Erkrankungen werden Mutationen in dem Gen, das für die neutrophile Elastase (ELA2) codiert, angesehen (Horwitz *et al.* 1999; Dale *et al.* 2000). In neueren Mutationsstudien wurden Neutropenie-verursachende erbliche *Gfi1* Mutationen beschrieben, die die sonst von *Gfi1* ausgeführte Repression der neutrophilen Elastase (ELA2) aufheben (Person *et al.* 2003). Diese Mutationen betreffen den fünften bzw. sechsten Zinkfinger des *Gfi1*-Proteins. Die beschriebene Mutation im fünften Zinkfinger, ein N382S Austausch, wurde in einem vier Monate alten Jungen, seinem Halbbruder väterlicherseits und seinem Vater gefunden. Es wurde gezeigt, dass die entsprechende Mutation zu einem Verlust der DNA-Bindefähigkeit von *Gfi1* führt. Alle drei betroffenen Personen leiden unter Neutropenie und ähneln insoweit dem Phänotyp der *Gfi1* defizienten Mäuse. Die zweite beschriebene Mutation, ein K403R Austausch, betrifft den sechsten Zinkfinger. Diese Mutation wurde bei einer 66 jährigen Frau mit einer nicht immunen chronisch idiopathischen Neutropenie beschrieben (Person *et al.* 2003). Da der sechste Zinkfinger nicht für die DNA-Bindung des Proteins essentiell ist, könnte die Mutation zu einem Verlust von Protein-Interaktionen zwischen *Gfi1* und potentiellen Partnern führen. Die besondere Bedeutung der Aminosäuren, die durch die beschriebenen Mutationen ausgetauscht werden, wird auch deutlich in der Konservierung

dieser Aminosäuren in den Gfi1-Protein-Formen verschiedener Spezies und im Gfi1b-Protein (Person *et al.* 2003).

1.1.5 Der Phänotyp Gfi1b defizienter Mäuse

Während Gfi1 defiziente Mäuse lebensfähig sind, führt der Verlust von Gfi1b zu einem Tod der Tiere am Tag 15 der Embryonalentwicklung. Die Reifung primitiver Erythrozyten ist durch eine Gfi1b-Defizienz verzögert, und der Tod der Mäuse ist die Folge der Unfähigkeit, funktionsfähige Erythrozyten zu bilden. In der fötalen Leber dieser Tiere akkumulieren erythrozytäre und megakaryozytäre Vorläuferzellen, die in ihrer Entwicklung blockiert sind (Saleque *et al.* 2002).

In Abwesenheit von Gfi1b entwickeln sich primitive erythrozytäre Zellen im Dottersack; sie sind jedoch morphologisch anormal. Da diese primitiven roten Blutkörperchen eine ausreichende Sauerstoff-Versorgung gewährleisten, sind die Embryonen im frühen Stadium bis zum Tag 14 der Embryonalentwicklung lebensfähig. Der Bedarf an Gfi1b in der adulten Erythropoese ist dagegen größer. In Abwesenheit von Gfi1b werden keine kernlosen Erythrozyten gebildet, und die Reifung der Erythrozytenvorläufer in der fötalen Leber erfolgt nur unzureichend. Embryonen leiden daher während des Entwicklungsstadiums, in dem sie noch eine fötale Leber besitzen, unter einer Anämie. Es ist jedoch nicht nur die Erythrozytenentwicklung gestört. Die Differenzierung zu Megakaryozyten, die aus der gleichen Vorläuferzelle wie die Erythrozyten hervorgehen (Orkin 2000), ist ebenfalls in Abwesenheit von Gfi1b gehemmt. Bei einer Gfi1b Defizienz proliferieren mutmaßliche megakaryozytäre Vorläufer in Anwesenheit von Thrombopoietin, aber eine Reifung bleibt aus. Gfi1b scheint daher in späteren Stadien der Megakaryozytenreifung unentbehrlich zu sein. Die myeloide Entwicklung verläuft hingegen normal (Saleque *et al.* 2002).

1.1.6 Zielgene von Gfi1 und Gfi1b

Während man durch gezieltes Ausschalten eines Gens seine Funktion in einem Organismus feststellen kann, trägt die Identifizierung von *in vivo* Zielgenen dazu bei, die Mechanismen aufzudecken, mit denen das zu untersuchende Gen auf verschiedene Prozesse Einfluß nimmt.

In vivo Zielgene von Gfi1b sind bisher nicht ausführlich beschrieben worden. Es wurde gezeigt, dass Gfi1b die Differenzierung myeloider Zellen hemmt, indem es reprimierend auf den p21^{WAF1} Promotor wirkt (Tong *et al.* 1998). Unklar ist jedoch, inwieweit diese Beobachtung eine Relevanz für die Hämatopoese hat, da die RNA Expression von p21

in Kolonien von fötaler Leber Gfi1b defizienter Mäuse nicht signifikant verändert war (Saleque *et al.* 2002).

Im Vergleich dazu ist die Suche nach Zielgenen von Gfi1 weiter fortgeschritten. Das erste, 1996 beschriebene, Gfi1-Zielgen war der proapoptotische Faktor Bax, der von Gfi1 direkt reprimiert wurde (Grimes *et al.* 1996). Zur Identifikation weiterer *in vivo* Zielgene von Gfi1 ist 2003 eine Chromatin-Immunopräzipitation durchgeführt worden, die 16 Zielgene hervorbrachte (Duan und Horwitz 2003); darunter Zellzyklus-Regulatoren, Transkriptionsfaktoren, Granulozyten-spezifische Marker, Zytokine und terminale Marker der myeloiden Differenzierung.

Unter diesen Genen spielt ELA2 in der neutrophilen Differenzierung eine zentrale Rolle. Die Gene, die für die Transkriptionsfaktoren C/EBP α , C/EBP ϵ und Ets2 codieren, wurden als essentiell für die Granulopoese beschrieben. E2F5, E2F6, Ets2, c-Myc und p21^{Waf1} sind Zellzyklus-Regulatoren. Es ist daher naheliegend, dass Gfi1 die Granulopoese durch die Regulation anderer essentieller Transkriptionsfaktoren wie auch Zellzyklus-Faktoren kontrolliert.

In einer weiteren Studie wurden mRNA Expressionsprofile von CD4/CD8 doppelt positiven T-Lymphozyten von Wildtyp und Gfi1 defizienten Tieren verglichen. Hierbei waren die Gene für den LKLF Transkriptionsfaktor (*lung krüppel like factor*), Gene für die Helix-Loop-Helix Proteine Id1 (*Inhibitor of DNA-binding1*) und Id2, der Transkriptionsfaktor Maf-1 und das Adapterprotein Traf-5 signifikant in ihrer Expression verändert (Yücel *et al.* 2003).

Nachdem zunächst gezeigt wurde, dass Gfi1 seine eigene Expression regulieren und DNA-Bindestellen am eigenen Promoter besetzen kann (Doan *et al.* 2003; Yücel *et al.* 2004), wurde auch für Gfi1b gezeigt, dass das Gfi1b-Gen unter der Kontrolle einer autoregulatorischen Rückkopplungsschleife steht und die eigene Transkription vermindert (Vassen *et al.* 2005).

1.1.7 Atonal und Math1

Das zu Gfi1 homologe Zinkfingerprotein in Drosophila, Senseless, ist essentiell für das Überleben der Vorläuferzellen der Sinnesorgane (Nolo *et al.* 2000); diese sind wiederum abhängig von der Expression proneuraler Gene wie Atonal (Ben-Arie *et al.* 1996), einem bHLH Protein, das für das gesamte Mechanorezeptororgan in Drosophila wichtig ist. Ohne Atonal kann der sogenannte CHO-Apparates nicht mehr gebildet werden, da es zum Verlust der hierzu gehörigen Vorläuferzelle kommt (Jarman *et al.* 1993).

Dieser CHO-Apparat (chordonales Organ) übernimmt ähnliche Funktionen wie die Haarzellen des Gleichgewichtsorgans und des Gehörs bei Vertebraten.

Das zu Atonal homologe bHLH Protein in der Maus wird als Math1 (mouse atonal ho-molog) bezeichnet. Math1 wird während der Entwicklung von Haarzellen bei Mäusen exprimiert und ist für diese essentiell (Wallis *et al.* 2003). Anders als im Fall von Atonal führt der Verlust von Math1 nicht zu einem kompletten Verlust des sensorischen Apparates im Ohr. Mäusen, die defizient für Math1 sind, fehlt nur einer von drei Zelltypen, die den sensorischen Komplex ausmachen: Die Haarzellen im Gleichgewichtsorgan und in der Cochlea. Die Neurone, die Synapsen zu den Haarzellen und den Stützzellen bilden, sind dagegen intakt (Bermingham *et al.* 1999). Die durch den Math1-Verlust hervorgerufenen Defekte können durch Expression von Atonal aufgehoben werden (Bermingham *et al.* 1999; Wang *et al.* 2002).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Beteiligung der einzelnen Domänen des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Gfi1 (*Growth Factor Independence 1*) an dessen Funktion zu gewinnen.

Zum einen stellte sich die Frage, inwieweit die Zinkfingerproteine Gfi1 und Gfi1b eine funktionelle Homologie aufweisen. Der Aufbau beider Proteine ist sehr ähnlich; die strukturelle Homologie zeigt sich besonders in den funktionell wichtigen Domänen am N- und C-Terminus. Allerdings weisen beide Proteine verschiedene Expressionsmuster auf, was sich auch in den unterschiedlichen Phänotypen der Verlustmutanten widerspiegelt (Karsunky *et al.* 2002; Saleque *et al.* 2002; Hock *et al.* 2003).

Um herauszufinden, ob der Phänotyp, den eine Gfi1 Defizienz verursacht, durch eine Expression von Gfi1b an Stelle von Gfi1 abgeschwächt oder sogar ganz aufgehoben werden kann, wurde eine Ersatzmutante (*knock in* Mausmutante) generiert, indem die codierende Sequenz des Gfi1b Proteins direkt hinter das Startcodon in den Leserahmen des Gfi1-Gens eingefügt wurde. In der Maus führte dies zu einer ektopischen Expression von Gfi1b unter Gfi1 spezifischen Kontrollelementen.

Um einen ersten Einblick in die zu erwartenden Ergebnisse der Analyse dieser *knock in* Mäuse zu erhalten, konnten in Vorarbeiten Tiere untersucht werden, die defizient für Gfi1 sind und gleichzeitig transgenes Gfi1b exprimieren.

In einer zweiten Fragestellung wurde versucht herauszufinden, welche Funktionen des Gfi1-Proteins auf die transkriptionelle Repressoraktivität zurückzuführen sind. Zu diesem Zweck wurde eine zweite *knock in* Mausmutante hergestellt. In dieser zweiten Mausmutante wurde eine mutierte Form der codierenden Sequenz des Gfi1 Proteins in den Leserahmen des Gfi1 Gens eingebaut. Es handelt sich hier um eine Punktmutation, die auf Aminosäureebene an Position zwei des Proteins zu einem Austausch eines Prolins gegen ein Alanin führt (P2A); zuvor war herausgefunden worden, dass diese Mutation *in vitro* zum Verlust der Repressoraktivität des Gfi1 Proteins führt (Grimes *et al.* 1996; Zweidler-Mckay *et al.* 1996).

Nach Herstellung der beiden *knock in* Mausmutanten war geplant, diese mit dem bekannten Phänotyp der Gfi1 defizienten Mäuse zu vergleichen. Dazu eignen sich durchflußzytometrische Untersuchungen aller Zellen, von denen bekannt ist, dass sie in Gfi1 defizienten Mäusen in ihrer Entwicklung oder Differenzierung gestört sind. Dies sind beispielsweise T-Lymphozyten im Thymus, Granulozyten und Monozyten sowie hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark. Desweiteren kann eine morphologische Zellanalyse mit dem Blut der *knock in* Mäuse vorgenommen werden.

Da zuvor gezeigt wurde, dass Gfi1 defiziente Mäuse aufgrund von defekten Haarzellen in der Cochlea taub sind (Wallis *et al.* 2003), wurde der Frage nachgegangen, ob die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten *knock in* Mäuse hören können.

2 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei *knock in* Mausmutanten mit dem Ziel eines besseren Verständnisses der Beteiligung der einzelnen Domänen des Gfi1-Proteins an dessen Funktion hergestellt werden. In der ersten Mutante sollte das Gfi1-Gen durch den codierenden Bereich des eng verwandten Gfi1b ersetzt werden. Neben einer Untersuchung der funktionellen Homologie beider Gfi1-Proteine erlaubt diese Mutante auch eine Beurteilung der Funktion des intermediären Proteinbereichs, da beide sich gerade hier stark unterscheiden. Im zweiten Mausmodell sollte eine Punktmutation in die N-terminale SNAG-Domäne eingeführt werden, die zur Translation eines Alanins anstelle eines Pro-lins an Position zwei führt. Da diese Punktmutation in früheren Studien (Grimes *et al.* 1996; Zweidler-Mckay *et al.* 1996) bereits als Ursache für den Verlust der transkriptionellen Repression beschrieben wurde, kann mit Hilfe dieser Mausmutante beurteilt werden, welche Funktionen von Gfi1 von der reprimierenden Wirkung abhängen.

Um einen Einblick in die gegenseitige Regulation von Gfi1 und Gfi1b zu erhalten und eine potentielle Funktionsübernahme von Gfi1 durch Gfi1b bereits vor Fertigstellung der *knock in* Modelle zu prüfen, wurden in den ersten Experimenten Reporter-gen-Analysen angefertigt sowie Mäuse aus einer Kreuzung zwischen Gfi1 defizienten und Gfi1b transgenen Tieren untersucht.

2.1 Analysen zur gegenseitigen Regulation von Gfi1 und Gfi1b

Eine autoregulatorische Wirkung von Gfi1 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Möröy erstmals 2003 festgestellt und kurz danach von zwei Gruppen unabhängig voneinander publiziert (Doan *et al.* 2004; Yücel *et al.* 2004). Da Gfi1 und Gfi1b als Konsensus-Bindestelle die Sequenz TAAATCAC(A/T)GCA mit der AATC-Sequenz als essentielle Kernsequenz besitzen (Zweidler-Mckay *et al.* 1996; Tong *et al.* 1998) und diese auch in der Promotorregion beider Gene vorhanden ist, lag die Vermutung nahe, dass beide Proteine sich auch gegenseitig regulieren können. Es wurde daher der Einfluß von Gfi1b auf die Gfi1-Promotoraktivität mittels Reporter-genanalyse untersucht. Die verwendete 593 bp

stromaufwärts vom Transkriptionsstart befindliche Gfi1-Promotorregion entsprach dem zuvor von Yücel und Mitarbeitern verwendeten Bereich (Yücel *et al.* 2004). Insgesamt befinden sich dort sieben potentielle Gfi1- bzw. Gfi1b-Bindestellen. Das Luziferase exprimierende Gfi1-Promotorkonstrukt wurde in NIH3T3 Zellen mit dem Kontroll-Leervektor (pcDNA3) und einem Gfi1b-Expressionsvektor für Wildtyp-Protein oder das mutierte Protein (Abb.2.1) cotransfiziert. Zusätzlich wurde auch ein beta-Galaktosidase exprimierendes Plasmid transfiziert, welches der Kontrolle der Transfektionseffizienz diente und eine Normalisierung der gewonnenen Daten ermöglichte. Abbildung 2.1 zeigt das Ergebnis der Reporteragen-Analyse: Gfi1b war in der Lage, die Aktivität des Gfi1-Promotors in konzentrationsabhängiger Weise zu reprimieren. Ohne die Zinkfingerregion war dies nicht möglich, und auch eine durch Mutation (P2A) nicht funktionelle oder fehlende SNAG-Domäne führte zur Aufhebung der repressorischen Eigenschaft von Gfi1b auf den Gfi1-Promotor.

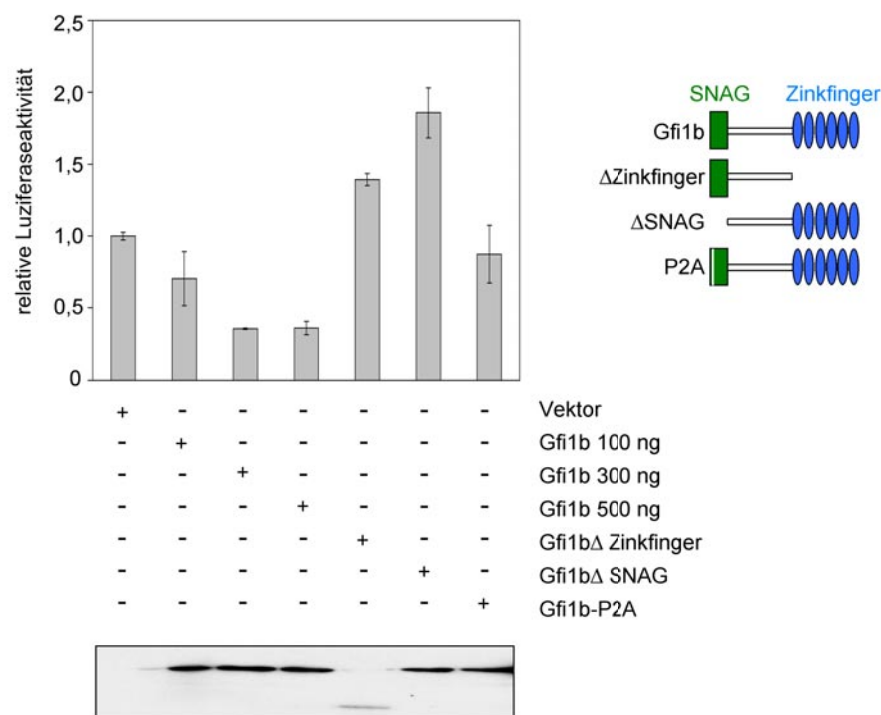


Abb. 2.1: Regulation der Gfi1-Promotoraktivität durch Gfi1b. Abgebildet ist die relative Luziferaseaktivität des Gfi1-Promotors unter Verwendung von Gfi1b (bzw. den angegebenen Mutanten). Rechts oben sind die eingesetzten Mutanten von Gfi1b schematisch dargestellt. Insgesamt wurden 1,5 µg DNA in NIH3T3 Zellen transfiziert. Die relativen Luziferaseaktivitäten wurden ermittelt, indem die normalisierte Luziferaseaktivität jedes Wertes durch den Mittelwert der Vektorkontrolle geteilt wurde. Unter dem Diagramm ist ein Western-Blot zur Protein-Expressionsbestimmung aller Lysate gezeigt, der unter Verwendung eines Gfi1b-Antikörpers angefertigt wurde.

Außerdem wurde eine modifizierte Reporter-Gen-Analyse durchgeführt, in der Wildtyp-Gfi1b-Expressionsplasmide oder mutierte Formen von Gfi1b verwendet wurden, die N-terminal mit VP16 fusioniert waren, einem transkriptionellen Aktivator des Herpes Simplex Virus (Abb.2.2).

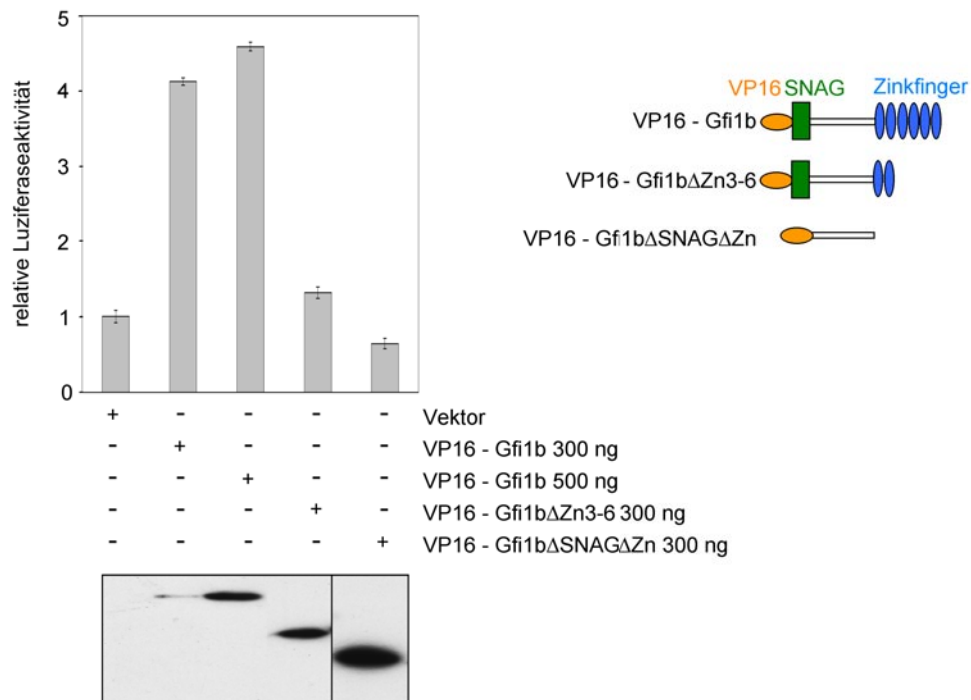


Abb. 2.2: Reporter-Gen-Analyse mit Gfi1-Promotorkonstrukt und Gfi1b-VP16-Expressionsplasmiden (rechts oben schematisch dargestellt). Die Transfektion und die Auswertung erfolgte wie in Abbildung 2.1. Das Diagramm zeigt die relative Luciferaseaktivität; eine hier erkennbare Aktivierung der Promotoraktivität durch die Expression von Wildtyp-Gfi1b entspricht der in Abbildung 2.1 gezeigten Repression. Die Expression der mit VP16 fusionierten Wildtyp-Form von Gfi1b und der Gfi1b-Mutanten wurde mittels VP16 Antikörper im Western Blot nachgewiesen (unten).

Die Ergebnisse der Reporter-Gen-Analyse sind mit einer Studie vereinbar, in der Gfi1-Bindestellen im Gfi1-Promotor mutiert wurden und in Folge dessen ein Ausbleiben der Bindung von Gfi1b an den Gfi1 Promotor gezeigt wurde (Doan *et al.* 2004).

2.2 Analysen der Gfi1:GFP x vav-Gfi1b transgenen Tiere

2.2.1 Untersuchungen zur Kreuzregulation von Gfi1 und Gfi1b

Um mittels eines Tiermodells einen ersten Eindruck des Einflusses der Gfi1b-Expression auf die Gfi1-Promotoraktivität zu bekommen, wurden Mäuse analysiert, die aus einer Kreuzung von Gfi1:GFP *knock in* und vav-Gfi1b transgenen Tieren hervorgegangen sind.

Gfi1:GFP *knock in* Mäuse exprimieren das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des Gfi1 Promotors und erlauben, die Expression von Gfi1 durch GFP-Detektion zu verfolgen; die Intensität der GFP-Fluoreszenz ist dabei proportional zur Gfi1-Expression (Yücel *et al.* 2004).

Die vav-Gfi1b transgenen Mäuse weisen eine Überexpression von Gfi1b unter Kontrolle des vav-Promotors auf, der in allen untersuchten hämatopoetischen Zellen aktiv ist (Ogilvy *et al.* 1998; Vassen *et al.* 2005).

In der folgenden Untersuchung zur gegenseitigen Regulation von Gfi1 und Gfi1b wurde die GFP-Fluoreszenzintensität von Gfi1^{+/GFP} x vav-Gfi1b transgenen Tieren mit der von Gfi1^{+/GFP} Mäusen verglichen. Es wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten aus dem Thymus sowie Mac1⁺Gr1^{lo} myeloide Zellen aus dem Knochenmark dieser Mäuse analysiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 2.3 dargestellt. In den lymphoiden Zellen der Gfi1^{+/GFP} x vav-Gfi1b transgenen Tiere zeigte sich eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität verglichen mit den Gfi1^{+/GFP} Mäusen. Dies deutete auf eine Verringerung der Gfi1-Expression hin. In den myeloiden Zellen konnte dagegen kein Einfluß der transgenen Gfi1b-Expression auf die GFP-Fluoreszenzintensität festgestellt werden.

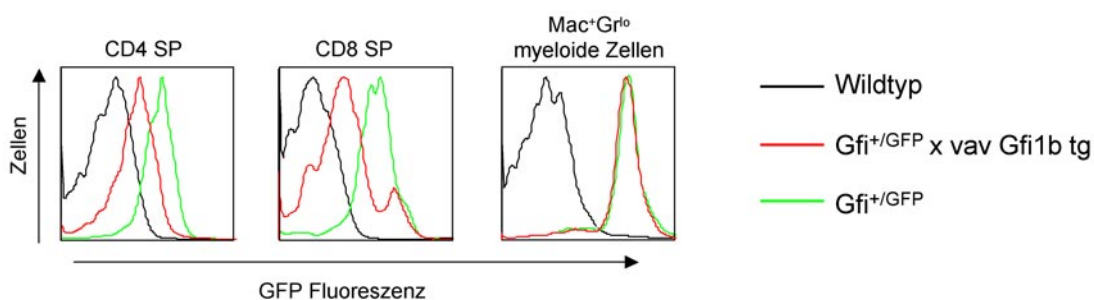


Abb. 2.3: Repression der Gfi1-Promotoraktivität durch Gfi1b *in vivo*. Detektion der GFP-Fluoreszenz mittels durchflußzytometrischer Analyse in Thymozyten von Wildtyp, Gfi1^{+/GFP} und Gfi1^{+/GFP} x vavGfi1b Mäusen. Eine Verringerung der mittleren Fluoreszenzintensität ist

in lymphoiden Zellen zu erkennen; in myeloiden Zellen hat die transgene Expression von Gfi1b keinen Effekt auf die GFP-Fluoreszenz.

2.2.2 Untersuchungen zur Kompensation des Gfi1 Verlustes durch transgenes Gfi1b

Um eine mögliche Kompensation der Gfi1-Defizienz durch Gfi1b zu untersuchen, wurden $Gfi1^{GFP/GFP} \times vav-Gfi1b$ transgene Tiere verwendet. $Gfi1^{GFP/GFP}$ *knock in* Mäuse weisen durch die Expression von GFP auf beiden Allelen den Gfi1-Verlustmutanten Phänotyp auf (Yücel *et al.* 2004).

2.2.2.1 Die Analyse des Thymus der $Gfi1^{GFP/GFP} \times vav-Gfi1b$ Mäuse

In früheren Studien, die sich mit dem Phänotyp Gfi1 defizienter Mäuse beschäftigten, wurde bereits gezeigt, dass die Reduktion der Thymozytenzahl in diesen Mäusen wahrscheinlich auf einen Defekt in der Reifung von T-Zellvorläufern zu Antigen-spezifischen T-Zellen zurückzuführen ist (Yücel *et al.* 2003). Die sehr frühen Stadien der T-Zellentwicklung können durch das Fehlen der Expression der Zelloberflächenproteine CD4 sowie CD8 bei gleichzeitiger Expression von c-Kit, dem Rezeptor für ein hämatopoetisches Zytokin (Stammzellfaktor), charakterisiert werden. Expressieren Thymozyten kein CD4 und CD8, werden sie auch als doppelt negativ (DN) bezeichnet. Um den Einfluß des transgen exprimierten Gfi1b auf den Thymus der Gfi1 defizienten Mäuse zu untersuchen, wurden im Folgenden die doppelt negativen T-Lymphozyten untersucht. Dazu wurden zunächst Thymozyten der zu untersuchenden Mäuse isoliert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD4, CD8 und c-Kit inkubiert. Während der anschließenden durchflußzytometrischen Untersuchung wurden die c-Kit positiven Thymozyten elektronisch ausgewählt und innerhalb dieser ausgewählten Population auf die Expression von CD4 und CD8 hin untersucht (Abb.2.4).

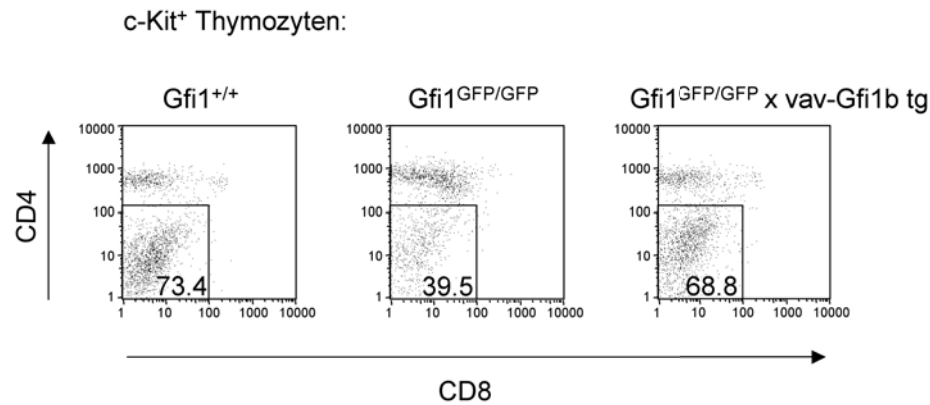


Abb. 2.4: Durchflußzytometrische Analyse von Thymozyten aus Gfi1^{+/+}, Gfi1^{GFP/GFP} und Gfi1^{GFP/GFP} x vav-Gfi1b transgenen Mäusen. Die Zellen wurden mit CD4-PE, CD8-PerCP-Cy5.5 und c-Kit-APC gefärbt. Zur Analyse wurden die c-Kit positiven Zellen nach der Messung elektronisch ausgewählt und die Expression von CD4 und CD8 im Koordinatensystem dargestellt. In den Kästchen ist der prozentuale Anteil der doppelt negativen Thymozyten aller vorhandenen c-Kit positiven Zellen angegeben.

Die Analyse zeigte, dass der Phänotyp, der durch eine Gfi1-Defizienz im Thymus hervorgerufen wurde (mittleres Bild, Abb.2.4), durch eine transgene Expression von Gfi1 unter Kontrolle des vav-Promotors nahezu aufgehoben werden konnte (rechtes Bild, Abb.2.4).

Um die doppelt negativen Thymozyten näher untersuchen zu können, wurde eine weitere durchflußzytometrische Analyse der T-Lymphozyten durchgeführt. Dazu wurden Thymozyten von Gfi1^{+/+}, Gfi1^{GFP/GFP} und Gfi1^{GFP/GFP} x vav-Gfi1b transgenen Mäusen isoliert und mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, Pan-NK, Gr-1, B220, Mac-1, Ter-119, CD25 und CD44 inkubiert. Zur Analyse der einzelnen doppelt negativen Stadien wurden alle Zellen elektronisch ausgewählt, die negativ für die Expression von CD3, CD4, CD8, Pan-NK, Gr-1, B220, Mac-1 und Ter-119 waren. Diese ausgewählte Zellpopulation wurde dann auf die Expression von CD25 und CD44 hin untersucht, da die vier verschiedenen Stadien der doppelt negativen T-Lymphozyten (DN1-DN4) durch unterschiedlich starke Expression von CD25 und CD44 charakterisiert sind.

Das Ergebnis dieser Analyse zeigt Abbildung 2.5. In den Gfi1 defizienten Tieren war wie schon in einer früheren Studie beschrieben (Yücel *et al.* 2003), eine Reduktion des DN3-Stadiums, d. h. der CD25 hoch exprimierenden und CD44 niedrig exprimierenden Zellen (CD25^{hi}CD44^{lo}) von etwa 51% auf 31% zu beobachten. Außerdem war eine zusätzliche, im Wildtyp nicht vorhandene Population von CD44 hoch exprimierenden und CD25 leicht exprimierenden Zellen detektierbar (Abb. 2.5; mittleres Bild). Die Reduktion

der CD25^{hi}CD44^{lo} exprimierenden Zellen wurde durch die transgene Expression von Gfi1b aufgehoben (Abb. 2.5; rechtes Bild). Außerdem verringerte sich durch die Transgen-Expression der prozentuale Anteil der zusätzlichen Population von 16,9% auf 6,7% (Abb.2.5; rot markiert).

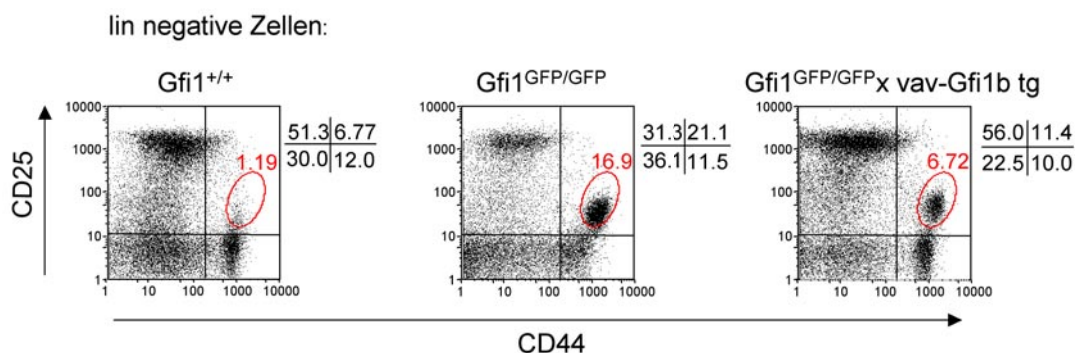


Abb. 2.5: Durchflußzytometrische Analyse von Thymozyten aus Gfi1^{+/+}, Gfi1^{GFP/GFP} und Gfi1^{GFP/GFP} x vav-Gfi1b transgenen Mäusen. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen mit biotinylierten Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, Pan-NK, Gr-1, B220, Mac-1 und Ter-119 (insgesamt als lin bezeichnet), die anschließend mit Streptavidin-PerCP-Cy5.5 markiert wurden, sowie eine Färbung der Zellen mit CD25-APC und CD44-PE. Alle PerCP-Cy5.5 negativen Zellen wurden elektronisch ausgewählt und die Expression von CD25 sowie CD44 dargestellt. Rechts neben den jeweiligen Koordinatensystemen befinden sich die prozentualen Anteile der Zellen in den einzelnen Quadranten. In Rot ist die für Gfi1 defiziente Tiere charakteristische, zusätzliche Population kenntlich gemacht.

2.2.2.2 Die Analyse des Knochenmarks der Gfi1^{GFP/GFP} x vav-Gfi1b Mäuse

Gfi1 defiziente Mäuse weisen besonders starke Defizite im Knochenmark auf; dort zeigt sich eine starke Neutropenie, d.h. ein Verlust von neutrophilen Granulozyten, sowie eine Anreicherung von Zellen mit monozytären Eigenschaften (Karsunky *et al.* 2002; Hock *et al.* 2003).

Zur Feststellung einer Neutropenie wurde in durchflußzytometrischen Untersuchungen die Expression von Gr-1 und Mac-1 analysiert. Gr-1 ist ein Granulozyten spezifischer Marker, Mac-1 ist ein Leukozytenintegrin. Gfi1 defiziente Mäuse wiesen fast keine reifen Granulozyten auf; die in der durchflußzytometrischen Analyse als Gr-1 und Mac-1 hoch exprimierende Zellen gemessen werden können (mittleres Bild der Abb.2.6). Zusätzlich zeigte die Analyse eine im Vergleich zum Wildtyp außerordentlich große Population Zellen, die weniger Gr-1 exprimieren. Diese Zellen werden als unreife myeloide Zellen oder Monozyten eingeordnet.

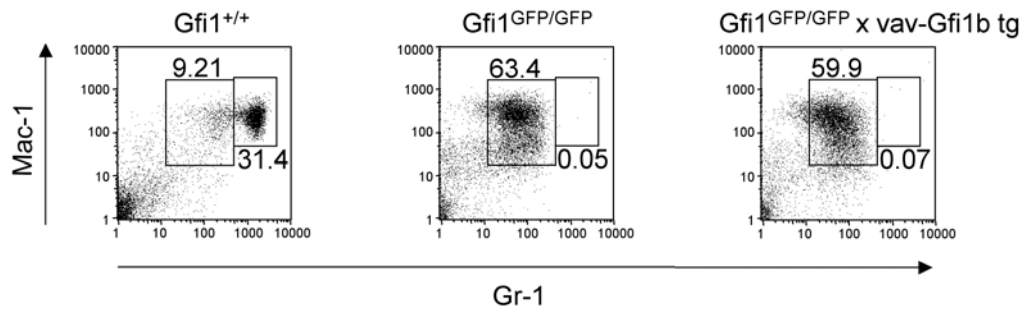


Abb. 2.6: Durchflußzytometrische Analyse von Knochenmarkzellen aus Gfi1^{+/+}, Gfi1^{GFP/GFP} und Gfi1^{GFP/GFP} x vav-Gfi1b transgenen Mäusen. In der Abbildung sind alle elektronisch ausgewählten lebenden Knochenmarkzellen zu sehen, die nach Färbung mit Mac-1-PerCP-Cy5.5 und Gr-1-FITC im FACS aufgetrennt worden sind. Der prozentuale Anteil der Granulozyten an allen lebenden Zellen ist in den Bildern unter den rechten Kästchen aufgeführt; der Anteil myeloider Zellen ist auf den linken Kästchen verzeichnet.

Im Gegensatz zum Defekt in den T-Lymphozyten im Thymus Gfi1 defizienter Mäuse, wurde die Neutropenie dieser Mäuse nicht durch eine transgene Expression von Gfi1b positiv beeinflusst. Der Verlust der reifen Granulozyten in Gfi1^{GFP/GFP} x vav-Gfi1b transgenen Tieren entsprach dem der Gfi1^{GFP/GFP} Mäuse (Abb.2.6).

2.3 Generierung der Gfi1:Gfi1b knock in Mausmutante

Die ersten Untersuchungen zur Fähigkeit von Gfi1b, Gfi1 funktionell ersetzen zu können und damit gleichzeitig eine Möglichkeit zu ermitteln, welche Rolle der intermediären Region des Proteins zukommt, wurden mit einer Mausmutante vorgenommen, die Gfi1b transgen in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Da diese transgene Expression mit der endogenen Gfi1 Expression nicht vollständig räumlich, zeitlich und quantitativ übereinstimmt und außerdem keine Expression von Gfi1b unter Kontrolle des vav-Promotors außerhalb des hämatopoetischen Systems vorhanden ist, wurde eine Gfi1:Gfi1b *knock in* Mausmutante hergestellt, die diese fehlenden Aspekte berücksichtigt.

2.3.1 Herstellung des Gfi1:Gfi1b knock in Konstruktes

Das Gfi1:Gfi1b *knock in* Konstrukt zur Herstellung einer geeigneten Mausmutante wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert, um einen Austausch eines Teils der Gfi1 Genregion durch Gfi1b mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) zu ermöglichen.

Die Strategie zur Herstellung des Konstruktes wurde analog zum bereits erwähnten Gfi1:GFP *knock in* Konstrukt aufgestellt (Yücel *et al.* 2004), da sich gezeigt hatte, dass die dort ausgewählten genomischen Bereiche für eine homologe Rekombination geeignet sind. Um an Stelle von Gfi1 das Gfi1b Protein zu exprimieren, wurde zunächst mittels überlappender PCR die für Gfi1b codierende Region der Maus amplifiziert und zugleich ein Übergang von Gfi1 zu Gfi1b ohne Leserahmenverschiebung gewährleistet. Der Austausch von Gfi1 durch die Gfi1b cDNA erfolgte beginnend hinter dem Startcodon im genomischen Bereich der Exons zwei bis fünf von Gfi1 (Abb.2.7); die stromaufwärts gelegenen regulatorischen Sequenzen des Gfi1-Lokus wurden dabei genauso wie die Exons sechs und sieben mit dem Polyadenylierungssignal und den stromabwärts gelegenen untranslatierten Regionen intakt gelassen. Zur Überprüfung einer erfolgreichen homologen Rekombination des Konstruktes in den Gfi1-Lokus wurde im langen, stromaufwärts gelegenen Arm des Konstruktes eine BamHI Schnittstelle deletiert. Der Rekombinationsvektor enthielt zwei Selektionsmarker: zum einen ein Neomycin-Resistenzgen, das als positiver Selektionsmarker fungiert, indem es nach erfolgter Integration des Gens eine Neomycin-Resistenz verleiht, auf die mittels Geneticin (G418) enthaltendem Medium selektioniert werden kann. Eingerahmt ist die Neo-Kassette von zwei loxP-Erkennungssequenzen, die gewährleisten sollen, dass das Resistenzgen nach erfolgter Selektion der positiven Klone wieder entfernt werden kann. Zum anderen enthält der Rekombinationsvektor eine Thymidinkinase-Expressionskassette als negativen Selektionsmarker. Bei zufälliger Integration der Thymidinkinase-Kassette in das Genom, führt dies zu einer Phosphorylierung des im Medium enthaltenen Ganciclovirs, welches während der S-Phase als Basenalogon eingebaut und dadurch die DNA-Replikation gestoppt wird; dies führt zum Absterben der Zelle.

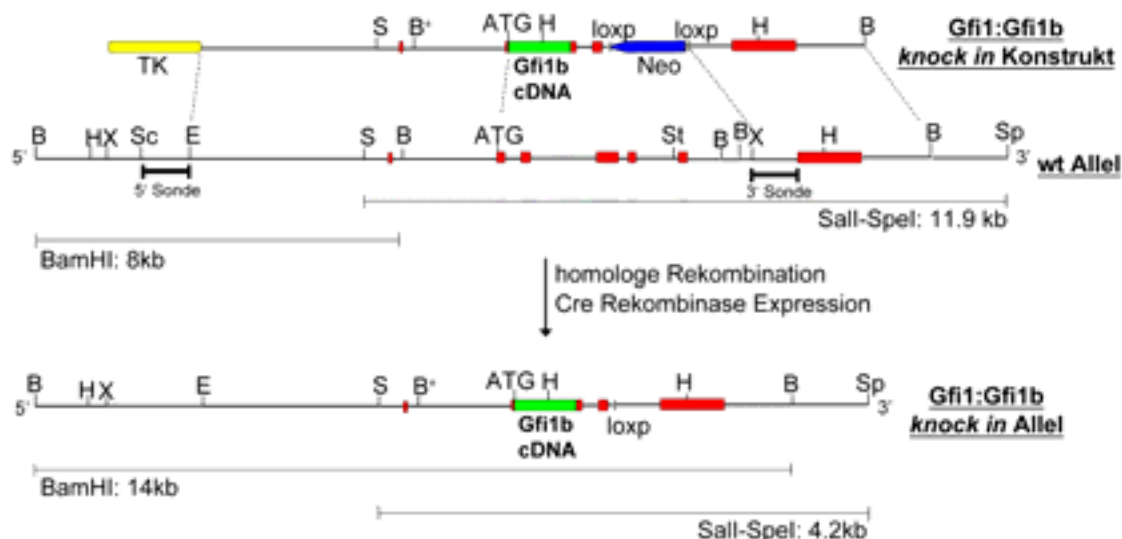


Abb. 2.7: Strategie zur Herstellung eines Gfi1:Gfi1b *knock in* Allels mittels homologer Rekombination. Dargestellt ist der Rekombinationsvektor (oben), in der Mitte der genomische Locus des Gfi1-Gens und das Gfi1:Gfi1b *knock in* Allel nach erfolgter homologer Rekombination (unten). Exons des Gfi1-Gens sind als rote Kästchen dargestellt. In grün ist der codierende Bereich des Gfi1b-Gens abgebildet. Die Thymidinkinase-Kassette befindet sich am 5'-Ende des Konstruktes (gelb). Die Neomycin-Resistenzkassette (blau) wurde in 3'-5'-Orientierung eingesetzt, um einen Einfluß der Transkription des Neo-Gens auf den Gfi1-Locus zu vermeiden. Im mittleren Teil sind die für die Genotypisierung mittels Southern Blot verwendeten Sonden dargestellt. Die Fragmentgrößen, die mit den entsprechenden Sonden nach Verdau der dargestellten Restriktionsenzyme entstehen, sind ebenfalls eingezeichnet. Im Einzelnen stehen die verwendeten Abkürzungen für: TK:Thymidinkinase, S: Sall, B* zerstörte BamHI-Erkennungssequenz, B: BamHI, H: HindIII, X: XbaI, Sc: SacI, E: EcoRI, St: Styl, Sp: SpeI, wt: Wildtyp

2.3.2 Erzeugung und Genotypisierung von ES-Zellen mit einem Gfi1:Gfi1b Allel

Zur Erzeugung von heterozygoten Gfi1:Gfi1b Zellklonen wurde der in Abbildung 2.7 dargestellte *knock in* Rekombinationsvektor mittels NotI Verdau linearisiert und in R1 embryonale Stammzellen (ES-Zellen) transfiziert. Die Zellen wurden auf embryonalen Maus-Fibroblasten (MEFs) kultiviert, die man an Tag 13.5 der Embryonalentwicklung entnommen hatte und denen die Teilungsfähigkeit durch Bestrahlung genommen wurde. Die Kultivierung auf MEFs und die Zugabe von LIF (*leukemia inhibiting factor*) enthaltendem Medium vermied die Ausdifferenzierung der embryonalen Stammzellen. Nach 7-10 tägiger Kultivierung in Selektionsmedium wurden resistente Klone gepickt und sofort trypsiniert. Während eine Hälfte der Klone auf MEFs expandiert und anschließend eingefroren wurde, wurde die andere Hälfte ohne Fibroblasten bis zur Konfluenz kultiviert und DNA isoliert. Die genomische DNA aus den ES-Klonen wurde im Anschluß daran mit BamHI gespalten, die entstandenen Fragmente mittels Agarosegel aufgetrennt und

auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der Fragmente erfolgte mit einer radioaktiv markierten Sonde, einem EcoRI-SacI-DNA-Fragment, welches sich im 5'-Bereich außerhalb des Konstruktes befand (Abb.2.7). Die Hybridisierung führte im Falle der Wildtyp-DNA zur Detektion eines 8 kb großen Fragmentes; während das durch ein rekombiniertes Allel erzeugte Fragment eine Länge von 14 kb aufwies (Abb.2.7 u. 2.8). Auf diese Weise wurde ein Klon von insgesamt 97 analysierten Klonen als „positiv“ bewertet, d.h. dort hatte die gewünschte homologe Rekombination stattgefunden. Dieser Klon wurde expandiert; die anschließende Blastozysteninjektion und die Übertragung der Blastozyste in den Uterus scheinchwangerer Weibchen wurde von Wojtek Wegrzyn durchgeführt. Die Jungtiere dieser Amme wurden auf ihren Chimärismus hin geprüft. Je höher der agoutifarbene Anteil an der Fellfarbe der Tiere ist, desto höher ist der genetische Anteil der homolog rekombinierten embryonalen Stammzellen an der Fellfarbe. Um herauszufinden, ob in den überwiegend agoutifarbenen Tieren auch eine genetische Beteiligung der homolog rekombinierten embryonalen Stammzellen in der Keimbahn vorhanden war, wurden die hochchimären Männchen mit CMV-Cre transgenen C57BL/6 Weibchen verpaart und deren Nachkommen mittels Mausschwanzbiopsie und anschließendem Southern-Blot-Verfahren genotypisiert. Die Southern-Blot-Analyse erlaubte außerdem festzustellen, ob die Nachkommen der hochchimären Männchen und CMV-Cre transgenen Weibchen das Neomycin-Resistenzgen verloren hatten; diesen Verlust sollte die Expression der Cre-Rekombinase in den CMV-Cre transgenen Mäusen herbeiführen. Zur Genotypisierung und Überprüfung des Neo-Kassettenverlustes wurde eine Spaltung der genomischen DNA aus den Schwänzen der Mäuse mit den Restriktionsenzymen SalI und SpeI durchgeführt. Für die Hybridisierung der Membran wurde die im 3'-Bereich gelegene, radioaktiv markierte XbaI-SacI Sonde verwendet (Abb.2.7). Die Detektion eines 11,9 kb großen Fragmentes entsprach in diesem Fall dem Wildtyp-Allel (Abb.2.7 u. 2.8), ein 5,6 kb großes Fragment repräsentierte das *knock in* Allel mit noch vorhandener Neomycin-Resistenzkassette. War die Neokassette deletiert, wurde ein 4,2 kb großes Fragment detektiert.

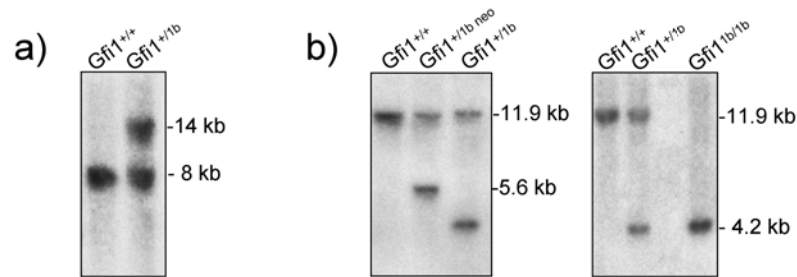


Abb. 2.8: Genotypisierung der embryonalen Stammzellen sowie der *Gfi1:Gfi1b knock in* Mäuse.
 a) Southern-Blot-Analyse eines Wildtyp-Klons, sowie eines ES-Klons mit homolog rekombiniertem *Gfi1:Gfi1b knock in* Konstrukt. Die genomische DNA wurde mit BamHI gespalten und die Fragmente unter Verwendung der 5'-gelegenen Sonde (Abb.2.7) detektiert. Das Wildtyp-Fragment war 8 kb groß; das aus dem *knock in* Allel resultierende Fragment wies eine Länge von 14 kb auf.
 b) Genotypisierung der *Gfi1:Gfi1b knock in* Mäuse mittels Southern-Blot. Die Spaltung der Mausschwanz-DNA erfolgte mit Sall und SpeI. Die Detektion der Fragmente erfolgte mittels der im 3'-Bereich liegenden Sonde (Abb.2.7). DNA aus Wildtyp-Mäusen führte zu einem 11,9 kb großen Fragment, während bei heterozygoten Mäusen zusätzlich ein 5,6 kb großes Fragment detektiert wurde. Ein 4,2 kb Fragment resultierte aus dem Verlust der Neokassette.

2.3.3 Nachweis der Protein-Expression in *Gfi1:Gfi1b knock in* Mäusen

Um die Funktionalität des *knock in* Allels in den Mäusen zu testen, wurde eine Protein-Expressionsanalyse mittels Western-Blot-Verfahren durchgeführt. Hierzu wurde der Thymus von $Gfi1^{+/+}$, $Gfi1^{+/1b}$ und $Gfi1^{1b/1b}$ Mäusen entnommen und eine Proteinoxtraktion durchgeführt. Die Funktionalität der genetischen Veränderung konnte in Thymozyten verfolgt werden, da bekannt war, dass T-Lymphozyten von Wildtyp-Mäusen eine sehr starke Expression von *Gfi1* aufweisen (Abb.2.9), wohingegen die Expression von *Gfi1b* im Thymus mittels Western-Blot-Verfahren nicht nachweisbar war (Abb.2.9). Wie erwartet, konnte in heterozygoten *Gfi1:Gfi1b knock in* Mäusen sowohl eine Expression von *Gfi1* (Abb.2.9) als auch eine Expression von *Gfi1b* (Abb.2.9) nachgewiesen werden. Ein Betrachten der homozygoten Tiere bringt die Funktionalität am besten zum Ausdruck. Bei diesen Tieren war im Thymus kein *Gfi1* mehr detektierbar, weil dies komplett durch *Gfi1b* ersetzt wurde. Dass es sich bei dem homolog rekombinierten Gen, das die *Gfi1* Expression vollkommen aufhob, tatsächlich um *Gfi1b* handelt, zeigte Abbildung 2.9 (b).

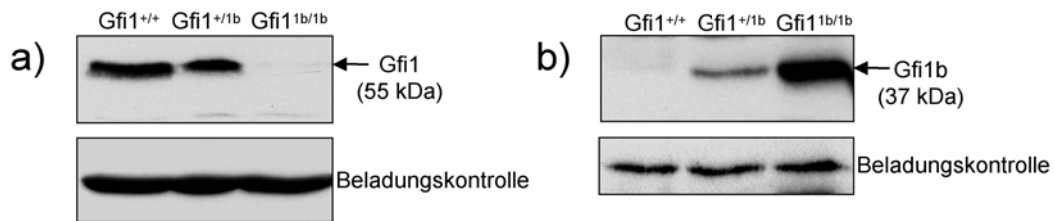


Abb. 2.9: Proteinexpressionsanalyse der Gfi1:Gfi1b *knock in* Mäuse. Western-Blot-Analysen mit Protein aus Thymozyten von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Gfi1:Gfi1b *knock in* Mäusen. a) Das obere Bild zeigt die Expression von Gfi1, während der untere Blot eine einheitliche Beladung aller drei Spuren demonstriert. b) Im oberen Bild ist die Expression von Gfi1b gezeigt; darunter befindet sich die Beladungskontrolle.

2.4 Generierung der Gfi1:P2A Mausmutante

Die Gfi1:Gfi1b *knock in* Mausmutante erlaubte zwar, neue Erkenntnisse über die Funktion und Relevanz der mittleren Proteindomäne von Gfi1 zu gewinnen, da diese zwischen beiden Proteinen nicht konserviert ist, jedoch konnte sie keinen Aufschluß über die Wichtigkeit der anderen Domänen geben. Mit dem Ziel herauszufinden, wie essentiell die N-terminale SNAG-Domäne ist, wurde eine zweite Mausmutante geschaffen. In dieser wurde in das Gfi1-Gen eine Punktmutation eingebracht. Es handelte sich um ein C zu G Austausch, der auf Aminosäureebene zur Codierung eines Alanins an Stelle eines Prolins führt. Die Auswirkung dieses Aminosäureaustausches war bereits in der Vergangenheit in mehreren Studien als sehr folgenschwer beschrieben worden (Grimes *et al.* 1996; Zweidler-Mckay *et al.* 1996); sie führte zu einem kompletten Funktionsverlust der SNAG-Domäne; in Folge dessen die Repressoraktivität des Gfi1 Proteins aufgehoben wurde.

2.4.1 Herstellung des Gfi1:P2A Konstruktes

Der zur Herstellung der Gfi1:P2A *knock in* Mausmutante benötigte Rekombinationsvektor wurde so generiert, dass analog zur Gfi1:Gfi1b *knock in* Mutante die Exons zwei bis fünf des Gfi1-Gens durch die P2A Mutante ersetzt werden konnten. Die Verwendung genomischer Bereiche gewährleistete, dass die Exon-Intron-Struktur des Gens durch die Strategie in keiner Weise verändert wurde. Als Selektionsmarker für die homologe Rekombination in der Zellkultur wurde, genauso wie unter 2.3 beschrieben, am 5'-Ende des Konstruktes eine Thymidinkinase-Kassette eingebaut. Das verwendete Neomycin-Resistenzgen unterscheidet sich jedoch von dem im Gfi1:Gfi1b Konstrukt eingesetzten da-

durch, dass es von *frt*-Erkennungssequenzen flankiert ist, die wie die *loxP*-Erkennungssequenzen einer Rekombinase das Ausschneiden der Neokassette erlauben. Zusätzlich befanden sich zwei *loxP*-Erkennungssequenzen in dem Rekombinationsvektor. Sie wurden stromaufwärts vom zweiten Exon und stromabwärts von Exon drei eingebaut und sollten die Möglichkeit offenhalten, den von beiden *loxP*-Erkennungssequenzen eingerahmten Bereich des *Gfi1*-Gens zu deletieren. Dies hätte den Verlust des *Gfi1*-Proteins zu Folge; die Mäuse würden den *Gfi1* Defizienz-Phänotyp zeigen.

Die 5'gelegene *loxP*-Erkennungssequenz ermöglichte außerdem die Genotypisierung nach der homologen Rekombination, da durch sie in den Rekombinationsvektor eine zusätzliche *HindIII*-Restriktionsschnittstelle eingefügt wurde (Abb.2.10).

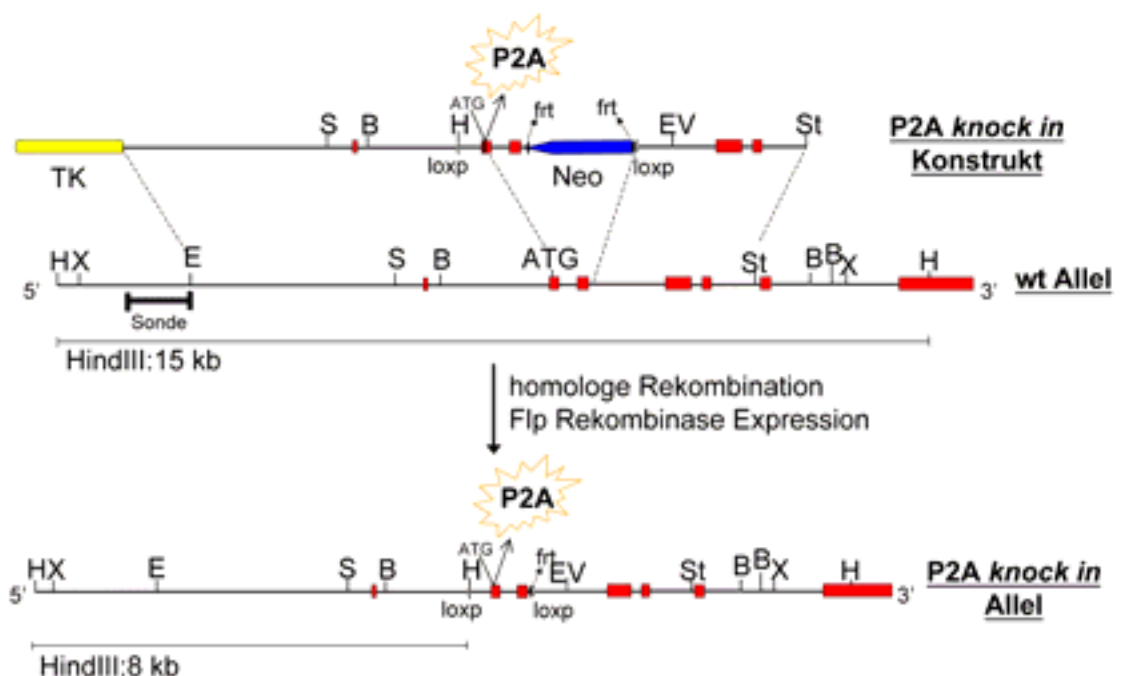


Abb. 2.10: Strategie zur Herstellung eines *Gfi1*:P2A *knock in* Allels mittels homologer Rekombination. Im oberen Teil der Abbildung ist der Rekombinationsvektor mit der P2A Punktmutation zu sehen, der nach homologer Rekombination in den genomischen Locus des *Gfi1*-Gens (Mitte), zu einem *Gfi1*:P2A *knock in* Allel (unten) führt. Alle Exons sind in rot, die Neokassette ist in blau und das Thymidinkinase-Gen ist in gelb dargestellt. Ein Ausschneiden des Neomycin-Resistenzgens erfolgte an den *frt*-Erkennungssequenzen durch Verpaarung mit Flp-Rekombinase exprimierenden Mäusen. Im mittleren Teil der Abbildung ist die 5'gelegene, externe Sonde eingezeichnet, die nach *HindIII*-Verdau die Detektion der eingezeichneten Fragmente im Southern-Blot-Verfahren erlaubt. Die Abkürzungen bedeuten: TK:Thymidinkinase, S: Sall, B: BamHI, H: HindIII, X: Xbal, Sc: SacI, E: EcoRI, EV: EcoRV, St: Styl, wt: Wildtyp

2.4.2 Erzeugung und Genotypisierung von ES-Zellen mit einem Gfi1:P2A Allel

Für die Transfektion des Gfi1:P2A *knock in* Austauschvektors in R1 embryonale Stammzellen erfolgte eine Linearisierung des Plasmids mit der Restriktionsendonuklease NotI. Die anschließende Kultivierung der Zellen wurde genauso wie bereits für das Gfi1:Gfi1b *knock in* Konstrukt, unter 2.3.2 beschrieben, durchgeführt.

Die Genotypisierung der gegen das Selektionsmedium resistenten Klone wurde unter Verwendung der in Abbildung 2.10 dargestellten EcoRI-SacI-Sonde und eines HindIII-Verdau der genomischen DNA durchgeführt. Hatten die embryonalen Stammzellen den Austauschvektor nicht homolog rekombiniert, wurde ein 15 kb großes Fragment detektiert (Abb.2.10 u. 2.11). Durch die zusätzliche HindIII-Schnittstelle im mutierten Allel war das DNA-Fragment der P2A-Mutante dagegen nur 8 kb lang (Abb.2.10 u. 2.11). Die HindIII Spaltung zeigte, dass von 213 isolierten Klonen insgesamt 2 den Austauschvektor rekombiniert hatten. Beide Klone, Nr. 168 und Nr. 197, wurden expandiert und wie unter 2.3.2 beschrieben, zur Blastozysteninjektion weiterverwendet. Die chimären Nachkommen wurden mit ROSA-Flp *knock in* Mäusen verpaart, um das Neomycin-Resistenzgen zu entfernen. Anschließend wurden heterozygote Gfi1:P2A-Mäuse miteinander verpaart, um homozygote P2A Mutanten zu erhalten, die nur noch die mutierte Form des Gfi1 Proteins besitzen (Abb.2.11).

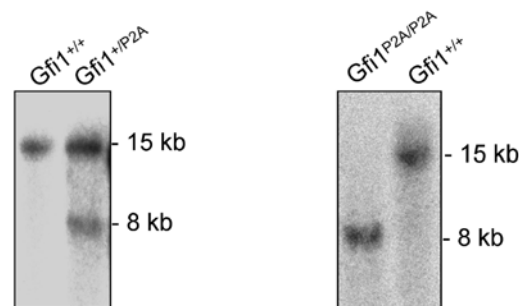


Abb. 2.11: Genotypisierung mittels Southern-Blot-Verfahren.

In der Abbildung sind Autoradiogramme nach Southern-Blot-Verfahren von genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen (links) sowie Mausschwänzen (rechts) dargestellt. Die DNA wurde in beiden Fällen mit HindIII verdaut und die Fragmente mit der 5' gelegenen Sonde detektiert (Abb.2.10). Das 15 kb große Fragment entsprach dem Wildtyp, während das 8 kb große Fragment durch die zusätzliche HindIII-Schnittstelle in der P2A-Mutante entstanden war. Im rechten Blot erkennt man den kompletten Verlust des Wildtyp-Allels in homozygoten Gfi1:P2A Mäusen.

2.4.3 Nachweis der Funktionalität des P2A Allels

Um zu überprüfen, ob wirklich nur die gewünschte Punktmutation in die *Gfi1:P2A knock in* Mäuse eingeführt wurde, erfolgte eine RNA-Isolation aus T-Lymphozyten homozygoter P2A-Mäuse, eine anschließende RT-PCR sowie eine Sequenzierung dieser cDNA. Dass es nicht zu einem Verlust eines größeren Bereiches des *Gfi1*-Gens gekommen war, zeigte schon der Größenvergleich der Wildtyp-cDNA mit der cDNA aus homozygoten P2A *knock in* Mäusen (Abb.2.12 a). Eine anschließende Sequenzierung bestätigte, dass außer der Punktmutation an Nukleotidstelle vier keine Mutation vorhanden war, die einen Aminosäureaustausch zur Folge hätte; die Transkription des Gens verlief fehlerfrei. Ob das mutierte *Gfi1*-Gen auch translatiert werden konnte, wurde in einer Western-Blot-Analyse untersucht. Dazu fand zunächst eine Proteinisolation aus *Gfi1*^{+/+}, *Gfi1*^{+P2A} und *Gfi1*^{P2A/P2A} sowie *Gfi1*^{-/-} T-Lymphozyten statt. Anschließend wurden 35 µg Protein im Gel aufgetrennt, geblottet und mit einem *Gfi1*-Antikörper inkubiert. Abbildung 2.12 (b) zeigt, dass mit Ausnahme der *Gfi1* Verlustmutante in den T-Lymphozyten aller untersuchten Genotypen *Gfi1* exprimiert wurde. Die Punktmutation führte in der *Gfi1*-mRNA nicht zu einem Verlust der Translation des mutierten *Gfi1*-Proteins. Während die *Gfi1*-Expression in *Gfi1*^{+P2A} T-Lymphozyten der des Wildtyps entsprach, war die Menge an *Gfi1*-Protein in den *Gfi1*^{P2A/P2A} Thymozyten im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht (Abb.2.12).

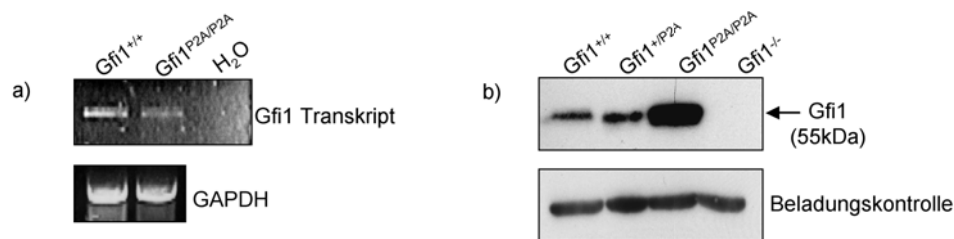


Abb. 2.12: Nachweis der korrekten Transkription und Translation der P2A Mutante von *Gfi1*.
 a) Gezeigt ist die amplifizierte cDNA aus T-Lymphozyten von *Gfi1*^{+/+} und *Gfi1*^{P2A/P2A} Mäusen. Das Amplifikat wurde mit *Gfi1* spezifischen Primern hergestellt; die Länge des Transkripts beträgt ca. 1 kb und umfaßt die gesamte codierende Region des *Gfi1*-Gens.
 b) Analyse der Proteinexpression in T-Lymphozyten von *Gfi1*^{+/+}, *Gfi1*^{+P2A} und *Gfi1*^{P2A/P2A} Mäusen (oberer Blot). In allen drei Genotypen kann eine Expression von *Gfi1* detektiert werden. Als Negativkontrolle wurde in der rechten Spur Protein aus T-Lymphozyten von *Gfi1*^{-/-} Mäusen aufgetragen. Das untere Bild zeigt die Beladungskontrolle.

2.5 Analyse des Thymus beider Mausmutanten

Die Untersuchung der beiden unter 2.3 und 2.4 beschriebenen *knock in* Mausmutanten fand parallel statt; es wurden immer ein Wildtyp ($Gfi1^{+/+}$), ein $Gfi1$ *knock out* ($Gfi1^{-/-}$) sowie die homozygoten *knock ins* ($Gfi1^{1b/1b}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$) in einer Analyse miteinander verglichen, um einer Beantwortung der Fragen nach der Ersetzbarkeit von $Gfi1$ durch $Gfi1b$ sowie der Auswirkung einer P2A Mutation im Mausmodell näher zu kommen.

Da in beiden *knock in* Mausmutanten die heterozygoten Tiere denselben Phänotyp wie die Wildtyp-Mäuse aufwiesen, sind diese nicht in den vergleichenden Untersuchungen aufgeführt.

Die erste vergleichende Analyse befasste sich mit dem Thymus. Für $Gfi1$ defiziente Mäuse sind besonders starke Defekte in der Thymozytenentwicklung beschrieben worden (Yücel *et al.* 2003). Schon die Größe des Thymus, die zu Beginn der Analysen von $Gfi1$ *knock out* Mäusen auf bis zu 10% der Normalgröße reduziert war zeigt, dass der Thymus unter dem Verlust von $Gfi1$ verändert war (Karsunky *et al.* 2002; Yücel *et al.* 2003; Hock *et al.* 2003). Nachdem die Tiere aufgrund einer Infektion mit Antibiotika behandelt wurden, konnte eine Reduktion auf 10% der Zellzahl beim Wildtyp nicht mehr festgestellt werden. Dennoch blieb die Gesamt-Thymozytenzahl der $Gfi1$ defizienten Mäuse verglichen mit der der Wildtypmäuse stark verringert (etwa 50%, Abb.2.13). Die T-Lymphozytenzahl der $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäuse war ebenfalls stark reduziert; sie war vergleichbar mit der der $Gfi1^{-/-}$ Mäuse (Abb.2.13). Die Expression von $Gfi1b$ an Stelle von $Gfi1$ scheint den Defekt teilweise kompensieren zu können; die Anzahl der Thymozyten in $Gfi1^{1b/1b}$ Mäusen war nicht signifikant geringer als im Wildtyp.

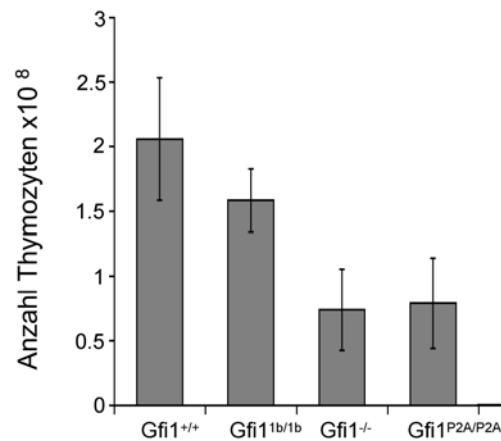


Abb. 2.13: Gesamtzahl der Thymozyten von Wildtyp, Gfi1^{b/1b}, Gfi1^{-/-} und Gfi1^{P2A/P2A} Mäusen. Zum Zeitpunkt der Thymusentnahme waren die Tiere 4-7 Wochen alt; der dargestellte Mittelwert setzt sich aus Zellzahlen von jeweils drei bis acht Tieren zusammen.

Um den Defekt in der Entwicklung der T-Lymphozyten genauer zu untersuchen, wurde wie zuvor mit den vav-Gfi1b transgenen Mäusen (unter 2.2.2.1 beschrieben) eine durchflußzytometrische Analyse mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und c-Kit durchgeführt. In dieser Färbung können T-Lymphozyten in einem frühen Entwicklungsstadium detektiert werden; diese sind positiv für c-Kit und negativ für CD4 sowie CD8 (DN:doppelt negativ).

Wie erwartet war die Anzahl der doppelt negativen Thymozyten unter den c-Kit positiven Zellen in Gfi1 defizienten Mäusen erheblich gesunken; während in Gfi1^{+/+} Mäusen 67% aller c-Kit positiven Zellen weder CD4 noch CD8 exprimierten, lag der Anteil dieser Zellen bei Verlust der Gfi1 Expression (Gfi1^{-/-}) bei ca. 25%. Trotz fehlender Gfi1 Expression war dieser Defekt in den frühen Stadien der T-Zellentwicklung in Gfi1^{b/1b} Mäusen nicht sehr ausgeprägt; hier betrug der Anteil an CD4⁻/CD8⁻/c-Kit⁺ Zellen etwa 52%. Das an Stelle von Gfi1 exprimierte Gfi1b war in der Lage, den Verlust größtenteils zu kompensieren. Die eingeführte Punktmutation in der SNAG-Domäne der Gfi1^{P2A/P2A} Mäuse schien dagegen denselben drastischen Effekt zu haben wie der komplette Verlust des Gfi1-Proteins; der Anteil doppelt negativer Zellen in allen c-Kit positiven Thymozyten betrug ebenfalls nur 25%.

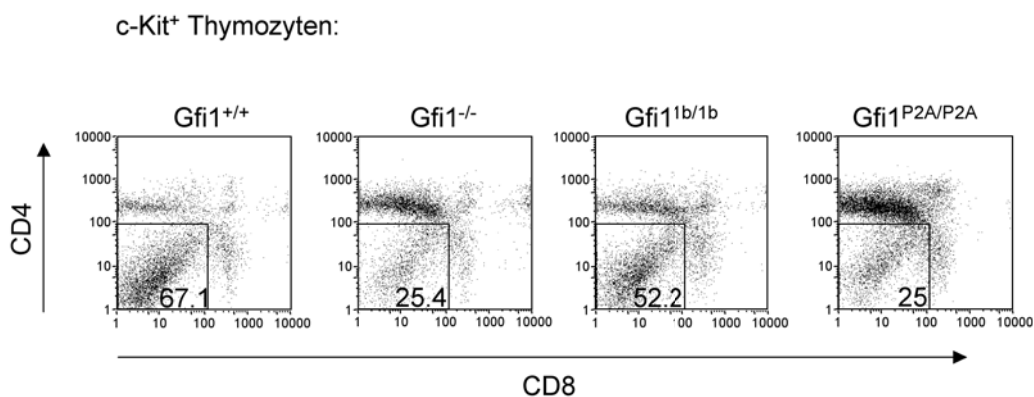


Abb. 2.14: Durchflußzytometrische Analyse von Thymozyten aus Gfi1^{+/+}, Gfi1^{-/-}, Gfi1^{1b/1b} und Gfi1^{P2A/P2A} Mäusen.

Thymozyten wurden mit CD4-PE, CD8-PerCP-Cy5.5 und c-Kit-APC inkubiert und anschließend mittels FACS analysiert. Dargestellt ist die Verteilung der Zelloberflächenproteine CD4 und CD8 auf elektronisch ausgewählten c-Kit positiven Zellen. Die in den Kästchen abgebildeten Zahlen stellen die prozentualen Anteile der doppelt negativen Zellen an allen vorhandenen c-Kit positiven Zellen dar.

Eine genauere Untersuchung der frühen, doppelt negativen Stadien in der Thymozytenentwicklung erfolgte wie zuvor mit den *vav*-Gfi1b transgenen Mäusen (2.2.2.1). Es wurden Thymozyten aus Gfi1^{+/+}, Gfi1^{-/-} und Gfi1^{1b/1b} Mäusen isoliert und wie unter 2.2.2.1 beschrieben, gefärbt. Zur Analyse der T-Lymphozyten wurden alle Zellen, die negativ für CD3, CD4, CD8, Pan-NK, Gr-1, B220, Mac-1 und Ter-119 waren, elektronisch ausgewählt und mittels Durchflußzytometer auf die Expression von CD25 und CD44 hin untersucht. Die unterschiedliche Expression von CD25 und CD44 erlaubte eine Differenzierung der einzelnen Entwicklungsstadien der doppelt negativen Thymozyten im Koordinatensystem.

In Abbildung 2.15 ist das Ergebnis dieser Analyse gezeigt. Wie erwartet waren die CD25 hoch exprimierenden und CD44 niedrig exprimierenden Zellen (CD25^{hi}CD44^{lo}) in den Gfi1 defizienten Tieren stark reduziert (von fast 49% auf ca. 31%). Außerdem war die zusätzliche Population der CD44 hoch exprimierenden und CD25 leicht exprimierenden Zellen detektierbar (Abb.2.15; mittleres Bild). Die Expression von Gfi1b unter Kontrolle des Gfi1-Promotors führte zu einer Erhöhung des Anteils an CD25^{hi}CD44^{lo} Zellen, jedoch war der prozentuale Anteil dieser Zellen geringer als im Wildtyp (Abb.2.15). Die in Gfi1-Verlustmutanten detektierte Population von CD44 hoch exprimierenden und CD25 leicht exprimierenden Zellen war dagegen in den Thymozyten der Gfi1^{1b/1b} Mäuse nicht nachweisbar (Abb.2.15; rechtes Bild).

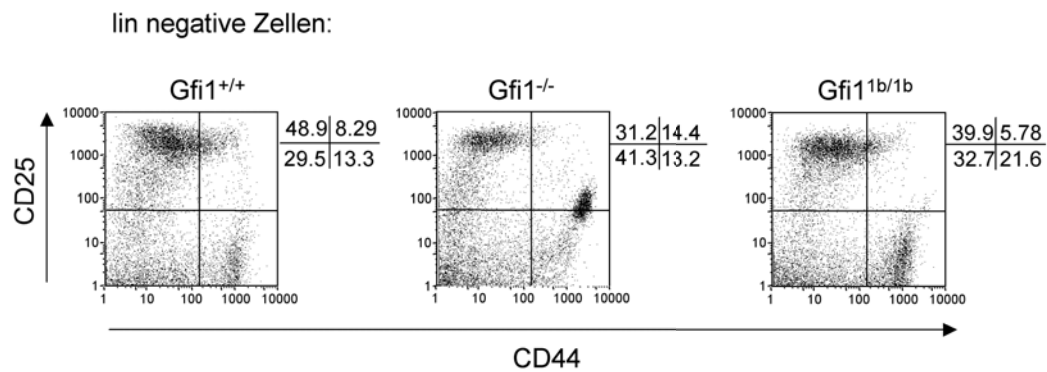


Abb. 2.15: Durchflußzytometrische Analyse von Thymozyten aus Gfi1^{+/+}, Gfi1^{-/-} und Gfi1^{1b/1b} Mäusen. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD44-PE, CD25-APC und lin-PerCP-Cy5.5, gefärbt. Zur Analyse wurden die lin (CD3, CD4, CD8, Pan-NK, Gr-1, B220, Mac-1 und Ter-119) negativen Zellen nach der Messung elektronisch ausgewählt und die Expression von CD44 und CD25 im Koordinatensystem dargestellt. Der prozentuale Anteil der Zellen in den jeweiligen Quadranten ist rechts neben den Koordinatensystemen aufgeführt.

2.6 Analyse des Knochenmarks

Wie unter 2.2.2.2 bereits beschrieben, zeigen Gfi1 defiziente Tiere eine starke Neutropenie. Das Vorhandensein reifer Granulozyten wurde daher in Knochenmark, Blut und Milz beider *knock in* Mausmutanten eingehend untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Antikörpern gegen Gr-1 und Mac-1 gefärbt und einer durchflußzytometrischen Analyse unterzogen.

Abbildung 2.16 zeigt das Ergebnis dieser Analysen. Der in Gfi1^{-/-} Mäusen erkennbare starke Verlust neutrophiler Granulozyten (eine Abnahme beispielsweise von 37% auf 0,9% im Knochenmark; Abb.2.16) wurde in Gfi1^{1b/1b} Mäusen teilweise durch Expression von Gfi1b kompensiert. Gut ein Drittel der im Wildtyp vorhandenen Mac⁺Gr⁺ Zellen wurden im Knochenmark der Gfi1^{1b/1b} Mäuse detektiert. In der Milz und im peripheren Blut war die Kompensation sogar noch stärker (Abb.2.16). Auch wenn die absolute Zahl der neutrophilen Granulozyten nicht der des Wildtyps entsprach, so kann trotz Gfi1-Verlustes nicht von einer Neutropenie gesprochen werden. Auch die im Knochenmark besonders starke Anhäufung von unreifen myeloiden Zellen (Mac-1⁺), die in Gfi1^{-/-} Mäusen zu beobachten ist, war im Knochenmark von Gfi1^{1b/1b} Mäusen wesentlich reduziert. Obwohl der Phänotyp mehr dem des Wildtyps als den drastischen Verhältnissen in Gfi1 defizienten Tiere gleich, wurde zwar eine weitgehende, aber keine vollkommene Kompensation der Defekte erreicht.

Im Gegensatz dazu war der Phänotyp der zweiten *knock in* Mausmutante, der $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäuse, ebenso stark wie der aus dem *Gfi1* Expressionsverlust resultierende. Die mutierte Form von *Gfi1* war nicht in der Lage, die Bildung normaler Mengen an Granulozyten zu veranlassen. Im Knochenmark waren so wenige Granulozyten vorhanden (2,77%; Abb.2.16), dass eine Neutropenie diagnostiziert werden musste. Außerdem wiesen die $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäuse eine ausgeprägte Monozytose auf (Abb.2.16). Für eine normale Granulopoese schien die Funktionalität der SNAG-Domäne unerlässlich.

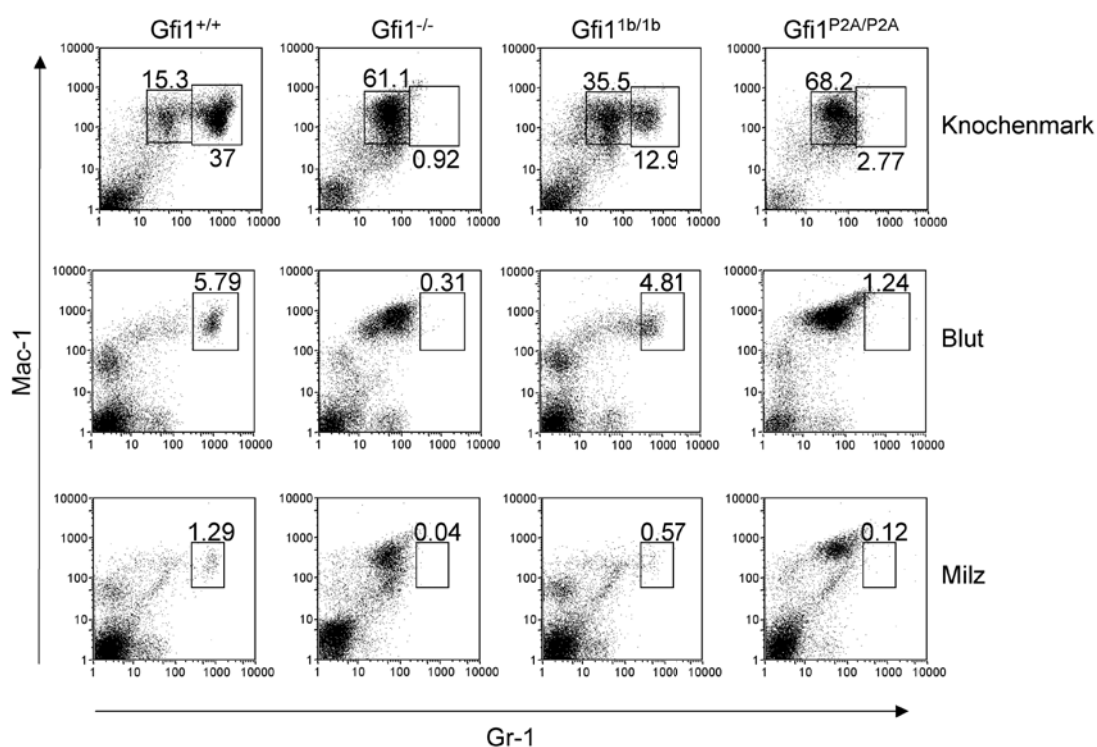


Abb. 2.16: Durchflußzytometrische Analyse von Knochenmark-, Blut- und Milzzellen aus $Gfi1^{+/+}$, $Gfi1^{-/-}$, $Gfi1^{1b/1b}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäusen. Dargestellt sind alle lebenden Zellen, die zuvor mit Mac-1-PerCP-Cy5.5 und Gr-1-FITC markiert wurden. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zellen im Kästchen bezogen auf alle Zellen wieder.

In den durchflußzytometrischen Analysen wurden alle Zellen nach Größe, Granularität und dem Vorhandensein bestimmter Oberflächenmarker aufgetrennt. Um die Morphologie der Zellen besser beurteilen zu können, wurden zusätzlich Zytospins von Knochenmark- und Milzzellen sowie Blutausrichungen angefertigt.

In Abbildung 2.17 sind die Knochenmarkszellen nach Zytospin und May-Grünwald-Giemsa-Färbung dargestellt. Wie schon 2002 von Karsunky und Mitarbeitern publiziert, war im Knochenmark von $Gfi1^{-/-}$ Mäusen eine große Anzahl an unreifen, monozytären

Zellen zu sehen. Die Zahl der reifen, neutrophilen Granulozyten, die sich durch sehr eindeutig segmentierte Nuklei auszeichnen, tendierte dem gegenüber gegen Null (Karsunky *et al.* 2002). Ganz ähnlich sahen die morphologischen Analysen der Knochenmarkszellen von $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäusen aus. Auch hier wurden überwiegend große Zellen, die in der Blutzellenentwicklung am Anfang stehen, detektiert. Im Gegensatz dazu befanden sich im Knochenmark der $Gfi1^{1b/1b}$ Mäuse kaum blastoid wirkende unreife Zellen. Die Morphologie ähnelte der der Wildtyp Mäuse (Abb.2.17).

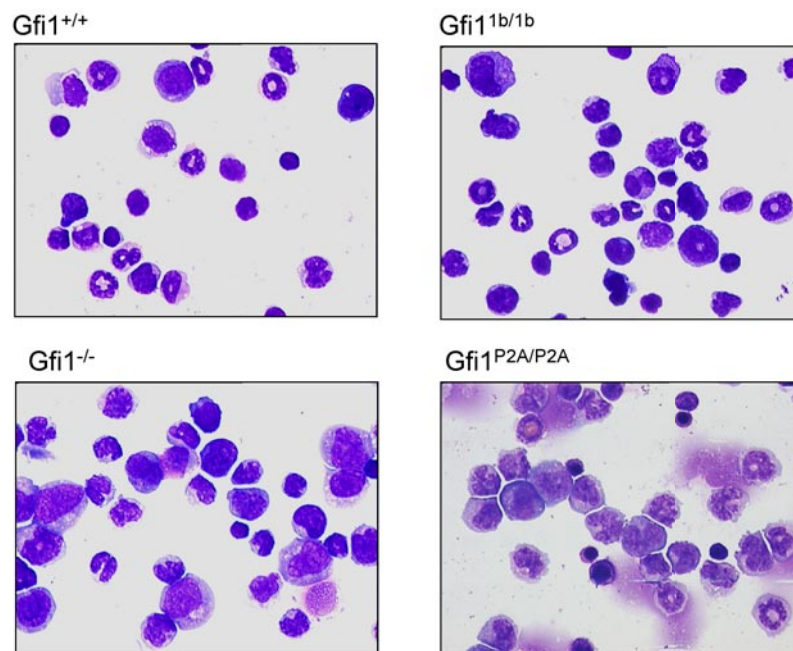


Abb. 2.17: Repräsentative Darstellung der Knochenmarkszellen von $Gfi1^{+/+}$, $Gfi1^{-/-}$, $Gfi1^{1b/1b}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäusen nach Zytospin und May-Grünwald-Giemsa Färbung (durchgeführt vom hämatologischen Zytologie-Labor am Uniklinikum Essen). Die Auswertung wurde mit drei bis neun Mäusen je Genotyp vorgenommen.

Die morphologischen Bilder der Knochenmarkszellen konnten die in den durchflußzytometrischen Analysen (Abb.2.16) gewonnenen Ergebnisse bestätigen. Die etwas genauere Betrachtung einzelner Zellen läßt Abbildung 2.18 zu. Hier sind normale Monozyten, eosinophile Granulozyten und Lymphozyten in allen untersuchten Mäusen zu erkennen. Die Auswahl der Monozyten und insbesondere der selten vorhandenen neutrophilen Granulozyten war jedoch im Falle der $Gfi1^{-/-}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäuse nicht repräsentativ; die meisten neutrophilen Granulozyten wie auch Monozyten waren dort extrem stark verändert. Die wenigen annähernd reif scheinenden neutrophilen Granulozyten, die man in den Zytospins und Blutausstrichen der $Gfi1$ knock out und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäuse erken-

nen konnte (Abb.2.18 und 2.19), wiesen anormale Merkmale wie eine unvollständige Segmentierung und plumpe Segmente auf; das Zytoplasma dieser Zellen war außerdem sehr grau (Abb.2.19); oft waren sie größer als die entsprechenden Wildtyp-Zellen. Die meisten der in $Gfi1^{-/-}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäusen in übermäßiger Anzahl vorhandenen atypischen monozytären Zellen ähnelten Monozyten, da sie grau-blaues, oft vakuolisiertes Zytoplasma besaßen und der Nukleus gekerbt, bohnenförmig oder gelappt war (Abb.2.19). Sie waren jedoch nicht eindeutig einzuordnen; häufig wiesen sie eine Kernsegmentierung mit einem Loch in der Mitte auf und ähnelten daher den Metamyelozyten (Abb.2.19).

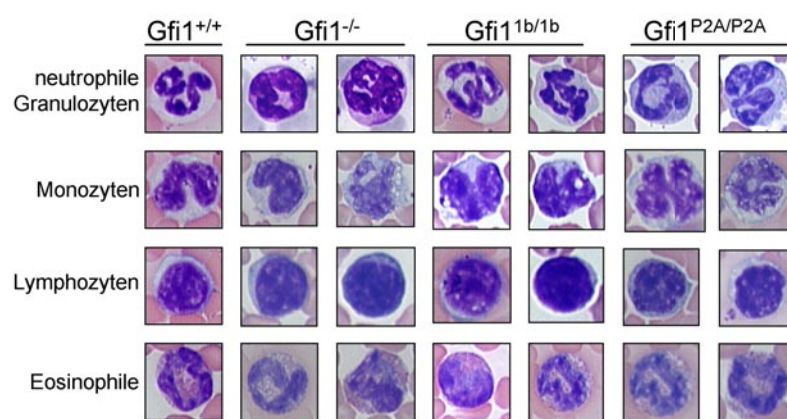


Abb. 2.18: Repräsentative Zellaufnahmen aus May-Grünwald-Giemsa gefärbten Blutausstrichen von $Gfi1^{+/+}$, $Gfi1^{-/-}$, $Gfi1^{1b/1b}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäusen. Die Monozyten und neutrophilen Granulozyten der $Gfi1^{-/-}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäuse wiesen einige atypische Merkmale auf. Die Bilder wurden von Prof. Dr. Dürsen aufgenommen.

In Wildtyp-Tieren waren diese atypischen Zellen überhaupt nicht detektierbar; die $Gfi1^{1b/1b}$ Mäuse wiesen dagegen einige wenige dieser atypischen Monozyten auf. (Abb.2.17 und Tab.2.1). In diesen *knock in* Mäusen wurden aber im Gegensatz zu $Gfi1$ defizienten Mäusen eindeutig normale, reife Granulozyten gebildet, die in ihrer Anzahl auch klar die Menge der in *knock out* Mäusen nachzuweisenden überstiegen (Abb.2.16/Tab.2.1).

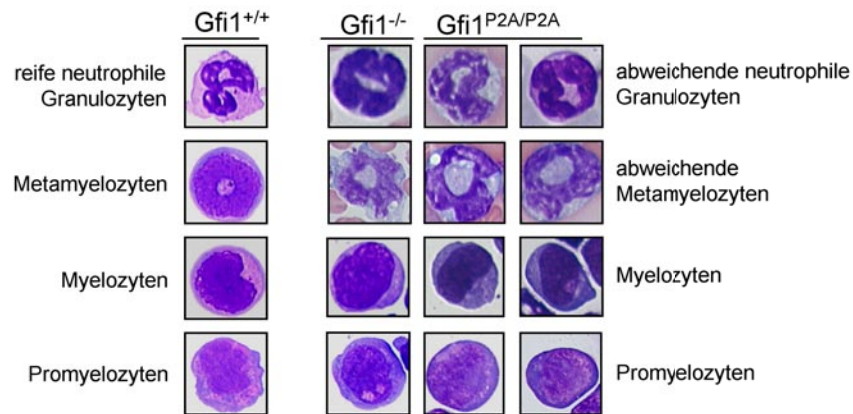


Abb. 2.19: Repräsentative Einzelzellen aus Knochenmark-Zytospins zur Verdeutlichung einer normalen Differenzierung im Wildtyp-Knochenmark (links) und der Anhäufung atypischer, monozytärer Zellen jenseits des Myelozyten-Stadiums in $Gfi1^{-/-}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäusen. Die Bilder wurden mit einem 100x Objektiv und einem 10x Okular von Prof. Dr. Dührsen aufgenommen. Je Genotyp wurden drei bis neun Tiere untersucht.

Es scheint eine Kompensation des $Gfi1$ -Ausfalls durch $Gfi1b$ möglich zu sein, jedoch ist diese nicht so stark, dass mit Wildtyp-Tieren vergleichbare Zahlen an neutrophilen Granulozyten erreicht werden (Abb.2.16/Tab.2.1).

In Tabelle 2.1 sind die Ergebnisse der Zytospin- und Blutausstrich-Auszählung zusammengestellt. Die Auszählung wurde von Prof. Dr. Dührsen, Leiter der Hämatologie am Uniklinikum Essen, ausgeführt. Um einen Eindruck über die statistische Signifikanz der ausgezählten Werte zu bekommen, wurde ein t-Test angewendet. Die Ergebnisse der Zell-Auszählungen spiegeln die bereits gewonnenen Erkenntnisse wider: zum einen die starke Reduktion der Lymphozytenzahlen in $Gfi1^{-/-}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäusen, während die $Gfi1^{1b/1b}$ Mäuse keine signifikant veränderten Lymphozytenzahlen zeigten, zum anderen die starke Abnahme neutrophiler Granulozyten in $Gfi1^{-/-}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäusen sowie das in den selben Genotypen in hohem Maße vorkommende Erscheinen von atypischen Monozyten, die in einer statistisch signifikanten Anzahl weder im Wildtyp noch in $Gfi1^{1b/1b}$ Mäusen detektiert werden konnten. Insgesamt zeigen die Abbildungen 2.18 und 2.19 sowie die Tabelle 2.1, dass sowohl in $Gfi1^{-/-}$ als auch in $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäusen die granulozytäre Reihe bis zu den Myelozyten gut ausgereift ist und sich danach anormale Formen entwickeln, die nicht eindeutig als atypische Myelozyten oder atypische Monozyten einzuordnen sind. Rechnet man die Anzahl der Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten als unreife Vorläuferzellen zusammen, so konnte festgestellt werden, dass die in $Gfi1^{-/-}$ wie auch in $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäusen zu erkennende klare Linksverschie-

bung zu Gunsten dieser unreiferen granulozytären Vorläuferzellen in abgeschwächter Form auch noch in $Gfi1^{1b/1b}$ Mäusen vorhanden war (Abb.2.16 und Tab.2.1).

Zellzahlen Knochenmark (%)	$Gfi1^{+/+}$ (n=7)	$Gfi1^{-/-}$ (n=8)	t-test	$Gfi1^{1b/1b}$ (n=7)	t-test	$Gfi1^{P2A/P2A}$ (n=3)	t-test
Lymphozyten	22 ± 11	7 ± 7	0.01*	19 ± 8	0.617	6 ± 3	0.055
Myeloblasten	4 ± 2	4 ± 5	1	7 ± 3	0.063	9 ± 8	0.214
Promyeloblasten	4 ± 2	2 ± 2	0.075	5 ± 2	0.56	4 ± 5	0.902
Myelozyten	7 ± 4	4 ± 2	0.06	13 ± 6	0.053	9 ± 7	0.622
Metamyelozyten	20 ± 7	4 ± 2	4.1x10 ⁻⁵ *	13 ± 4	0.049 *	4 ± 1	0.006 *
Granulozyten	36 ± 13	2 ± 3	5.4x10 ⁻⁶ *	28 ± 7	0.202	2 ± 2	0.002 *
Monozyten	2 ± 2	16 ± 24	0.173	7 ± 4	0.014 *	13 ± 1	2.7x10 ⁻⁵ *
atypische Monozyten	1 ± 3	57 ± 21	1.1x10 ⁻⁵ *	2 ± 6	0.688	48 ± 24	0.002 *
Eosinophile	2 ± 2	1 ± 1	0.449	1 ± 1	0.446	1 ± 1	0.705
Erythrozyten	3 ± 5	3 ± 3	0.75	5 ± 6	0.484	3 ± 4	0.906

Zellzahlen Blut (%)	$Gfi1^{+/+}$ (n=9)	$Gfi1^{-/-}$ (n=5)	t-test	$Gfi1^{1b/1b}$ (n=7)	t-test	$Gfi1^{P2A/P2A}$ (n=3)	t-test
Lymphozyten	80 ± 6	54 ± 22	0.005 *	81 ± 9	0.802	51 ± 21	0.002 *
Granulozyten	15 ± 6	0 ± 1	9.1x10 ⁻⁵ *	10 ± 5	0.067	2 ± 3	0.003 *
Monozyten	4 ± 2	24 ± 22	0.016 *	8 ± 5	0.046 *	23 ± 18	0.005 *
atypische Monozyten	0	20 ± 8	6.5x10 ⁻⁶ *	0 ± 1	0.121	23 ± 7	3.5x10 ⁻⁷ *
Eosinophile	1 ± 1	1 ± 2	0.979	1 ± 1	0.749	0 ± 1	0.32

Tab. 2.1: Differenzial-Zellzahlen von nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten Blutaussstrichen und Knochenmark-Zytospins (nach Erythrozyten-Lyse) von $Gfi1^{+/+}$, $Gfi1^{-/-}$, $Gfi1^{1b/1b}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen sowie die Ergebnisse des t-Tests. Die Werte der $Gfi1^{-/-}$, $Gfi1^{1b/1b}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäuse wurden für die statistische Analyse immer auf die Werte des Wildtyps bezogen. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind mittels Sternchen kenntlich gemacht.

2.7 Analyse der Innenohren

Ein einfach zu diagnostizierender Phänotyp der $Gfi1$ defizienten Mäuse ist deren Taubheit; dennoch wurde der durch das Fehlen von $Gfi1$ verursachte Gehörverlust erst Monate nach den Defekten im hämatopoetischen System beschrieben (Wallis *et al.* 2003).

Als Ursache für die Taubheit wurde eine Reifungsstörung und Degradation der Innenohr-Haarzellen beschrieben, die schon vor der Geburt der Tiere einsetzt (Wallis *et al.* 2003; Hertzano *et al.* 2004). Mit dem Ziel herauszufinden, ob die $Gfi1^{1b/1b}$ und

$Gfi1^{P2A/P2A}$ *knock in* Mäuse wie die $Gfi1^{-/-}$ Mäuse unter einem Verlust des Gehörs leiden, ob die Expression von $Gfi1b$ auch hier die Funktion von $Gfi1$ ersetzen kann oder sogar die Funktionalität der SNAG-Domäne im Innenohr nicht essentiell ist, wurde eine genaue Analyse der *knock in* Innenohren durchgeführt. Einen quantitativen Gehörtest stellt die sogenannte ABR-Untersuchung (*Auditory Brainstem Response*) dar. Es handelt sich um eine elektrophysiologische Ableitung auf der Ebene des Hirnstamms; mittels Präsentation von Stimuli verschiedener Frequenz und Intensität wird der Schwellenwert ermittelt, bei dem eine neurale Antwort des Hirnstamms ausgelöst wird.

Zur Durchführung einer ABR-Untersuchung wurden Wildtyp, $Gfi1^{-/-}$ und $Gfi1^{1b/1b}$ *knock in* Mäuse zur Universität von Tel Aviv / Israel versandt ($Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäuse waren zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar). In Abbildung 2.20 ist das Ergebnis dieser Analyse zu sehen. Wildtyp-Mäuse wiesen einen normalen Schwellenwert auf, der bei ca. 40 bis 60 Dezibel (dB) bei allen gemessenen Frequenzen lag. Dagegen lag der Schwellenwert im Falle der $Gfi1^{-/-}$ Mäuse wie auch $Gfi1^{1b/1b}$ Mäuse bei über 100 dB bei einer Frequenz von 8 kHz und über 90 dB bei Frequenzen von 16 bzw. 32 kHz.

Eine einfachere Methode, den Gehörverlust einer Maus festzustellen, ist das Beobachten der Reaktion dieser Maus (z.B. Zucken mit dem gesamten Körper oder den Ohren) auf einen auditorischen Stimulus (Preyer Reflex). Mit dieser Methode wurde die Taubheit beider $Gfi1$ *knock in* Mausmutanten festgestellt. Ein Preyer Reflex Test kann die ABR-Untersuchung nicht immer ersetzen, da er keine Aussage über einen quantitativen Gehörverlust zulässt. Die $Gfi1^{1b/1b}$ Mäuse besaßen jedoch nicht nur eine leichte auditive Dysfunktion, sondern wiesen einen signifikanten Hörverlust auf, der ebenso erheblich war wie der in $Gfi1^{-/-}$ Mäusen detektierte. Eine Studie, die sich mit der Aussagekraft des Preyer Reflexes zur Detektion des Hörvermögens bei Mäusen beschäftigt, zeigte, dass die Feststellung des Preyer Reflexes ausreicht, um aussagen zu können, ob ein schwerwiegender Gehörverlust vorliegt, jedoch nicht, um ein weniger schwere auditive Störung zu diagnostizieren (Jero *et al.* 2001). Da die $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäuse ebenfalls keinen Preyer Reflex aufwiesen, konnte davon ausgegangen werden, dass sie taub waren und keine ABR-Messung notwendig sein würde. Es scheint daher auch in den Innenohren für die korrekte Ausübung der Funktion von $Gfi1$ eine SNAG-Domäne essentiell zu sein, die in der Lage ist, $Gfi1$ seine repressorische Wirkung zu verleihen. Da eine Expression von $Gfi1b$ an Stelle von $Gfi1$ nicht wie im hämatopoetischen System den $Gfi1^{-/-}$ Phänotyp abschwächt, scheinen hier außer der in $Gfi1^{1b/1b}$ *knock in* Mäusen voll funktionsfähigen SNAG-Domäne auch weitere Faktoren eine Rolle zu spielen.

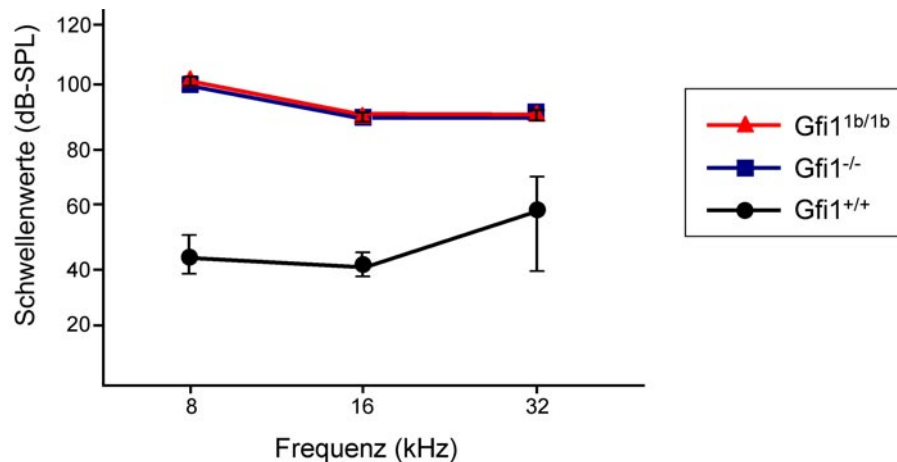


Abb. 2.20: Diagramm mit den Auditory Brainstem Response (ABR) Schwellenwerten von 3-3,5 Monate alten $Gfi1^{1b/1b}$ und $Gfi1^{-/-}$ Mäusen. Die Schwellenwerte betragen über 100 dB bei einem Stimulus von 8 kHz und über 90 dB bei 16 und 32 kHz. Gleichaltrige $Gfi1^{+/+}$ Mäuse wiesen dagegen Schwellenwerte innerhalb des normalen Hörbereichs auf (zwischen 40-60 dB). Die Abkürzung dB-SPL steht für den Schalldruckpegel, gemessen in Dezibel (*sound pressure level*). Die Analyse wurde von einer Kooperationsgruppe in Tel Aviv durchgeführt.

Um herauszufinden, ob die Taubheit der $Gfi1^{1b/1b}$ und $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäuse auf einem Abbau der Innenohr-Haarzellen und damit auf einer nicht vorhandenen Kompensation des $Gfi1$ -Ausfalls beruht, wurden immunhistochemische Analysen mit Cochleae von neugeborenen Mäusen durchgeführt. Dazu wurden zunächst Innenohren neugeborener Mäuse aller beschriebenen Genotypen präpariert und über Nacht in 4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert. Die Schnitte der Gewebe sowie die Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden in Israel von Ronna Hertzano durchgeführt. Es erfolgte eine Färbung mit Myosin VI, einem Marker für Haarzellen (Abb.2.21A) oder mit einem Antikörper gegen acetyliertes Tubulin, das die Kinozilien der Haarzellen, die Pfeilerzellen und andere Tubulin-basierte Strukturen in der Cochlea markiert (Abb.2.21B). Die Färbungen ermöglichen eine Beurteilung des Zustandes der Morphologie der Innenohr-Haarzellen. Im cochleären Epithel des Wildtyps (Abb.2.21) war die normale Anordnung der Haarzellen zu erkennen: Die inneren Haarzellen waren in einer Reihe angeordnet, während die äußeren Haarzellen in drei Reihen angeordnet waren. In den Schnitten der $Gfi1^{-/-}$, der $Gfi1^{1b/1b}$, sowie der $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäuse war dagegen nur die einzelne Reihe innerer Haarzellen zu erkennen (Abb.2.21). Diese erschienen, verglichen mit den $Gfi1^{+/+}$ Zellen, morphologisch unreif. Die Region, in der sich die äußeren Haarzellen entwickeln, war in $Gfi1^{-/-}$ Mäusen wie auch in beiden *knock in* Mausmutanten desorganisiert. Die Haarzellen erschienen kleiner, die Stereozilienbündel waren kaum zu identi-

zieren und die gesamte Myosin VI Färbung (Abb.2.21A), erschien diffus. Es deutete alles darauf hin, dass in dieser Region ein anhaltender degenerativer Prozess stattfand. Im direkten Vergleich von $Gfi1^{-/-}$, der $Gfi1^{1b/1b}$ und den $Gfi1^{P2A/P2A}$ Mäusen erscheint der Phänotyp in der Region der äußeren Haarzellen bei den $Gfi1^{-/-}$ und den $Gfi1^{P2A/P2A}$ weiter fortgeschritten als bei den $Gfi1^{1b/1b}$ *knock ins*, was vermuten lassen würde, dass die Degeneration in diesen Mäusen etwas langsamer erfolgt. Insgesamt stimmen diese morphologischen Phänotypen mit dem überein, was der Gehörtest schon angedeutet hat: $Gfi1b$ kann die Funktion von $Gfi1$ im Ohr nicht ersetzen und eine funktionelle Repressordomäne ist essentiell für die Ausbildung intakter innerer und äußerer Haarzellen.

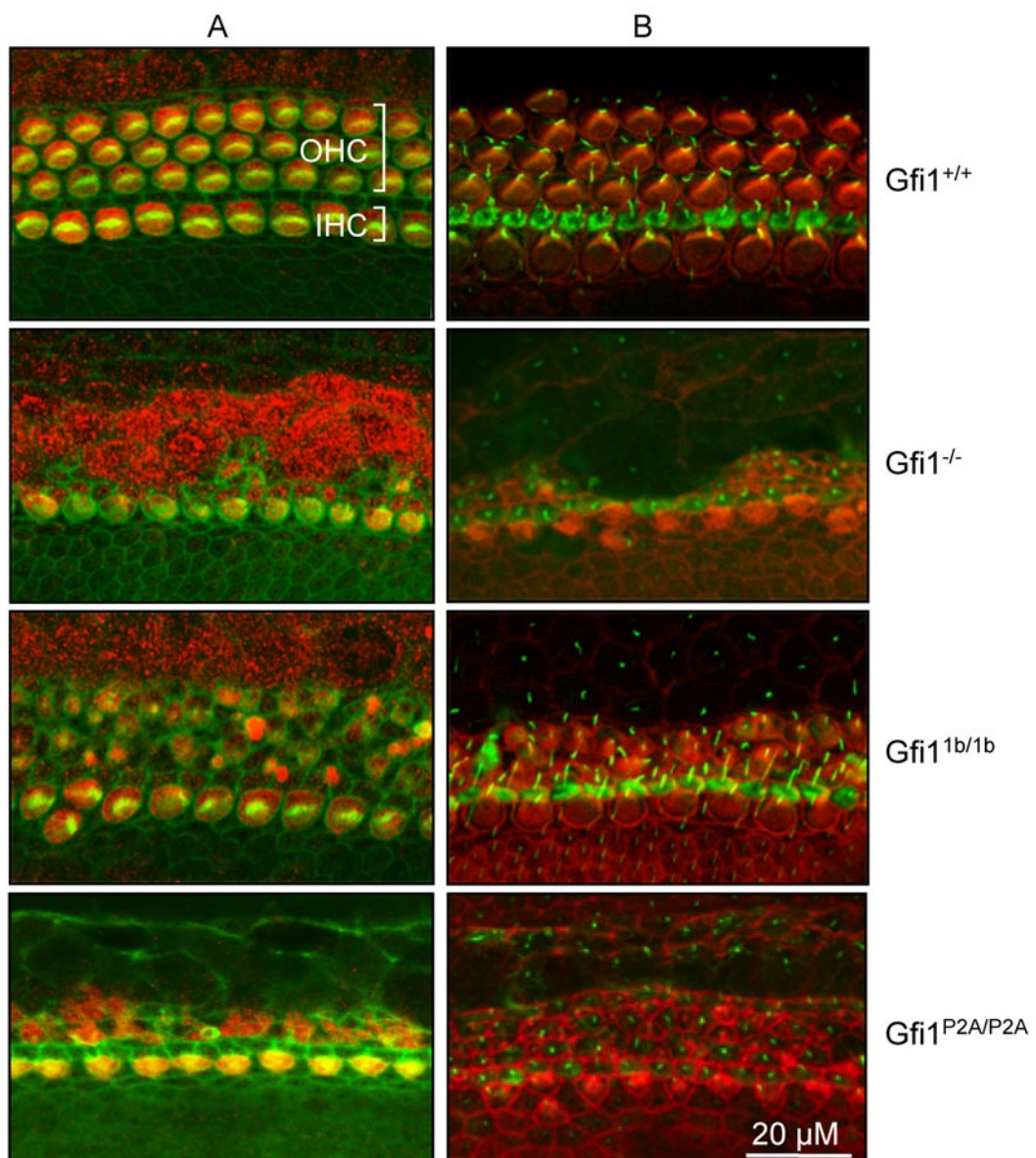


Abb. 2.21: Epithel aus der mittleren basalen Windung der Cochlea von neugeborenen Mäusen (P0). Das Epithel wurde mit Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt. Mit der Abkürzung OHC

(*outer hair cells*) ist die Lage der äußeren Haazellen markiert; IHC (*inner hair cells*) steht für innere Haarzellen.

A: Verwendung eines Antikörpers gegen MyosinVI (rot); dies führt zu einer Markierung des Plattenepithels und des Cytoplasmas der Haarzellen. Grün gefärbt ist Phalloidin, welches filamentöses Aktin an den Zellgrenzen und in den Stereozilien markiert.

B: Färbung in Grün mit einem Antikörper für acetyliertes Tubulin, der die Kinozilien der Haarzellen, die Pfeilerzellen und verschiedene andere Strukturen des Epithels, die Tubulin enthalten, markiert. In Rot ist Phalloidin gefärbt (Markierung siehe A).

Die Aufnahme der Bilder wurde von Ronna Hertzano durchgeführt.

Da das Innenohr das bisher einzige Gewebe war, welches keine Kompensation von Gfi1 durch Gfi1b zeigte, sollte geklärt werden, ob in den Innenohren der Gfi1^{1b/1b} *knock in* Mäuse Gfi1b wirklich exprimiert war. Dazu wurden Innenohren von Gfi1^{+/+} und Gfi1^{1b/1b} Mäusen am Tag ihrer Geburt präpariert. In diesem Stadium fand auch die Präparation der Ohren für die immunhistochemischen Analysen statt. Das Gewebe wurde bis zum Abschluss der Genotypisierung bei -80°C eingefroren, anschließend wurde die RNA isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt. Eine semi-quantitative PCR (Abb.2.22) mit Gfi1 sowie Gfi1b spezifischen Primern führte zur Amplifikation von Gfi1 im Wildtyp-Innenohr. In Gfi1^{1b/1b} Ohren wurde kein Gfi1 detektiert. Gfi1b war hingegen sowohl im Wildtyp als auch im *knock in* nachweisbar.

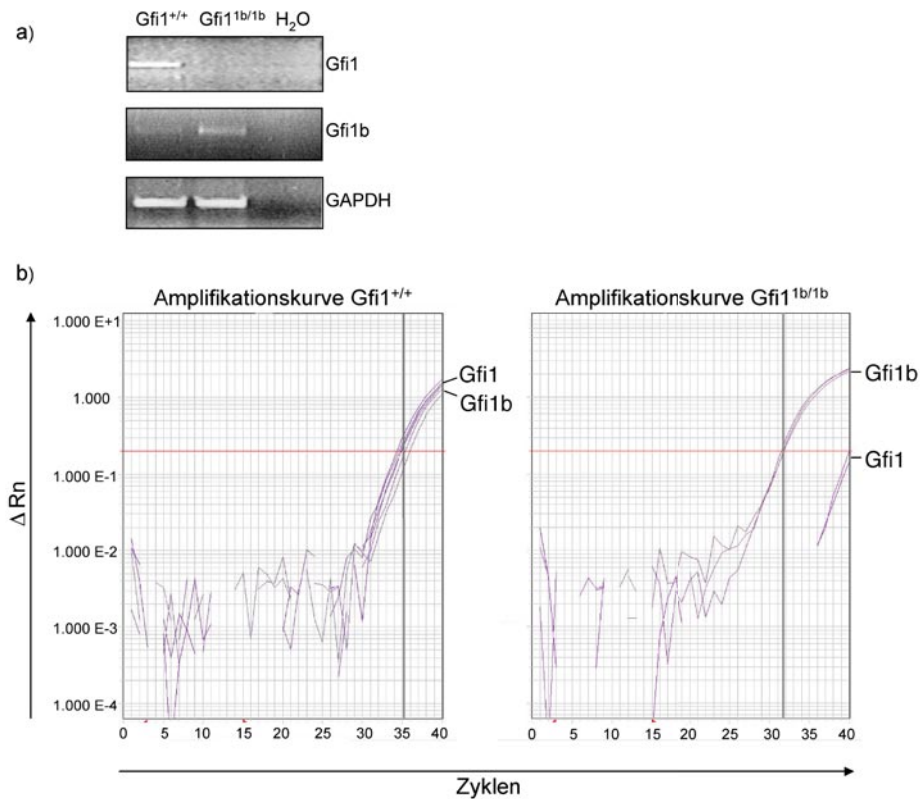


Abb. 2.22: a) Semi-quantitative PCR von Gfi1^{+/+} und Gfi1^{1b/1b} Innenohren neugeborener Mäuse. Im oberen Bild ist das Ergebnis einer PCR mit Gfi1 spezifischen Primern zu sehen. Für die PCR, die in der Mitte zu sehen ist, wurden Gfi1b spezifische Primer verwendet. Das untere Bild zeigt die gleiche Menge an cDNA in Gfi1^{+/+} und Gfi1^{1b/1b} Ansätzen (PCR mit GAPDH-Primern).
b) Expressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR von Gfi1^{+/+} (links) und Gfi1^{1b/1b} (rechts) Innenohren. Die PCR wurde mit cDNA von neugeborenen Mäusen durchgeführt.

Die in der semi-quantitativen PCR erkennbare Expression von Gfi1- und Gfi1b-cDNA in Innenohren von Gfi1^{+/+} und Gfi1^{1b/1b} Mäusen wurde anschließend durch eine quantitative Real-Time PCR bestätigt (Abb.2.22). Die erhöhte Expression von Gfi1b im Gfi1^{1b/1b} Innenohr sowie der Verlust der Gfi1-Expression im gleichen Gewebe ließ den Schluß zu, dass das *knock in* Allel funktionsfähig ist.

3 Diskussion

Diese Arbeit sollte in erster Linie dazu dienen, neue Erkenntnisse über die Funktion einzelner Domänen des Gfi1-Proteins zu erlangen und die Ersetzbarkeit von Gfi1 durch das eng verwandte Gfi1b sowie die gegenseitige Regulation der beiden Proteine zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei *knock in* Mausmutanten hergestellt, in denen entweder die codierende Region von Gfi1b in den Gfi1-Lokus inseriert oder eine Punktmutation in den codierenden Bereich des Gfi1-Gens eingeführt wurde, die zu einem Aminosäureaustausch und damit zum Funktionsverlust der Repressordomäne des Gfi1 führt.

Um einen ersten Eindruck der zu erwartenden Ergebnisse zu erhalten, wurden in Vorarbeiten Mäuse aus einer Kreuzung zwischen Gfi1:GFP *knock in* Tieren und *vav*-Gfi1b transgenen Tieren analysiert. Diese dritte Mutante sollte die Verhältnisse in der Gfi1:Gfi1b *knock in* Maus simulieren und die Analyse des hämatopoetischen Systems, in dem der *vav*-Promotor aktiv ist, ermöglichen. Die anschließend untersuchte Gfi1:Gfi1b Mutante stimmte in Teilen mit den Erkenntnissen aus der Transgen-Kreuzung überein, jedoch zeigten die *knock in* Tiere keine Neutropenie.

Neben der Analyse des hämatopoetischen Systems konnte mit Hilfe der Gfi1:Gfi1b *knock in* Mutante auch eine Untersuchung der Zellen erfolgen, die im Transgen-Modell keine „künstliche“ Gfi1b Expression aufwiesen: die Haarzellen des Innenohrs.

In der zweiten *knock in* Mausmutante, die im direkten Vergleich mit der Gfi1:Gfi1b Mutante analysiert wurde, zeigte sich die Wichtigkeit der Funktionalität der SNAG-Domäne für die hier untersuchten Funktionen von Gfi1. Die in den Gfi1:P2A *knock in* Mäusen gezeigten Defekte waren dieselben, die für die Gfi1 defizienten Tiere beschrieben worden sind.

3.1 Rolle der Expressionsspezifität und -stärke im Mausmodell

Aus den Ergebnissen der Untersuchung Gfi1 defizienter Tiere mit einer transgenen konstitutiven Expression von Gfi1b unter Kontrolle des *vav*-Promotors konnte nicht direkt auf den zu erwartenden Phänotyp der entsprechenden *knock in* Mausmutante geschlossen werden. Während transgen exprimiertes Gfi1b die Neutropenie in Gfi1 defizienten Tieren nicht mildern konnte, ermöglichte eine Gfi1b-Expression unter der Kontrolle des Gfi1-Promotors die Bildung neutrophiler Granulozyten. Die naheliegendste Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse wäre eine fehlende oder in irgendeiner Weise unzureichende Gfi1b-Expression. Die Frage, ob eine Expression von Gfi1b in den gentechnisch veränderten Tieren nachgewiesen werden kann, ist daher wichtig für die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse.

Die Funktionalität der Überexpression von Gfi1b in *vav*-Gfi1b Transgenen wurde unter anderem im Knochenmark gezeigt (Vassen *et al.* 2005); bisher ist jedoch keine genaue Expressionsanalyse von transgenem Gfi1b in einzelnen Zellpopulationen, wie den neutrophilen Granulozyten, durchgeführt worden. Es kann daher nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass die Aktivität des *vav*-Promotors besonders in Granulozyten zu gering oder zu unspezifisch ist. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass auch eine transgene Expression von Gfi1 unter Kontrolle des *vav*-Promotors in Gfi1 Verlustmutanten nicht zur Aufhebung der Neutropenie geführt hat (dieser Versuch wurde von Hui Zeng im IFZ durchgeführt).

Die Funktionalität der Gfi1b-Expression in der *knock in* Mutante deutete sich bereits durch die Aufhebung der Neutropenie an. Da in der *knock in* Mutante Gfi1b unter der Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass die Expression von Gfi1b der von Gfi1 räumlich und zeitlich entsprach und diese Bedingungen die Aufhebung der Neuropenie ermöglichte.

Die ordnungsgemäße Expression wird häufig zuerst dort angezweifelt, wo kein Effekt dieser Expression zu erkennen ist, man würde daher bezüglich der Gfi1:Gfi1b *knock in* Mäuse eine korrekte Expression von Gfi1b vor allem im Innenohr in Frage stellen; hier war der aus der Gfi1-Defizienz resultierende Gehörverlust nicht aufgehoben worden.

Drei Punkte sprechen jedoch dafür, dass die Expression von Gfi1b in den verschiedenen Geweben der *knock in* Mausmutante funktionell ist:

1. Die Strategie zur Herstellung der Gfi1:Gfi1b *knock in* Mäuse erfolgte analog zum bereits publizierten Gfi1:GFP *knock in* (Yücel *et al.* 2004). Für die Gfi1:GFP *knock in* Mausmutante wurde auf vielfältige Weise gezeigt, dass die Expression von GFP das endogene Expressionsmuster von Gfi1 wiedergibt: Zum Beispiel in einzelnen Zellpopulationen der

T-Lymphozyten (Yücel *et al.* 2004) oder auch in immunhistochemischen Analysen in der Cochlea des Innenohrs (Hertzano *et al.* 2004).

2. Um die Funktionalität des *knock ins* im Innenohr weiterhin zu bestätigen, wurde eine Gfi1b-Expressionsanalyse mittels RT- sowie QRT-PCR durchgeführt, die in Gfi1:Gfi1b *knock in* Innenohren eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Expression von Gfi1b zeigte.

3. Die Expression von Gfi1b im Thymus der Gfi1:Gfi1b *knock in* Mäuse wurde zudem mittels Western-Blot-Verfahren gezeigt; hier sind im Wildtyp-Thymus keine detektierbaren Proteinmengen an Gfi1b vorhanden.

Wie wichtig eine genaue Expression des eingebrachten Gens unter Umständen sein kann, zeigt das Beispiel der Hox3-Mausmutanten. Die Expression von Hoxd3 an Stelle von Hoxa3 führt zur Kompensation des Hoxa3-Gendefizits; die Mäuse besitzen beispielsweise einen Thymus, der in Hoxa3-Verlustmutanten nicht vorhanden ist. Dagegen wird kein Thymus gebildet, wenn Hoxa3-Verlustmutanten mit heterozygoten Hoxd3:Hoxa3 Mausmutanten verpaart werden, die Hoxa3 unter Kontrolle der regulatorischen Elemente des Hoxd3-Promotors exprimieren (Greer *et al.* 2000). Diese Studie macht deutlich, dass der Phänotyp, der aus einem Proteinverlust resultiert durch ein anderes Protein aufgehoben werden kann, sofern es genauso wie das ausgefallene exprimiert wird. Die Expression des eigentlich fehlenden Proteins kann dagegen im Fall der Hox3-Proteinfamilie den Phänotyp nicht aufheben, wenn die Expression der endogenen Expression nicht genau entspricht, da sie unter der regulatorischen Kontrolle eines anderen Promotors steht.

Dass zur Definition einer genauen Expression jedoch räumliche, zeitliche und quantitative Größen unterschiedlich starken Anteil haben können, um eine Kompensation eines ausgeschalteten Gens durch ein anderes zu erreichen, demonstriert eine Studie, die eine nahezu vollständige Funktionsübernahme von Pax2 durch Pax5 beschreibt, obwohl das eingebrachte Pax5-Transkript aufgrund von alternativem Spleißen ungefähr fünfmal niedriger exprimiert wird als Pax2 im Wildtyp (Bouchard *et al.* 2000); hier scheint die Proteinmenge weniger wichtig als andere Faktoren.

Einen gegenteiligen Effekt zeigt eine Studie, die vom experimentellen Ansatz den hier beschriebenen Mutanten gleicht: Es handelt sich um eine Arbeit, in der zum einen Junb in den Jun-Lokus inkloniert wurde und zum anderen Junb-Transgene mit Jun defizienten Mäusen gekreuzt wurden, um anschließend beide Mausmutanten auf die Aufhebung der Defekte des Jun-Genverlustes hin zu untersuchen (Passegue *et al.* 2002). In beiden Fällen

wurde der *knock out*-Phänotyp aufgehoben; der Ausgleich der Funktionsstörungen durch die transgene Expression von Junb war jedoch wesentlich besser.

Die vorliegende Studie stimmt mit der Jun / Junb Studie insofern überein, als dass ebenfalls eine Aufhebung des Genverlustes, hier des Gfi1-Verlustes, in beiden Modellen (*knock in* Mutanten und Transgenen) gesehen wurde. Jedoch führte die transgene Expression von Gfi1b nicht zu einer stärkeren Kompensation der Gfi1-Defizienz verglichen mit der Gfi1b-Expression unter dem endogenen Gfi1-Promotor. Es zeigte sich also, dass eine starke Expression des verwandten Proteins nicht immer wesentlich effektiver ist als die genaue Imitation der Expression des fehlenden Proteins. Im Fall von Gfi1 und Gfi1b scheint die *knock in* Mausmutante besser geeignet, die Kompensation des Gfi1-Verlustes zu gewährleisten.

3.2 Knock in Mausmutanten

3.2.1 Analyse der funktionellen Homologie zweier Proteine

Die erste, Gfi1:Gfi1b *knock in* Mausmutante, diente der Untersuchung einer potentiellen Funktionsübernahme von Gfi1 durch das eng verwandte Protein Gfi1b. Auch wenn in einem solchen Fall nicht immer davon ausgegangen werden kann, dass sich *knock in* Mutanten besser als Transgene eignen, um eine funktionelle Homologie zu erkennen (Passegue *et al.* 2002), so ist doch unumstritten, dass der Vorteil der *knock in* Mausmutanten gegenüber den Transgenen die spezifischere Imitation des endogenen Proteins ist, da die Expression des Ursprungsgens von dem eingebrachten Transkript in der Regel sehr genau übernommen wird.

In der hier beschriebenen Gfi1:Gfi1b *knock in* Studie wurde zunächst nicht davon ausgegangen, dass eine weitreichende Funktionsübernahme von Gfi1 durch Gfi1b erfolgen kann. Die Wichtigkeit von Gfi1 in der lymphoiden und myeloiden Entwicklung (Karsunky *et al.* 2002; Hock *et al.* 2003), stimmte nicht mit der Funktion von Gfi1b überein, welches sich als unverzichtbar für eine normale Entwicklung der Erythrozyten und Megakaryozyten erwiesen hatte (Saleque *et al.* 2002).

Im Hinblick auf die bisher veröffentlichten *knock in* Mutanten ist eine funktionelle Homologie trotz unterschiedlicher *knock out* Phänotypen jedoch keine ungewöhnliche Beobachtung; die zu untersuchenden Proteine weisen oft ganz unterschiedliche Ausgangsbedingungen auf.

In vielen Fällen sind sich die mittels *knock in* Mutante untersuchten Proteine in ihrer Struktur, wie im Fall von Gfi1 und Gfi1b sehr ähnlich. Eine Ersetzbarkeit strukturell stark homologer Gene wurde unter anderem für c-myc und N-myc gezeigt (Malynn *et al.* 2000).

Überraschend ist, dass eine Funktionsübernahme sogar möglich ist, wenn die beiden ausgetauschten Proteine zwar einer Genfamilie angehören, jedoch strukturell kaum identisch sind, wie beispielsweise im Fall von Hoxa3 und Hoxd3 (Greer *et al.* 2000) oder Cyclin D1 und Cyclin E (Geng *et al.* 1999). Letztere sind in der am stärksten konservierten Domäne sogar nur zu 38% identisch.

Ein sich unterscheidendes bzw. wie im Fall von Gfi1 und Gfi1b nahezu komplementäres Expressionsmuster in der Hämatopoese zeigt sich auch bei anderen Proteinen, deren funktionelle Homologie mittels *knock in* Mausmodell untersucht worden ist. So wird GATA1 – vergleichbar mit Gfi1b – vor allem während der Erythropoese exprimiert, während die Expression von GATA3 ebenso wie die von Gfi1 während der Lymphopoese sehr hoch ist. Auch C/EBP α und C/EBP β weisen ein ähnlich komplementäres Expressionsmuster auf. Trotz der komplementären Expression von Gfi1-, GATA- und C/EBP-Proteinen findet in allen drei Fällen in den *knock in* Mutanten eine Kompensation statt. Diese ist in dem hier beschriebenen Gfi1:Gfi1b *knock in* bezüglich des hämatopoetischen Systems fast komplett. Dagegen führt die Expression von GATA3 unter Kontrolle des GATA1 Promotors zwar zur teilweisen Abschwächung des GATA1 *knock out*-Phänotyps, die Tiere sterben jedoch weiterhin während der Embryonalentwicklung (Tsai *et al.* 1998).

3.2.2 Analyse der Auswirkung einer Punktmutation auf die Proteinfunktion

Eine Mausmutante mit ganz anderer Zielsetzung stellte die zweite, hier hergestellte und analysierte, Gfi1:P2A *knock in* Mutante dar. Die in den für Gfi1 codierenden Bereich eingeführte Punktmutation verursacht einen Aminosäureaustausch, der wiederum die reprimierende Wirkung von Gfi1 nach sich zieht. Anders als im ersten Typ *knock in* Mutante wird kein anderes Gen eingefügt.

Diese Art von *knock in* Mutante eignete sich vielmehr, die Wichtigkeit einer bestimmten Domäne, wie hier die der SNAG-Domäne, für die Funktion des Gfi1-Proteins zu untersuchen. Die Einführung einer Punktmutation kann auch die Bedeutung einer bestimmten Proteinmodifikation verdeutlichen, indem die Mutation beispielweise dazu führt, dass eine Phosphorylierung an einer bestimmten Aminosäure nicht mehr möglich ist (Bruins *et al.* 2004).

In den meisten Fällen dienen *knock in*-Mäuse mit einer Punktmutation der Erforschung der Beteiligung dieser Mutation am Krankheitsverlauf; dazu wird eine Mutation, von der beim Menschen eine Korrelation mit einer bestimmten Krankheit beschrieben wurde, in den Genlocus der Maus eingeführt und damit versucht, das Krankheitsmodell auf den Maus-Organismus zu übertragen. Die Eignung hierfür zeigt sich am Denys-Drash-Syndrom, einer Erkrankung des Urogenitalsystems. Patienten, die am Denys-Drash-Syndrom leiden, haben oft eine Mutation im WT1-Gen, welche für einen nukleären Zinkfinger-Transkriptionsfaktor codiert. Eine *knock in*-Maus mit einer Punktmutation (R394W) im WT1-Gen reproduzierte die Pathologie und das Fortschreiten der Erkrankung in ähnlicher Weise wie sie bei Patienten beschrieben wurde (Gao *et al.* 2004).

3.2.3 Kritische Aspekte

In den vorangegangenen Kapiteln sind die Vorteile der *knock in* Mausmutanten als Modelle zur funktionellen Charakterisierung von Proteinen deutlich geworden. Eine kritische Betrachtung dieses Modells zeigt jedoch auch Aspekte auf, die bei der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse beachtet werden sollten.

Zum einen wird in einer *knock in* Mutante der Locus durch das Einbringen der zum Ausschneiden der Neokassette notwendigen Erkennungssequenzen für die Rekombinase verändert, da nach Deletion des Neo-Gens eine der beiden Sequenzen im Locus immer noch vorhanden ist.

Zum anderen wird die Sequenz des eingebrachten Gens häufig, wie hier im Fall des Gfi1:Gfi1b-Konstruktes, als cDNA verwendet. Dies hat den Vorteil, dass der nicht homologe Bereich möglichst klein bleibt und dadurch eine Rekombination erleichtert wird. Diese Tatsache bringt es jedoch auch mit sich, dass die entsprechenden Introns fehlen. Ein Fehlen der Introns kann problematisch sein, wenn diese Introns Bereiche enthalten, die regulatorische Eigenschaften besitzen; die Expression des eingebrachten Transkripts würde unter diesen Bedingungen nicht mehr uneingeschränkt der des ersetzten Gens entsprechen.

3.3 Auto- und Kreuzregulation von Gfi1 und Gfi1b

Diverse Veröffentlichungen zeigten, dass viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren, darunter Jun, PU.1, C/EBP α , GATA1 und GATA2 autoreguliert sind (Angel *et al.* 1988; Tsai *et al.* 1991; Chen *et al.* 1995; Timchenko *et al.* 1995; Grass *et al.* 2003). Häufig wird

durch Bindung des betreffenden Proteins an den eigenen Promotor die eigene Transkription aktiviert oder reprimiert.

Mittels Chromatin-Immunpräzipitationsexperiment wurde *in vivo* eine Bindung von Gfi1 an den eigenen Promotor nachgewiesen (Yücel *et al.* 2004). Reporteranalysen zeigten zudem *in vitro* eine Autoregulation von Gfi1 sowie deren Aufhebung, bedingt durch die P2A Mutation (Doan *et al.* 2004; Yücel *et al.* 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Verlust der Autoregulation von Gfi1 aufgrund der P2A-Mutation zum ersten Mal *in vivo* gezeigt.

Mit den Protein-Expressionsanalysen der Gfi1:P2A *knock in* Mäuse, die den Verlust der Autoregulation demonstrierten, sollte eigentlich primär überprüft werden, ob unter Verwendung eines Gfi1-Antikörpers und Zellextrakten aus dem Thymus ein Protein in der richtigen Größe detektiert werden kann, um auszuschließen, dass nur ein Teil des Proteins translatiert wurde (die ordnungsgemäße Transkription wurde zuvor durch Sequenzierung bestätigt). Eindeutig zeigte dieser Western Blot jedoch nicht nur die richtige Größe des Proteins, sondern auch die durch die P2A-Mutation in der SNAG-Domäne vermittelte Aufhebung der repressorischen Wirkung von Gfi1 auf die eigene Promotoraktivität: Die Expression des mutierten Gfi1 in den homozygoten Gfi1:P2A Mäusen war wesentlich höher als in den Wildtyp-Tieren.

In vivo konnte zudem die gegenseitige Regulation von Gfi1 und Gfi1b, beruhend auf der Nutzung gleicher DNA-Bindestellen in den jeweiligen Promotoren gezeigt werden (Doan *et al.* 2004; Yücel *et al.* 2004; Vassen *et al.* 2005).

Angedeutet hatte sich die Kreuzregulation bereits in den Western Blot-Analysen der Gfi1:Gfi1b *knock in*-Mäuse; hier war die Menge an Gfi1b-Protein in den homozygoten Gfi1:Gfi1b T-Lymphozyten im Vergleich zu den heterozygoten und den Wildtyp-Tieren leicht erhöht. Wesentlich deutlicher wurde die Regulation der Gfi1-Expression durch Gfi1b in der Analyse der Gfi1:GFP x *vav*-Gfi1b transgenen Mäuse, in denen die gemessene Abnahme der GFP-Fluoreszenzintensität in den Mäusen mit transgener Gfi1b-Expression einer Reduktion der Gfi1-Expression entsprach. Zunächst erstaunlich war die Tatsache, dass die Regulation zelltypspezifisch zu sein schien: Während lymphoide Zellen einer Kreuzregulation unterlagen, zeigte die Gfi1b-Expression in myeloiden Zellen keinen Effekt auf die Gfi1-Promotoraktivität. Diese beobachtete spezifische Regulation wird durch eine andere Studie bestätigt, in der mittels transgen exprimiertem und retroviral eingeschleustem Gfi1 dessen Autoregulation ebenfalls in lymphoiden, nicht aber in myeloiden Zell-Linien nachgewiesen wurde (Doan *et al.* 2004).

Zunächst wurde vermutet, dass diese Beobachtung mit der Coexpression von Gfi1 und Gfi1b im Knochenmark zu tun haben könnte. Es wurde angenommen, dass die Promotoren beider Gene in myeloiden Zellen eine Art von Schutzmechanismus gegen die Kreuzregulation aufgebaut haben und dass dieser Schutz im Thymus nicht vorhanden ist, weil dort beinahe ausschließlich Gfi1 exprimiert wird.

Die Ergebnisse, die in den Analysen der Gfi1:Gfi1b *knock in* Mäuse gewonnen wurden, widersprachen diesem „Schutzmechanismus-Modell“. Gfi1b war im gesamten hämatopoetischen System in der Lage, die Funktion von Gfi1 nahezu komplett zu übernehmen: Die homozygoten Gfi1:Gfi1b *knock in* Mäuse zeigten neben einem weitgehend normalen Thymus-Phänotyp die Fähigkeit zur Bildung neutrophiler Granulozyten und damit keine Neutropenie. Insgesamt ist es daher wahrscheinlicher, dass die Kompensation unabhängig von der endogenen Gfi1b Expression stattfindet; ausschlaggebend ist, dass die Expression in einer angemessenen Art und Weise erfolgt. Sowohl eine transgene Gfi1b-Expression im Thymus wie auch eine spezifische Gfi1b-Expression unter Kontrolle des Gfi1-Promotors sind in der Lage, die Kompensation der Gfi1-Defizienz zu ermöglichen. Außerdem scheint die repressorische Wirkung der essentielle Faktor für die Aufhebung der Defizite zu sein, die aus dem Gfi1-Verlust resultieren.

Folgende Beobachtungen unterstützen diese Annahme:

1. Im Transgen-Modell konnte nur dort, wo eine Regulation von Gfi1 durch Gfi1b mittels Messung der GFP-Fluoreszenzintensität gezeigt wurde (in den lymphoiden Zellen) eine Gfi1-Funktionsübernahme durch Gfi1b gezeigt werden. In myeloiden Zellen im Knochenmark, wo keine Kreuzregulation erkennbar war, konnten hingegen trotz Transgen-Expression weiterhin keine reifen Granulozyten nachgewiesen werden.
2. Die Analyse des Gfi1:P2A *knock in* Modells demonstrierte, dass der Verlust der Repressoraktivität von Gfi1 alle untersuchten Funktionen des Proteins so stark beeinträchtigte, als wäre keine Gfi1-Expression vorhanden.

3.4 Gründe für eine nur partielle funktionelle Homologie von Gfi1 und Gfi1b

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine weitgehende Funktionsübernahme von Gfi1 durch Gfi1b im hämatopoetischen System möglich war; jedoch an keiner Stelle eine komplette Ersetzbarkeit beobachtet werden konnte, so dass sich die Frage nach der Ursache stellt.

Denkbar wäre, dass die beiden Proteine sich leicht in ihrer Funktion, Akkumulation oder Stabilität unterscheiden. Ursache für die nur partielle funktionelle Homologie könnte

aber ebenso eine unterschiedliche mRNA Akkumulation und/oder Translationsfähigkeit sein. Auch eine beliebige Kombination dieser Faktoren käme in Betracht.

Es ist außerdem nicht ausgeschlossen, dass sich nicht nur Gfi1 und Gfi1b unterscheiden, sondern auch transgen exprimiertes und nicht transgen exprimiertes Gfi1b. Würde das transgen exprimierte Gfi1b zum Beispiel in Granulozyten schneller abgebaut, so würde dies die fehlende Aufhebung der Neutropenie durch transgen exprimiertes Gfi1b erklären.

Es könnte aber auch sein, dass eine exakte Expression von Gfi1b essentiell ist, um die Defekte in Gfi1 defizienten Mäusen vollkommen zu beheben. Zwar gewährleistet ein *knock in* Mausmodell bereits eine sehr spezifische Expression und eine sehr gute Annäherung an die endogene Expression von Gfi1, jedoch sind manchmal durch die Konstruktion bedingte leichte Auswirkungen auf die Expression nicht auszuschließen. Wie schon unter 3.2.3 erwähnt, wurden durch das Einbringen der Gfi1b-Sequenz in den Gfi1-Lokus in Form von cDNA die in dem ersetzten Bereich befindlichen Introns zerstört. Eines dieser Introns wurde als Ort einer Gfi1-Bindestelle beschrieben, die an der Regulation des Gfi1 Lokus beteiligt ist (Doan *et al.* 2004). Dass durch den Eingriff in den Lokus grundsätzlich Veränderungen stattfinden, die unter Umständen die Regulation beeinflussen können, kann nicht ausgeschlossen werden.

Neben der beobachteten funktionellen Homologie von Gfi1 und Gfi1b in großen Teilen des hämatopoetischen Systems zeigte sich, dass der Defekt im Innenohr der Gfi1 defizienten Tiere durch Expression von Gfi1b nicht aufgehoben wurde. Die genaue Betrachtung der immunhistochemischen Bilder der Innenohren führt zwar zu der Feststellung, dass der Defekt in den Haarzellen des Innenohrs der Gfi1:Gfi1b *knock in* Mäuse verglichen mit den Gfi1 *knock out* Mäusen nicht ganz so dramatisch ist, jedoch ist die Folgerung einer partiellen Funktionsübernahme durch Gfi1b nicht zwingend. Es ist in diesem Zusammenhang wichtig darauf hinzuweisen, dass sich die Entwicklung der Haarzellen im Innenohr in einem sehr engen Zeitfenster vollzieht; schon ein paar Stunden Unterschied im Präparations-Zeitpunkt können die beobachteten Variationen erklären. Zwar lag der Präparations-Zeitpunkt immer am Tag der Geburt, leichte Unterschiede können aber darin begründet sein, dass der stundengenaue Geburtszeitpunkt nicht festgestellt werden konnte, zumal die Tiere meistens nachts geboren wurden. Hinzu kommt der Zeitraum, der vor allem bei einer großen Anzahl von Würfen zwischen der ersten und letzten Präparation verstreicht. Auch ein nur geringer Unterschied in der Länge der Tragezeit des Muttertieres könnte zu einem leicht unterschiedlichen Alter der verschiedenen Genoty-

pen führen. Aufgrund dessen ist die Annahme, dass Gfi1b den Gfi1-Verlust im Ohr teilweise kompensieren kann, nicht weiter belegbar.

Da eine fehlende Expression von Gfi1b im *knock in* Innenohr ausgeschlossen werden konnte, stellt sich die Frage, weshalb Gfi1b im Ohr nicht in der Lage ist, Gfi1 wie im hämatopoetischen System zu ersetzen. Es wäre beispielsweise möglich, dass im Ohr andere Domänen des Gfi1-Proteins für dessen Funktion wichtig sind als im hämatopoetischen System. Vergleicht man die Struktur von Gfi1 und Gfi1b, so stellt man fest, dass der größte strukturelle Unterschied beider Proteine in dem Bereich zwischen SNAG- und Zinkfingerregion besteht. In dieser intermediären Domäne ist die Aminosäuresequenz sehr verschieden. Man könnte daher vermuten, dass dieser Domäne im Ohr eine besondere Rolle zukommt. Eine Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen der intermediären Domäne wurde bislang für zwei Proteine gezeigt: für PIAS3 (Rödel *et al.* 2000) und erst in diesem Jahr für Ataxin-1 (Tsuda *et al.* 2005). Die Interaktion mit Ataxin-1 wurde sowohl zwischen dem humanen Ataxin-1 und Gfi1 wie auch für das Atx1 aus *Drosophila* mit Senseless, dem zu Gfi1 homologen Protein in *Drosophila*, beschrieben.

Die Tatsache, dass Atx-1 mit Gfi1 interagiert, ist nicht uninteressant, weil eine wichtige Rolle von Gfi1 bei SCA-1 (spinocerebelläre Ataxie Typ1) postuliert wird: Durch die Interaktion wird die Degradation von Gfi1 in Purkinjezellen des Kleinhirns erhöht, was wiederum zur selektiven Purkinjezell-Degradation in SCA-1 führt. Für die im Rahmen dieser Arbeit zu erklärenden Effekte im Ohr ist diese Interaktion jedoch nicht geeignet, da bisher keine Expression von Ataxin-1 im Innenohr beschrieben worden ist.

Hier bietet eine mögliche Interaktion von Gfi1 mit PIAS3 eine naheliegendere Erklärungsmöglichkeit. Wie bereits in der Einleitung geschildert, inhibiert PIAS3 die DNA-Bindung von STAT3; eine Interaktion von PIAS3 mit Gfi1 führt dagegen durch Hemmung der PIAS3-Wirkung zur transkriptionellen Aktivierung von STAT3.

Von STAT3 ist wiederum bekannt, dass es genauso wie Gfi1 in den äußeren Haarzellen exprimiert wird (Hertzano *et al.* 2004). Schon vor einigen Jahren wurde berichtet, dass STAT3 das Überleben sensorischer Neurone fördert (Alonzi *et al.* 2001) und auch dazu in der Lage ist, die Transkription von Mitgliedern der Bcl2-Familie, wie Bcl2 und Bcl-xL zu induzieren (Catlett-Falcone *et al.* 1999; Fukada *et al.* 1996).

Es ist denkbar, dass Gfi1 die Differenzierung der äußeren Haarzellen oder das Überleben der Haarzellen fördert, indem es mit PIAS3 interagiert und in Folge dessen die STAT3 Signalgebung beeinflusst (Hertzano *et al.* 2004).

Wäre die Interaktion mit PIAS3 nur mit Gfi1, nicht aber mit Gfi1b möglich, könnte dies den Unterschied in der Fähigkeit erklären, die Haarzelldifferenzierung zu fördern. Durch

die geringe Homologie in der intermediären Domäne der beiden Proteine ist es nicht unwahrscheinlich, dass Gfi1b nicht mit PIAS3 interagieren kann. Ein erster Versuch, um diese Hypothese zu belegen, wurde von Lothar Vassen im IFZ durchgeführt. In einer Co-Immunpräzipitation mit Zellextrakten, die große Mengen endogenes Gfi1b exprimierten, konnte keine direkte Interaktion zwischen Gfi1b und PIAS3 gezeigt werden. Unter anderem mittels Co-Immunpräzipitationsexperimenten war der Nachweis einer Interaktion von Gfi1 mit PIAS3 gelungen (Rödel *et al.* 2000) Zunächst kann davon ausgegangen werden, dass Gfi1b nicht in der Lage ist, mit PIAS3 zu interagieren; um dies überzeugend zu belegen, werden weitere Untersuchungen folgen.

Denkbar wäre auch, dass die intermediäre Domäne von Gfi1 wichtig für die Erreichbarkeit bestimmter Zielgene von Gfi1 ist oder Co-Faktoren an diese Domäne binden. Außerdem könnte es möglich sein, dass die mittlere Proteindomäne von Gfi1 eine Rolle in Chromatin-Modifikationsprozessen spielt.

3.5 Bestätigung des Hertzano-Modells zur Regulation von Gfi1 im Innenohr

Die geschilderte Erklärung für einen Funktionsunterschied zwischen Gfi1 und Gfi1b im Innenohr, der durch die intermediäre Domäne vermittelt werden könnte, erklärt nicht die Tatsache, dass der Innenohr-Defekt auch vorhanden ist, wenn die SNAG-Domäne nicht funktionell ist.

Mit großer Wahrscheinlichkeit kann ausgeschlossen werden, dass die Zinkfingerregion am C-Terminus eine wichtige Rolle im Innenohr spielt, denn diese ist sowohl in der P2A-Mutante wie auch im Gfi1b-Protein vorhanden. Dies bedeutet aber auch, dass die Funktion von Gfi1 im Innenohr nicht nur durch die intermediäre Domäne vermittelt werden kann, da diese in der P2A-Mutante ebenfalls vorhanden ist. Die Tatsache, dass die SNAG-Domäne wiederum im Gfi1b-Protein funktionsfähig ist, läßt vermuten, dass nicht nur eine der beiden Domänen für die Ausbildung von Innenohr-Haarzellen wichtig ist, sondern vielmehr das Vorhandensein bzw. die Funktionalität beider Domänen essentiell ist.

Ein zuvor entworfenes Modell zur Regulation der Differenzierung von äußeren Haarzellen im Innenohr wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt (Hertzano *et al.* 2004). Das Modell geht davon aus, dass der wichtigste Transkriptionsfaktor für die Bildung von Haarzellen im Innenohr, das bHLH-Protein Math1, indirekt durch Gfi1 reguliert wird. Eine Reduktion der Math1-Expression führt zu defekten Innenohr-Haarzellen. Die indi-

rekte Regulation von Gfi1, die in diesem Modell postuliert wird, findet durch Repression von Id1 oder Id2 (Inhibitor of DNA-binding 1/2) statt. Id-Proteine waren zuvor als Zielgene von Gfi1 beschrieben worden und sind in Teilen des Innenohrs exprimiert (Jen *et al.* 1997; Yücel *et al.* 2004). In dem Modell nach Hertzano wird die Regulation von Math1 über Id-Proteine vermittelt, da diese an bHLH-Transkriptionsfaktoren, wie Math1, binden und dadurch deren Dimerisierung sowie DNA-Bindung unterbinden können (Sikder *et al.* 2003).

Auf diese Weise könnte Gfi1 mit intakter SNAG-Domäne eine repressorische Wirkung auf Id-Proteine ausüben, während ein nicht reprimierend wirkendes Gfi1 in Summe zur Repression von Math1 und damit zur Degeneration der äußeren Haarzellen des Innenohrs führen könnte.

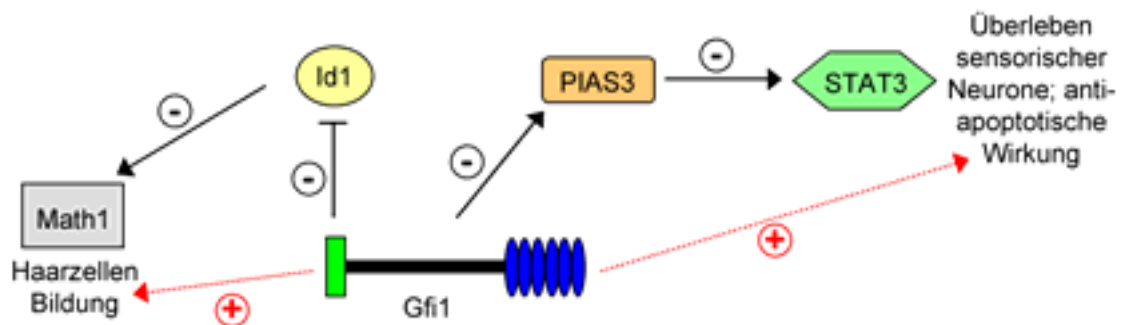


Abb. 3.1: Modell nach Hertzano: Regulation der Differenzierung der äußeren Haarzellen im Innenohr, vermittelt durch Gfi1. Eine Interaktion von Gfi1 mit PIAS3 hemmt die inhibierende Wirkung von PIAS3 auf STAT3. Die hemmende Wirkung von Gfi1 auf Id1 könnte eine mögliche negative Regulation von Id1 auf Math1 verhindern. Insgesamt würden durch Gfi1 sowohl die STAT3-Signalgebung wie auch die Math1 Expression positiv beeinflusst.

3.6 Übertragbarkeit gewonnener Erkenntnisse auf andere Spezies

Die Tatsache, dass in einer Spezies gewonnene Erkenntnisse auch auf andere grundsätzlich übertragbar sein können, zeigen verschiedene Studien. So ist bekannt, dass *atonal* aus *Drosophila* den Verlust des homologen Proteins in der Maus, *Math1* (*mouse atonal homolog 1*) kompensieren kann und umgekehrt (Wang *et al.* 2002).

Besonders wichtig für die medizinische Forschung ist natürlich die Übertragbarkeit von Erkenntnissen, die in der Maus gewonnen wurden, auf den Menschen. Die bislang wichtigste Studie über die Rolle von Gfi1 beim Menschen wurde im Jahr 2003 publiziert (Person *et al.* 2003). Hier wurden Neutropenie-Patienten im Hinblick auf eine Mutation im Gfi1-Gen untersucht und zwei Mutationen in der Zinkfingerregion des Gfi1-Proteins be-

schrieben, die sich dominant-negativ auswirkten. Dies ist insofern interessant, weil es die Bedeutung der Zinkfingerregion der Gfi1-Proteine zeigt.

Inwieweit diese Zinkfingermutationen im Mausmodell eine Relevanz zeigen, muss noch erforscht werden. Wären die Erkenntnisse direkt auf die Maus übertragbar, könnte man von einem schweren Defekt durch die Mutationen ausgehen, denn die P2A Mutation mit den sehr gravierenden Folgen wirkt im Maus-Organismus nicht dominant negativ; die heterozygoten Tiere zeigen keine der bekannten Defekte. Dass die P2A-Mutation bisher nicht beim Menschen beschrieben wurde, könnte zum einen dafür sprechen, dass sie auch beim Menschen nicht dominant negativ wirkt und daher seltener zu Auffälligkeiten führt, weil die Wahrscheinlichkeit für eine homozygote Mutation geringer ist als für eine heterozygote. Es könnte aber auch darauf hindeuten, dass nicht alle Erkenntnisse über die Funktionen eines Proteins zwischen den Spezies austauschbar sind.

3.7 Ausblick

Mit dem Abschluss dieser Arbeit bleiben noch einige Fragen ungeklärt. Die hier untersuchten *knock in* Mäuse wurden noch nicht im Hinblick auf alle bekannten Defekte der Gfi1 defizienten Tiere analysiert. So müßten insbesondere die sehr kleinen Zellpopulationen noch genauer untersucht werden.

In vergangenen Studien hatte sich herausgestellt, dass kleine Zellpopulationen sehr stark zwischen verschiedenen Mausstämmen variieren können; diese Variabilität spiegelte sich auch bei den hier untersuchten Tieren in den Analysen der hämatopoetischen Stammzellen wider; die Ergebnisse waren nicht reproduzierbar, daher wurden sie nicht in den Ergebnisteil dieser Arbeit mit aufgenommen. Zum Zeitpunkt der Analysen war die Rückkreuzung der Tiere in den C57BL/6 Hintergrund noch nicht beendet. Jetzt könnte man diese Analysen fortführen; würde man in den hämatopoetischen Stammzellen eine funktionelle Homologie zwischen Gfi1 und Gfi1b feststellen, so wäre die Durchführung einer Stammzell-Transplantation unerlässlich, um herauszufinden, ob die Zellen, die ihrer Anzahl nach dem Zustand des Wildtyps entsprechen wirklich funktional sind.

Zu den im Hinblick auf die beiden *knock in* Mausmodelle noch nicht analysierten Defekte der Gfi1 defizienten Tiere gehören auch die erst vor kurzem publizierten Phänotypen. Zum einen wäre dies die Fragestellung, ob die Gfi1b-Expression in Gfi1 defizienten Tieren den SCA-1 Phänotyp, d.h. den Verlust der Purkinjezellen im Kleinhirn aufheben kann (Tsuda *et al.* 2005) und ob dieser Defekt ebenfalls auf der repressorischen Wirkung von Gfi1 beruht. Zum anderen wäre eine eingehende Untersuchung des Darms interes-

sant, da im Darm kürzlich ein markanter Phänotyp bei Gfi1-Verlust beschrieben wurde (Shroyer *et al.* 2005). Auch die dendritischen Zellen müßten noch untersucht werden (Rathinam *et al.* 2005).

Alle in dieser Arbeit untersuchten Funktionen von Gfi1 fallen ohne dessen reprimierende Wirkung aus; es wäre daher von Bedeutung, Funktionen des Gfi1-Proteins zu analysieren, von denen angenommen wird, dass deren Ausführung unabhängig von einer intakten SNAG-Domäne ist. Eine Analyse der Makrophagen der Gfi1:P2A *knock in* Mäuse wäre ein Beispiel dafür, denn es wurde gemutmaßt, dass der Makrophagen-Phänotyp in Gfi1 defizienten Tieren SNAG-Domänen unabhängig sein könnte. Da Makrophagen jedoch ebenfalls eine sehr kleine Zellpopulation darstellen, konnte bisher keine Analyse dieser Zellen erfolgen.

Neben der Untersuchung weiterer Phänotypen, die aus einer Gfi1-Defizienz resultieren, wäre es von Interesse, Tiere einer Kreuzung aus Gfi1:Gfi1b *knock in* Mäusen mit Gfi1:GFP *knock in* Mäusen zu analysieren. Man könnte so eine Antwort auf die Frage finden, ob die Kreuzregulation von Gfi1 und Gfi1b in diesem Modell – wie man es nach den hier gewonnenen Ergebnissen erwarten würde – anders ist als die in der Transgen-Kreuzung beobachtete.

Eine weitere interessante Möglichkeit, die gewonnenen Erkenntnisse über die funktionelle Homologie von Gfi1 und Gfi1b zu erweitern, wäre die Konstruktion und Analyse weiterer *knock in* Modelle. Man könnte zum Beispiel die für Gfi1 codierende Sequenz in den Gfi1b-Lokus einsetzen oder *knock in* Mutanten generieren, in denen jeweils nur Teile des jeweils anderen Gens eingebaut sind.

Durch die mögliche Einflußnahme der endogenen Gfi1b-Expression auf die Aktivität des Gfi1-Promotors kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Defekte in den Gfi1 defizienten Mäusen einen abgeschwächten Phänotyp darstellen. Es wäre daher notwendig, konditionelle Doppel-*knock out* Mäuse herzustellen und zu analysieren – konditionelle deshalb, weil Gfi1b defiziente Tiere vor der Geburt sterben. Hier zeigen sich jedoch die Grenzen dieses Modells, denn durch die doppelte Gen-Deletion ist zwar die endogene Kompensation ausgeschaltet; der „künstliche“ Eingriff in den Organismus mit allen weiteren Kompensationsmechanismen, die dies nach sich zieht, ist jedoch wesentlich größer.

4 Zusammenfassung

Gfi1 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und der Innenohr-Entwicklung spielt. Mäuse, die defizient für Gfi1 sind, weisen eine starke Neutropenie, Defekte in der T-Lymphozytenentwicklung und in der Differenzierung der Haarzellen des Innenohrs auf. Eng mit Gfi1 verwandt ist das Gfi1b Zinkfinger-Protein; beide sind strukturell stark homolog, weisen jedoch unterschiedliche Expressionsmuster und *knock out* Phänotypen auf. Um die funktionelle Homologie von Gfi1 und Gfi1b näher untersuchen zu können, wurde die Gfi1-Genregion in der Maus durch die für Gfi1b codierende Sequenz ersetzt, wodurch eine Expression von Gfi1b unter Gfi1 spezifischen Kontroll-Elementen erreicht wurde.

Die durchgeführten Untersuchungen dieser Gfi1:Gfi1b *knock in* Mäuse zeigten, dass beide Proteine eine weitreichende funktionelle Homologie im hämatopoetischen System aufweisen: Durch die Gfi1b-Expression in Gfi1 defizienten Mäusen wird die Neutropenie aufgehoben und die Defekte in der T-Lymphozytenentwicklung werden abgeschwächt. Bei der Analyse der Innenohr-Haarzellen zeigte sich, dass diese funktionelle Homologie zelltypspezifisch ist: In sensorischen Zellen konnten die Defekte der Gfi1 Verlustmutante nicht durch die Gfi1b-Expression aufgehoben werden. Gfi1:Gfi1b *knock in* Mäuse weisen degradierte Haarzellen auf und sind taub.

Die Tatsache, dass Gfi1 reprimierend auf seine Zielgene wirkt, legt nahe, dass ein Verlust der repressorischen Wirkung des Proteins starke Auswirkungen auf dessen Funktion hat. *In vitro* war in früheren Studien die repressorische Wirkung von Gfi1 durch eine Punktmutation in der SNAG-Domäne aufgehoben worden. Um die Folgen des Verlustes der Repression *in vivo* untersuchen zu können, wurde in einem zweiten Mausmodell die zuvor beschriebene Punktmutation in das Gfi1-Gen eingeführt und der Phänotyp dieser Mäuse analysiert. Es zeigte sich, dass die repressorische Wirkung des Gfi1-Proteins für alle in dieser Arbeit untersuchten Funktionen unverzichtbar ist: Die Tiere waren, obwohl sie Gfi1 – in einer mutierten Form – exprimierten, nicht von den Gfi1 defizienten Mäusen unterscheidbar.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Häufig verwendete Lösungen und Medien

Sofern nicht anders vermerkt, beziehen sich die Prozentangaben bei Flüssigkeiten auf v/v und bei Feststoffen auf w/v.

Acrylamidlösung:	38% Acrylamid 2% N, N'-Methylenbisacrylamid
Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml Ethidiumbromid in TE
PBS:	137 mM NaCl 2,6 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,3 einstellen
20 x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
TAE:	40 mM Tris-Acetat, pH 7,8 2 mM EDTA, pH 8,0
TE:	10 mM Tris-HCl, pH 7,9 1 mM EDTA
6 x DNA-Ladepuffer:	50% Glycerol 0,02% Bromphenolblau

	0,04% Xylencyanol 1 mM EDTA
Ampicillin (1000 x):	80 mg/ml
Kanamycin (1000 x):	25 mg/ml
LB-Medium:	10 g/l NaCl 10 g/l Caseinhydrolysat 5 g/l Hefe-Extrakt pH 7,2 mit NaOH einstellen
LB-Agar:	15 g/l Bacto-Agar in LB Medium
P1 (Plasmid-Präp)	25 mM Tris/HCl pH8 10 mM EDTA 50 mM Glukose Lagerung bei 4°C
P2 (Plasmid-Präp)	0,2 N NaOH 1% SDS
P3 (Plasmid-Präp)	3 M Natriumacetat, pH 4,8
MMTB-Puffer	100 mM NaCl 80 mM EDTA, pH 8,0 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,2% SDS
Lysispuffer	750 µl MMTB-Puffer 35 µl Proteinase K (10 mg/ml) frisch zugegeben
4x SDS-Probenpuffer:	62 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% SDS 10% Glycerin

	100 mM DTT
	5% β -Mercaptoethanol
	0,025% Bromphenolblau
10x SDS-Laufpuffer	1,25 M Tris-Base
	2 M Glycin
	1% SDS
Proteinase-Inhibitoren, 1000x	1 mg/ml Aprotinin
	1 mg/ml E64
	1 M Na_3VO_4
	1 M Na_2MoO_4
	1 mg/ml Bestatin
	1mg/ml Pepstatin
	100 mg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
	in 20% DMSO/80% Methanol
Transfer-Puffer	5,82 g/l Tris-Base
	2,93 g/l Glycin
	3,75 ml 10% SDS
	200 ml Methanol
	ad 1l A. dest
10% APS-Lösung	10% Ammoniumpersulfat
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
	0,4% SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	0,4% SDS
Prähybridisierungslösung:	4 ml 20 x SSC
	4 ml 10% SDS
	0,2 g Magermilchpulver

	3 ml Heringssperma DNA (10 mg/ml) ad 40 ml
Hybridisierungslösung:	4 ml 20 x SSC 4 ml 10% SDS 0,2 g Magermilchpulver 3 ml Heringssperma DNA (10 mg/ml) ad 40 ml
Waschlösung (Southern-Blot)	2 x SSC 0,1% SDS
WCE-Puffer	25 mM HEPES, pH 7,9 500 mM NaCl 20% Glycerin 0,1mM EDTA 0,1mM EGTA 2 mM DTT Proteinaseinhibitoren, je 1 x in A. dest
5x Luziferase Lyse Puffer	125 mM Tris-phosphat pH7,8 10 mM DTT 10 mM 1,2 diaminocyclohexane-N, N, N', N'tetra- acetic acid 50% Glycerol 5% Triton X-100
Luziferase-Assay-Reagenz	20 mM Tricine 1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 2,67 mM MgSO_4 0,1 mM EDTA 33,3 mM DTT 270 μM Coenzym A 470 μM Luziferin

	530 μ M ATP
	pH 7,8 einstellen
Z-Puffer	60 mM Na_2HPO_4
	40 mM NaH_2PO_4
	10 mM KCl
	1 mM MgSO_4
	2 mM DTT
	1 mg/ml ONPG
	pH 7,0 einstellen

5.1.1.1 Verwendete Molekulargewichtsmarker

DNA-Längenstandard:	1 kb DNA-Leitermarker (Firma Genecraft)
	100 bp DNA-Leitermarker
	λ DNA-Marker
Protein-Längenstandard:	vorgefärbter SDS-PAGE Standard Größenmarker (Firma NEB)
	Rainbow-Marker (Firma Amersham)

5.1.2 Organismen

5.1.2.1 Bakterien

DH5 α : *supE44*, *hsdR17*, *recA*, Δ lacU169, (ϕ 80*lacZ* Δ M15), *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*

5.1.2.2 Mausstämme

Alle Verpaarungen wurden mit C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Zur Entfernung der Neokassette wurden Cre transgene Mäuse oder ROSA-Flp *knock in* Mäuse des Mausstammes C57BL/6 verwendet.

5.1.2.3 Zell-Linien:

NIH 3T3: Maus-Fibroblasten-Zell-Linie (ATCC 1658, adhärent, DMEM)

5.1.3 Zellkultur

5.1.3.1 Material aus der Instituts-Medienküche

Trypsin/EDTA (VT)	2 g/l Trypsin 0,2 g/l EDTA in PBS (pH 7,2) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
Penicillin/Streptomycin	6 g/l Penicillin 1000 µg/ml Streptomycin 8,0 g/l NaCl 0,4 g/l KCl 1,0 g/l Glukose 0,35 g/l NaHCO_3
DMEM (<i>Dulbeccos modified Eagle's Medium</i>)	4,5 g/l D-Glukose 29,23 g/l L-Glutamin 3,7 g/l NaHCO_3 pH 7,0

5.1.4 Chemikalien für die ES-Zellkultur

DMEM	mit 4,5 % (w/v) Glucose pH 7,0 (Firma Invitrogen)
2-Mercaptoethanol	10 mM (Firma Invitrogen)
FCS	fötale Kälberserum (Firma Gibco); einmalig vor Gebrauch 30 min bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert
Gentamicin	10 mg/ml H_2O (Firma Invitrogen)
L-Glutamin	200 mM L-Glutamin in PBS (Firma Invitrogen)
Na-Pyruvat	100 mM (Firma Invitrogen)

nicht-essentielle Aminosäuren	100 x in PBS (Firma Invitrogen)
Penicillin/Streptomycin	10.000 U Penicillin/10.000 U Streptomycin (Firma Invitrogen)
Trypsin/EDTA	1x Trypsin/EDTA (Firma ICN)
ESGRO-Lif (<i>leucemia inhibiting factor</i>)	107 Units/ml
G418	100 mg/ml in PBS (Firma Invitrogen)
Ganciclovir (Cymeven)	400 mM in PBS (Firma Syntex, Roche)
Selektionsmedium: ES-Medium mit 1,75 ml G418 und 2,5 µl Ganciclovir	

5.1.5 Verwendete Antikörper

5.1.5.1 Immunoblot-Antikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
α -Gfi1	polyklonales Kaninchen Serum (IgG) gegen Gfi1-Protein aus der Maus	Schmidt <i>et al.</i> , 1998
α -Gfi1b	polyklonales Kaninchen Serum (IgG) gegen Gfi1b-Protein aus der Maus	Lothar
α -VP16	monoklonaler Maus-Antikörper (IgG ₁)	Firma Santa Cruz
β -Aktin	polyklonaler Ziegen-Antikörper	Firma Santa Cruz
α -Kaninchen	Peroxidase-gekoppelter Sekundär- antikörper gegen primäre monoklonale Kaninchen-Antikörper des Typs IgG	Firma Dianova

α -Maus	Peroxidase-gekoppelter Sekundär-antikörper gegen primäre monoklonale Maus-Antikörper des Typs IgG	Firma Dianova
α -Ziege	Peroxidase-gekoppelter Sekundär-antikörper gegen primäre monoklonale Ziegen-Antikörper des Typs IgG	Firma Dianova

5.1.5.2 Durchflußzytometrie-Antikörper

Bezeichnung	Markierung	Herkunft
CD4	PE	Pharmingen, USA
CD8 α	PerCP-Cy5.5	Pharmingen
CD11b (Mac-1)	PerCP-Cy5.5	Pharmingen
CD117(c-Kit)	APC	Pharmingen
Ly-6G (Gr-1)	FITC	Pharmingen
CD16/CD32 (Fc γ Rezeptor III/II)	Biotin	Pharmingen
CD3	Biotin	Pharmingen
CD25	APC	Pharmingen
CD44	PE	Pharmingen
Ter-119	Biotin	Pharmingen
Pan-NK	Biotin	Pharmingen
B220	Biotin	Pharmingen

5.1.5.3 Verwendete Oligonukleotide

für die semiquantitative PCR zur Amplifizierung von Gfi1b:

5'- CGCGGATCCATGCCACGGTCCTTTCTA -3'

5'- AGGTGTGTTTCTTCATGTCC -3'

zur Amplifizierung von Gfi1:

5'- GCGCTCATTCTGGTCAAGA -3'

5'- TGTGTGGATGAAGGTGTGTT -3'

für die überlappende PCR:

5'- GATAGCAGAGTGGGATCCACGCAGG -3'

5'- GGTGGTCAGCCGCTGGACGAATG -3'

5'- CATTTCGTCAGCGGCTGACCACCATGCCACGGTCC -3'

5'- GAATGGTACCAGAGCATGTCTGTGA -3'

5.2 Methoden

5.2.1 Mikrobiologische Arbeitstechniken

5.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zunächst wurden die Bakterien auf einer LB-Agar Platte ohne Antibiotikum ausplattiert, am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie isoliert und in 2 ml LB-Medium ohne Antibiotikum überführt. Diese über Nacht geschüttelte Vorkultur wurde in 200 ml LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,5 bei 37°C inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Die Bakterienkultur wurde in 50 ml Gefäße überführt und bei 4500 Upm 5 min zentrifugiert. Pro Bakterienpellet wurden dann 20 ml 0,1 M $CaCl_2$ (eiskalt) zugegeben, vorsichtig resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Dann wurden die Ansätze 5 min bei 4500 Upm zentrifugiert und dem Pellet je 2 ml 0,1 M $CaCl_2$ zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde Glycerin in einer Endkonzentration von 20% zugegeben, die Bakterien aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

5.2.1.2 Transformation

Zur Transformation wurde der 10µl Ligationsansatz mit 80-200µl kompetenten Bakterien gemischt. Die Zellen wurden anschließend für 30 min auf Eis inkubiert, bevor ein Hitzeschock (90s, 42°C) durchgeführt wurde. Nach kurzem Abkühlen der Zellen auf Eis (5 min), wurde der Ansatz auf LB-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen und die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.2.2 DNA-/RNA-Arbeitstechniken

5.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach der klassischen Methode

Zunächst wurden 1,5 ml einer über Nacht Kultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß dekantiert, dieses 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde das Bakterienpellet mit 100 µl P1 (kalt) resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl P2 zugegeben und die Probe kurz und vorsichtig gemischt. Nach 5 minütiger Inkubation wurden 150 µl P3 (kalt) hinzugefügt und der Ansatz vorsichtig, aber gründlich gemischt. Anschließend wurde 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml absolutem Ethanol versetzt und die Ansätze erneut wie zuvor zentrifugiert. Das

Pellet wurde getrocknet und in 50µl TE aufgenommen. Die Lagerung erfolgte zunächst bei 4°C.

5.2.2.2 Plasmid DNA-Aufreinigung im großen Maßstab

Für DNA-Isolierung in größerer Menge wurde das Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet. Es wurden 250 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur sedimentiert und die DNA nach Herstellerangaben über Ionenaustauschersäulen isoliert. Aufgenommen wurde die DNA in TE. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

5.2.2.3 Restriktionsendonuklease-Reaktion von DNA

Die Restriktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Analytische Reaktionsansätze enthielten 1-2 µg DNA, ein entsprechendes Volumen Reaktionspuffer und Enzym im Überschuß (10-15 U), um eine vollständige Restriktion zu gewährleisten. Die Ansätze wurden bis zu 2 Stunden bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Erhitzen oder Zugabe von DNA-Ladepuffer gestoppt. Präparative Ansätze enthielten bis zu 40 µg DNA.

5.2.2.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele mit einer Agarose-Konzentration von 0,8-2% (w/v) eingesetzt. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer gelöst; Ethidiumbromid wurde in einer Endkonzentration von 0,4 µg/ml vor dem Gießen des Gels zugesetzt. Nachdem die Geltaschen befüllt worden waren, wurde eine elektrische Spannung von 5-15 V/cm Laufstrecke angelegt.

5.2.2.5 Auffüllen von 5'überhängenden DNA-Enden

Zum Auffüllen 5'überhängender DNA-Enden wurde Klenow-Fragment, das eine 5'-3' Polymerase-Aktivität besitzt, verwendet. Je µg DNA wurde 1 µl Klenow-Fragment und dNTPs in einer Endkonzentration von 2 mM eingesetzt. Die Reaktion konnte bei Pufferkompatibilität in dem zuvor verwendeten Restriktionspuffer erfolgen, andernfalls wurde nach einer Aufreinigung der DNA 10 x Klenow-Puffer eingesetzt. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung gestoppt.

5.2.2.6 Glätten von 3'überhängenden Enden

Das Glätten von 3'überhängenden Enden erfolgte mit T4-DNA-Polymerase, die neben der 5'-3'-Polymerase-Aktivität auch eine 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt. Je µg DNA wurde 1 U T4-DNA-Polymerase und dNTPs in einer Endkonzentration von 0,1 mM ein-

gesetzt. Der T4 DNA-Polymerase-Puffer wurde in entsprechender Menge zugegeben und eine Inkubation für 20 min bei 11°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch 10 minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt.

5.2.2.7 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation des Vektors zu vermeiden wurden die Phosphatgruppen am 5'-Ende entfernt. Die Dephosphorylierung erfolgte im zuvor verwendeten Restriktionspuffer, indem der Restriktionsansatz mit 0,5 µl alkalischer Phosphatase (CIP; New England Biolabs) versetzt und bei 37°C für 15 min inkubiert wurde. Anschließend wurde die DNA aufgereinigt.

5.2.2.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe des *PCR Purification Kit* von Qiagen wurden DNA-Fragmente aus enzymatischen Reaktionsansätzen und nach einer PCR aufgereinigt. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen. Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach einer Restriktion wurden diese mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und unter Zuhilfenahme des *Qiaquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert.

5.2.2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Proben wurde vom Sequenzierservice des Uniklinikums Essen durchgeführt. Es wurde eine modifizierte Sanger-Methode mit Fluoreszenz-markierten Nukleotiden durchgeführt

5.2.2.10 Ligation

Die Ligation wurde überwiegend in 10 µl-Ansätzen durchgeführt, der entsprechend mit Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA Ligase (Firma NEB) versehen war. Das molare Mengenverhältnis von DNA-Fragmenten zu Vektor-DNA betrug etwa 6:1, wobei bis zu 200 ng Vektor-DNA eingesetzt wurden. Die Ligation fand meistens bei Raumtemperatur statt (30 min bis einige Stunden bei *blunt end*-Klonierungen).

5.2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen wurden in 50 µl Ansätzen durchgeführt. Je Ansatz wurden 50-200 ng DNA, je 2 µl der beiden Oligonukleotide (10 pmol/µl), 1 µl dNTPs (10mM), 1 U Taq-Polymerase, 5 µl PCR-Puffer (10x) und zusätzlich bei GC-reichen Sequenzen 10%

DMSO eingesetzt. Der Ansatz wurde auf 95°C erhitzt, anschließend wurde folgendes Programm gestartet:

Denaturierung:	30 s 95°C
Annealing	30 s 55-65°C (abhängig von den Primern)
Elongation	60 s 72°C (ca. 60s/1000bp)
abschließende Elongation	5 min

Es wurden zwischen 25-35 Zyklen dieses Programms durchgeführt.

5.2.2.12 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Immobilisierte Nukleinsäuren wurden durch spezifische DNA-Sonden nachgewiesen, die mittels *MegaprimeTM DNA Labelling Kit* markiert worden waren. Dazu wurde Matrizen-DNA durch Restriktion eines rekombinanten Plasmids hergestellt. Für die Amplifizierung mittels Klenow-Fragment wurden Hexanukleotide als Primer und für die Strangsynthese markierte dCTPs verwendet. Wie vom Hersteller angegeben, wurden 50 ng DNA mit 5 µl random Primern aus dem *MegaprimeTM DNA Labelling Kit* versehen und der Ansatz mit H₂O auf 32 µl aufgefüllt. Nachdem der Ansatz 5 min auf 95°C erhitzt und danach wieder auf Eis abgekühlt worden war, wurden 10 µl 5x Puffer, 2 µl Klenow-Enzym (5 U/µl) und 5 µl ($\alpha^{32}\text{P}$) dCTP zugegeben und der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 25 µl Stoppuffer beendet und die Sonde mittels *Nucleotide Removal Kit* der Firma Qiagen von den freien Nukleotiden getrennt.

5.2.2.13 Transfer und Immobilisierung von DNA

Zum Transfer von DNA auf eine Nylonmembran (Blotting Nylon Membran, Fluka) wurde die DNA nach einer Restriktion zunächst mittels Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde dann für 20 min mit 250 mM HCl behandelt, um die DNA zu hydrolysieren. Anschließend wurde es in einer 0,4 M NaOH-Lösung für 20 min neutralisiert. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut: Ganz unten lag ein Stapel Papier, dieser wurde mit 5 Lagen trockenem Whatman-Papier versehen, darauf wurden zwei Lagen Whatman-Papier gelegt, die zuvor in 0,4 M NaOH-Lösung angefeuchtet worden waren. Auf diesen Stapel wurde die angefeuchte Nylonmembran und darauf das Gel gelegt. Ganz oben lagen weitere zwei angefeuchtete Lagen Whatman-Papier sowie eine Brücke aus Whatman-Papieren, die auf beiden Seiten des Stapels in ein Gefäß mit 0,4 M NaOH ragten. Der Transfer wurde über Nacht ausgeführt. Am nächsten Tag wurde die Membran für 2 min in 1x SSC

geschwenkt und anschließend durch UV-Vernetzung in einem Stratalinker der Firma Stratagene bei 120 mJ an die Membran gebunden.

5.2.2.14 Prähybridisierung und Waschen der hybridisierten Nylonmembranen

Die Nylonmembran mit der DNA wurde zunächst 2 h bei 65°C mit Prähybridisierungslösung und gekochter Heringssperma-DNA inkubiert. Danach wurde die markierte Sonde mit gescherter Heringssperma-DNA versetzt und 5 min im Wasserbad gekocht. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung durch vorgewärmte Hybridisierungslösung ersetzt und das DNA-Gemisch hinzugegeben. Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgte bei 65°C über Nacht in einem Hybridisierungsöfen. Am nächsten Tag wurde die Membran mit auf 65°C vorgewärmtem Waschpuffer kurz abgespült, danach solange gewaschen, bis in der Waschlösung keine radioaktive Strahlung detektierbar war.

5.2.2.15 Isolierung von RNA

Zum Arbeiten mit RNA wurden ausschließlich bei 180°C hitzesterilisierte Geräte verwendet und alle Lösungen wurden mit DEPC-H₂O (0,1% Diethylcarbonat) angesetzt. Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mittels PeqGold der Firma PeqLab nach Herstellerangaben. Nach der Isolation der RNA wurde ein Aliquot der RNA im Agarosegel aufgetrennt, um die Qualität zu prüfen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

5.2.2.16 Reverse Transkription

Zunächst wurde die Gesamt-RNA 30 min mit DNaseI (Promega) behandelt. Pro Reaktion wurden dann, sofern vorhanden, 5 µg RNA (mindestens jedoch 2 µg RNA) zum Umschreiben in cDNA eingesetzt. Nach Herstellerangaben wurde die Erststrangsynthese unter Verwendung einer reversen Transkriptase mit der Bezeichnung SuperscriptIITM der Firma Invitrogen durchgeführt.

5.2.2.17 Isolierung von genomischer DNA

Je Ansatz wurden die Zellen in 750 µl MMTB-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 56°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze 15 min bei 13000 Upm zentrifugiert und der Überstand mit 750 µl Isopropanol versetzt. Dann wurden die Proben erneut zentrifugiert und die DNA-Pellets anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Aufgenommen wurde die DNA in der Regel in 50 µl TE; die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Für die Spaltung von genomischer DNA wurden hochkonzentrierte Restriktionsendonukleasen verwendet und die Reaktion über Nacht ausgeführt.

5.2.2.18 Quantitative Real-Time-PCR

Die QRT-PCR wurde in einem 20 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Im Reaktionsansatz waren 900 nM jedes Primers, 250 nM TaqMan Sonde und *TaqMan Universal Master Mix* (Firma Applied Biosystems). Durchgeführt wurde die Reaktion mittels *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System* (Firma Applied Biosystems) unter Verwendung von Primern der Firma Applied Biosystems (sog. *assays on demand*): Zur Amplifizierung von Gfi1 wurde Mm 00515853_m1 und für Gfi1b wurde Mm 00492319_m1 verwendet. Es wurden immer Dreifachbestimmungen vorgenommen.

5.2.2.19 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Konzentration von verdünnten Lösungen wurde durch Messen der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Hierbei lagen der Konzentrationsbestimmung folgende Formeln zugrunde:

RNA-Konzentration = $OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$ (µg/ml)

DNA-Konzentration (doppelsträngige DNA) = $OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$ (µg/ml)

5.2.3 Zellkultur-Techniken

5.2.3.1 Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zell-Linien wurden in einer 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre in Kultur gehalten. Zum Passagieren wurden die Zellen nach Mediumentfernung mit PBS gespült, anschließend mit Trypsin benetzt und von der Zellkulturschale gelöst. Ein Aliquot dieser Zellen wurde auf eine frische Zellkulturschale mit Medium gegeben.

5.2.3.2 Transfektion von Zellen durch Elektroporation

Pro 14 cm Schale (Firma Nunc) konnten zwei bis drei Transfektionen ausgeführt werden. Die Zellen wurden dazu trypsiniert, in Medium aufgenommen und 5 min bei 1000 Upm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden das Zellpellet mit PBS gewaschen und erneut wie oben zentrifugiert. Pro Transfektionsansatz wurden 10 µg DNA eingesetzt und zusammen mit den in 200 µl Medium ohne weitere Zusätze aufgenommenen Zellen in die Elektroporationsküvetten gegeben. Der Stromstoß wurde mit 230 V und 500 µF bei höchster Kapazität verabreicht. So schnell wie möglich wurde der Transfektionsansatz mit Medium in die entsprechenden Zellkulturschalen gegeben.

5.2.3.3 ES-Zellkultur

Zur Herstellung der heterozygoten *knock in* ES-Zellen wurde die Zell-Linie R1 verwendet, die in Brutschränken bei 6,5% CO₂-Gehalt und 95% relativer Luftfeuchte kultiviert wurde. Die ES-Zellen wuchsen auf MEFs im LIF enthaltenden-Medium, um eine Ausdifferenzierung der Zellen zu vermeiden.

5.2.3.4 Transfektion und Selektion von ES-Zellen

ES-Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert. Dazu wurden 5×10^7 Zellen in 750 µl PBS aufgenommen und mit 30 µg linearisiertem Rekombinationsvektor (in 50 µl PBS) versehen. Die Elektroporation erfolgte mittels Gene Pulser II der Firma Biorad (800 V, 3 µF). Anschließend wurden die Zellen 30 min bei 4°C inkubiert. Zur Kultivierung wurden die MEFs zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml ES-Medium versetzt. Dann wurden die ES-Zellen mit 4 ml ES-Medium versetzt und auf fünf 10 cm Zellkulturschalen mit MEFs ausgesät. Am Tag nach der Elektroporation wurde das Medium gegen Selektionsmedium ausgewechselt. In den darauffolgenden 7-9 Tagen wurde der tägliche Mediumwechsel möglichst im 24 Stundenabstand vollzogen. Dann wurden einzelne Zellklone mit Hilfe eines Mikroskops isoliert: Dazu wurde das Medium auf den Platten mit den ES-Zellen abgesaugt und die Zellen mit PBS überschichtet. Es wurden zwei 96er Lochplatten (Firma Nunc) vorbereitet; eine mit Trypsin versehen und eine zweite, auf die zuvor MEFs ausgesät worden waren. Die mittels einer Pipette isolierten ES-Zellklone wurden in die Trypsin-Platte überführt. Nach Isolation von 8-16 Klonen wurde ES-Medium zugegeben und ein Großteil der Zellen auf die zweite, mit MEFs bewachsene Lochplatte gesetzt. Zwei Tage nach dem Transfer wurden die Zellen trypsiniert, mit Einfriermedium versehen und eingefroren (in einer Styroporbox bei -80°C). Die übrigen Zellen auf der Platte ohne MEFs wurden auf eine 48er Lochplatte gesetzt und bis zur Konfluenz kultiviert, um genomische DNA isolieren und mittels Southern-Blot-Verfahren homolog rekombinierte Klone zu identifizieren zu können. Positive Klone wurde im Anschluß daran aufgetaut und expandiert.

5.2.3.5 Herstellung embryonaler Maus-Fibroblasten (MEFs)

Zur Isolierung der MEFs wurden trächtige, Neo-resistente C57BL/6 Mäuse an Tag 13-14 *post coitum* getötet und die Embryonen entnommen. Nachdem Kopf und alle inneren Organe entfernt wurden, wurde der Torso zerkleinert, indem er über eine Kanüle in eine Spritze gezogen wurde. Das Gewebe wurde danach einmal mit PBS gewaschen und zweimal 15 min in Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die jeweiligen Überstände wurden

abgenommen und Medium zugegeben. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und ausgesät (ca. 5×10^6 Zellen pro 14 cm Zellkulturschale der Firma Nunc). Konfluent gewachsene Zellen wurden bestrahlt. Zur Verwendung in der ES-Kultur wurden die Zellen auf zuvor gelatinisierte Zellkulturschalen oder -platten ausgesät.

5.2.3.6 Passagieren von Zellen

Konfluent gewachsene Zellen wurden zur Ablösung der Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 0,5% Trypsin/0,2% EDTA inkubiert und die Reaktion nach Zugabe von FCS-enthaltenem Zellkulturmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in neue Zellkulturschalen ausgesät.

5.2.3.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden zunächst trypsiniert und anschließend für 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 10% DMSO/90% FCS resuspendiert, in Cryo-Röhrchen überführt und in Cryo-Einfrierbehältern der Firma Nunc bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zeit zum Auftauen der Zellen wurde möglichst kurz gehalten, indem die Zellen entweder in der Hand oder im Brutschrank aufgetaut wurden. Anschließend wurden sie mit entsprechendem Medium versehen.

5.2.4 Durchflußzytometrie

5.2.4.1 Isolation von Zellen aus Organen

Einzelzellsuspensionen aus T-Lymphozyten wurden angefertigt, indem die entsprechenden Organe zwischen zwei geschliffenen Objektträgern in kaltem PBS zerrieben wurden. Anschließend wurden die Zellen zur Abtrennung von Geweberesten filtriert (mittels Pasteurpipetten, die mit Baumwolle gestopft waren).

Einzelzellsuspensionen aus Knochenmarkzellen wurden angefertigt, indem der Femur der Tiere mit PBS (unter Verwendung einer Spritze) ausgespült und die Zellen in eine Zellkulturschale überführt wurden. Vor der durchflußzytometrischen Untersuchung wurde die Zellzahl mittels CASY-1 Zellzählgerät der Firma Schärfe bestimmt.

5.2.4.2 Erythrozytenlyse

Vor Einsatz der Milz- und Knochenmarkzellen in durchflußzytometrischen Untersuchungen oder zur Zytospin-Analyse, wurden die Erythrozyten lysiert, indem die pelletier-

ten Zellen mit Ammoniumchlorid-Lysispuffer (Firma Pharmingen) versetzt und 5 min inkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FCS-enhaltenem PBS gestoppt. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1000 Upm) und in PBS mit 2% FCS aufgenommen.

5.2.5 Aufnahme und Analyse von Zellen mittels FACS

Die Durchflußzytometrie erlaubt die Analyse und Sortierung von Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und der Kopplung von Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörpern an ihre Oberflächenmoleküle. Für die Analyse von Oberflächenproteinen auf hämatopoetischen Zellen wurden zunächst Einzelzellsuspensionen hergestellt und gegebenenfalls eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Die Inkubation der Zellen mit FACS-Antikörpern fand in PBS mit 2% FCS statt. Um unspezifische Bindungen der Oberflächen-Antikörper an Fc-Fragmente von Oberflächen-Immunglobulinen zu vermeiden, wurden die Zellen vor der eigentlichen Färbung mit 1 μ l α Fc γ III/II Rezeptor Antikörper versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Fluorochrom- oder Biotin-gekoppelten Antikörper (je nach Hersteller 1-5 μ l) zugegeben und die Ansätze für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Die Ansätze wurden dann einmal mit PBS gewaschen und in ca. 300 μ l PBS zur Messung mittels FACSCalibur (Firma Becton Dickinson; BD) aufgenommen. Dazu wurde das Programm CellQuest (Firma BD) verwendet. Die Analyse der aufgenommenen Daten erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms Flow Jo (Firma Tree Star).

5.2.6 Protein-Arbeitstechniken

5.2.6.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher, denaturierender Polyacrylamidgele (10% oder 12%) in einer Mini-Protein-Gelapparatur der Firma Keutz. Vor Beladen des Gels wurden die Proteine mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer für 2-4 Stunden bei 20-30 mA. Nach dem Lauf wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nylonmembran transferiert.

5.2.6.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen wurde mittels Bradford-Reagenz (Firma Bio-Rad) und unter Verwendung eines Photometers (Firma Eppendorf) bestimmt. Es wurde 1 μ l des

zu vermessenden Ansatzes mit 200 µl Bradford-Reagenz und 800 µl H₂O gemischt, bei Raumtemperatur inkubiert und im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

5.2.6.3 Transfer der Proteine und Proteinnachweis (Western Blot-Immunoblot)

Der Transfer von Proteinen auf Nylonmembranen fand nach dem Semi-dry-Verfahren (Transfer-Apparatur der Firma Keutz oder BIO-RAD) statt. Auf eine Graphit-Anode wurde ein Blot in folgender Reihenfolge übereinander geschichtet: Drei Lagen Whatman-Papier, angefeuchtet mit Transfer-Puffer, eine angefeuchtete Hybond C Membran (Firma Amersham), das Polyacrylamidgel und obenauf weitere drei Lagen Whatman-Papier (angefeuchtet). Der Transfer lief 1,5-2 Stunden bei 1,5 mA/cm². Zur Kontrolle des Transfers fand eine Färbung mit PonceauS (0,2% in 0,3% Trichloressigsäure) statt; anschließend wurde die Membran mit PBS wieder entfärbt.

Zum Proteinnachweis wurden freie Bindungsstellen auf der Membran zunächst durch mindestens 30 minütige Inkubation in 5% Milchpulverlösung (in PBS/0,05% Tween) bei RT abgesättigt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper fand über Nacht bei 4°C in der Blockierlösung statt. Sie wurden 1:5000 verdünnt eingesetzt (α -VP16, α -Gfi1b). Die Membran wurde anschließend drei- bis viermal mit 0,05% Tween 20 in PBS gewaschen und eine Stunde bei RT mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Zweitantikörper (1:10000 in Blockierlösung, HRPO-markiert Esel α -Maus/Hase/Ziege IgG (H+L) F(ab)₂-Fragment der Firma Dianova). Nach mindestens dreimaligem Waschen mit 0,05% Tween 20 in PBS wurde der Immunoblot unter Verwendung des *Super Signal West Dura* Substrats entwickelt (bestehend aus zwei Komponenten, von der Firma Pierce).

5.2.6.4 Gesamtproteinextraktion aus Zellen

Zur Gesamtproteinextraktion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 1ml kaltem PBS unter Verwendung eines Zellschabers von der Zellkulturschale abgelöst. Dann wurden die Zellen bei 2000 Upm und 4°C 5 min pelletiert und anschließend in Gesamtproteinextrakt-Puffer (WCE-Puffer) aufgenommen. Anschließend wurden sie zweimal mittels Trockeneis eingefroren und wieder aufgetaut (auf Eis). Zur Proteinisolation aus Thymusgewebe wurden die Zellen zusätzlich 15 s bei 15% Aktivität beschallt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 13000 Upm für 10 min konnte der Überstand zur Western-Blot-Analyse eingesetzt oder eingefroren werden.

5.2.7 Luziferase-Reportergenanalyse

Einen Tag vor der Transfektion wurden 50000 NIH3T3-Zellen pro Vertiefung einer 12er Lochplatte in 1ml Medium ausgesät. Pro Ansatz wurden bis zu 1 µg Promoterkonstrukt und 500 ng Expressionsplasmid eingesetzt. Um die Transfektionseffizienz beurteilen zu können und eine Normalisierung der Werte durchzuführen, wurden außerdem pro Ansatz 200 ng β-Gal-Plasmid transfiziert. Es wurden immer Dreifachbestimmungen durchgeführt. Je Transfektionsansatz werden 28 µl Medium und 2 µl Rotifect (Firma Roth) eingesetzt. Die Reaktion wurde bei RT für 20-45 min inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit je 0,4 ml DMEM (mit 10% FCS, ohne Antibiotikum) versetzt. In jede Vertiefung der 12er Lochplatte wurden 60 µl des Transfektionsansatzes pipettiert und gemischt. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel mit DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin durchgeführt.

Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte am zweiten Tag nach der Transfektion. Die Zellen wurden dazu mit PBS gewaschen und anschließend in 150 µl Lysis-Puffer pro Ansatz gelöst. Die lysierten Zellen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 1min bei 13000 Upm zentrifugiert. In die Messung wurden 50 µl Lysat eingesetzt. Für die anschließende β-Gal-Messung wurden je Ansatz 20 µl Lysat in eine 96er Lochplatte überführt, mit 200 µl Z-Puffer+ONPG (4:1) versehen und ca. 30 min bei RT inkubiert (bis die Ansätze leicht gelblich waren).

5.2.8 Arbeitstechniken zur Innenohr-Analyse

5.2.8.1 Fixierung von Gewebe mittels Paraformaldehyd (PFA)

Die Innenohren der neugeborenen Mäuse wurden in frisch angesetzter 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Dazu wurden die Innenohren in eine kleine, auf Eis stehende Zellkulturschale mit kaltem 4% PFA gegeben und mittels einer Spritze mit kleiner Nadel etwas PFA in das ovale Fenster der Ohren gespritzt, so dass Luftblasen und das PFA durch das runde Fenster wieder austreten konnten. Anschließend wurden die Ohren in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert, mit kaltem 4% PFA befüllt und auf dem Schüttler über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung durch kaltes PBS ersetzt und die Ohren so schnell wie möglich gekühlt nach Israel versendet.

Zur Zubereitung von 250 ml 4% PFA in PBS wurden zunächst 10 g PFA abgemessen, mit 40 ml A. dest. versehen und unter dem Abzug im Wasserbad auf 65°C erhitzt. Dann wurden 50 µl 10N NaOH zugegeben und die Lösung unter Rühren weiter erhitzt (65°C). Nach dem Lösen des PFA wurden 10 ml 25xPBS zugegeben und die Lösung auf Eis ab-

gekühlt. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,2-7,3 eingestellt und auf 250 ml mit A.dest aufgefüllt. Die PFA-Lösung wurde gefiltert und bis zur Verwendung gekühlt. Insgesamt wurde sie nur eine Woche verwendet oder nicht verwendete Reste eingefroren. Vor jedem Einsatz wurde der pH-Wert nachgemessen.

5.2.8.2 Auditory Brainstem Response (ABR)

Für die Analyse wurden gleichaltrige Wildtyp, *Gfi1 knock out* und *Gfi1:Gfi1b knock in* Mäuse verwendet. Sie wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit 2,5% Avertin anästhesiert und auf eine Wärmeplatte (37°-38°C) gelegt. Am Scheitel und Kinn der Mäuse wurden Elektroden, an den hinteren Gliedmaßen wurde ein Erdungsstab befestigt. Die ABR-Audiogramme wurden als Antwort auf Tonimpulse (8, 16, 32 kHz) gemessen. Die Hörschwelle wurde ermittelt, indem für jede Frequenz die Schalldruckpegel in 10 dB-Schritten variiert wurden, um den niedrigsten Schwellenwert zu identifizieren, bei dem eine Antwort des Hirnstamm noch aufgezeichnet werden konnte. Die ABR-Messung wurde von einer Arbeitsgruppe in Tel Aviv durchgeführt.

5.2.8.3 Morphologische Analyse der hämatopoetischen Zellen

Zur morphologischen Analyse der hämatopoetischen Zellen wurden Zytospins von Knochenmark- und Milzzellen angefertigt. Außerdem wurden Blutausstriche vorgenommen. Die May-Grünwald-Giemsa Färbung der Zellen wurde vom Hämatologie-Labor des Uniklinikums Essen durchgeführt. Aufgenommen wurden die Zellen mit einem 100fach Objektiv und 10fach Okular.

5.2.8.4 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz-Färbungen sowie die Aufnahme der Bilder wurden von Ronna Hertzano in Israel durchgeführt. Dazu wurden die hier präparierten Innenohren fixiert (5.2.8.1) und so schnell wie möglich nach Israel transportiert.

Die genaue Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbungen wurde in der Veröffentlichung von Ronna Hertzano ausführlich beschrieben (Hertzano *et al.* 2004). Für diese Arbeit wurde der Myosin VI-Antikörper (Firma Sigma) mit dem Alexa Fluor 594 konjugierten Zweitantikörper detektiert (rot; Firma Molecular Probes). Das filamentöse Aktin in diesen Schnitten wurde mit Alexa Fluor 488 konjugiertem Phalloidin inkubiert (grün, Firma Molecular Probes). In der zweiten Färbung wurde das acetylierte Tubulin (Firma Sigma) mit einem FITC-Zweitantikörper detektiert (grün, Firma Pierce); Aktin wurde in diesem Fall mit Rhodamin Phalloidin markiert (rot, Firma Molecular Probes).

6 Literatur

- Alonzi, T., G. Middleton, S. Wyatt, V. Buchman, U.A. Betz, W. Muller, P. Musiani, V. Poli, und A.M. Davies. 2001. Role of STAT3 and PI 3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 18: 270-82.
- Angel, P., K. Hattori, T. Smeal, und M. Karin. 1988. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55: 875-85.
- Bell, D.W., T. Taguchi, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, C.B. Gilks, P. Zweidler-McKay, H.L. Grimes, P.N. Tschlis, and J.R. Testa. 1995. Chromosomal localization of a gene, GF1, encoding a novel zinc finger protein reveals a new syntenic region between man and rodents. *Cytogenet Cell Genet* 70: 263-7.
- Ben-Arie, N., A.E. McCall, S. Berkman, G. Eichele, H.J. Bellen, und H.Y. Zoghbi. 1996. Evolutionary conservation of sequence and expression of the bHLH protein Atonal suggests a conserved role in neurogenesis. *Hum Mol Genet* 5: 1207-16.
- Bermingham, N.A., B.A. Hassan, S.D. Price, M.A. Vollrath, N. Ben-Arie, R.A. Eatock, H.J. Bellen, A. Lysakowski, und H.Y. Zoghbi. 1999. Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284: 1837-41.
- Bouchard, M., P. Pfeffer, und M. Busslinger. 2000. Functional equivalence of the transcription factors Pax2 and Pax5 in mouse development. *Development* 127: 3703-13.
- Bruins, W., E. Zwart, L.D. Attardi, T. Iwakuma, E.M. Hoogervorst, R.B. Beems, B. Miranda, C.T. van Oostrom, J. van den Berg, G.J. van den Aardweg, G. Lozano, H. van Steeg, T. Jacks, und A. de Vries. 2004. Increased sensitivity to UV radiation in mice with a p53 point mutation at Ser389. *Mol Cell Biol* 24: 8884-94.
- Catlett-Falcone, R., T.H. Landowski, M.M. Oshiro, J. Turkson, A. Levitzki, R. Savino, G. Ciliberto, L. Moscinski, J.L. Fernandez-Luna, G. Nunez, W.S. Dalton, und R. Jove. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10: 105-15.
- Chen, H., D. Ray-Gallet, P. Zhang, C.J. Hetherington, D.A. Gonzalez, D.E. Zhang, F. Moreau-Gachelin, und D.G. Tenen. 1995. PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* 11: 1549-60.

- Chung, C.D., J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta, und K. Shuai. 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278: 1803-5.
- Dale, D.C., R.E. Person, A.A. Bolyard, A.G. Aprikyan, C. Bos, M.A. Bonilla, L.A. Boxer, G. Kannourakis, C. Zeidler, K. Welte, K.F. Benson, and M. Horwitz. 2000. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood* 96: 2317-22.
- Doan, L.L., M.K. Kitay, Q. Yu, A. Singer, S. Herblot, T. Hoang, S.E. Bear, H.C. Morse, 3rd, P.N. Tschlis, und H.L. Grimes. 2003. Growth factor independence-1B expression leads to defects in T cell activation, IL-7 receptor alpha expression, and T cell lineage commitment. *J Immunol* 170: 2356-66.
- Doan, L.L., S.D. Porter, Z. Duan, M.M. Flubacher, D. Montoya, P.N. Tschlis, M. Horwitz, C.B. Gilks, und H.L. Grimes. 2004. Targeted transcriptional repression of Gfi1 by GFI1 and GFI1B in lymphoid cells. *Nucleic Acids Res* 32: 2508-19.
- Duan, Z. und M. Horwitz. 2003. Targets of the transcriptional repressor oncoprotein Gfi-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5932-7.
- Dufourcq, P., S. Rastegar, U. Strahle, und P. Blader. 2004. Parapineal specific expression of gfi1 in the zebrafish epithalamus. *Gene Expr Patterns* 4: 53-7.
- Fuchs, B., T. Wagner, N. Rossel, M. Antoine, H. Beug, und J. Niessing. 1997. Structure and erythroid cell-restricted expression of a chicken cDNA encoding a novel zinc finger protein of the Cys + His class. *Gene* 195: 277-84.
- Fukada, T., M. Hibi, Y. Yamanaka, M. Takahashi-Tezuka, Y. Fujitani, T. Yamaguchi, K. Nakajima, und T. Hirano. 1996. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5: 449-60.
- Gao, F., S. Maiti, G. Sun, N.G. Ordonez, M. Udtha, J.M. Deng, R.R. Behringer, und V. Huff. 2004. The *Wt1*^{+/-R394W} mouse displays glomerulosclerosis and early-onset renal failure characteristic of human Denys-Drash syndrome. *Mol Cell Biol* 24: 9899-910.
- Geng, Y., W. Whoriskey, M.Y. Park, R.T. Bronson, R.H. Medema, T. Li, R.A. Weinberg, und P. Sicinski. 1999. Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell* 97: 767-77.
- Gilks, C.B., S.E. Bear, H.L. Grimes, und P.N. Tschlis. 1993. Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (*Gfi-1*) encoding a novel zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 13: 1759-68.

- Grass, J.A., M.E. Boyer, S. Pal, J. Wu, M.J. Weiss, and E.H. Bresnick. 2003. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8811-6.
- Greer, J.M., J. Puetz, K.R. Thomas, and M.R. Capecchi. 2000. Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. *Nature* 403: 661-5.
- Grimes, H.L., T.O. Chan, P.A. Zweidler-McKay, B. Tong, and P.N. Tsichlis. 1996. The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol* 16: 6263-72.
- Hertzano, R., M. Montcouquiol, S. Rashi-Elkeles, R. Elkon, R. Yücel, W.N. Frankel, G. Rechavi, T. Möröy, T.B. Friedman, M.W. Kelley, and K.B. Avraham. 2004. Transcription profiling of inner ears from Pou4f3(ddl/ddl) identifies Gfi1 as a target of the Pou4f3 deafness gene. *Hum Mol Genet* 13: 2143-53.
- Hock, H., M.J. Hamblen, H.M. Rooke, D. Traver, R.T. Bronson, S. Cameron, and S.H. Orkin. 2003. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity* 18: 109-20.
- Hock, H., M.J. Hamblen, H.M. Rooke, J.W. Schindler, S. Saleque, Y. Fujiwara, and S.H. Orkin. 2004. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431: 1002-7.
- Horwitz, M., K.F. Benson, R.E. Person, A.G. Aprikyan, and D.C. Dale. 1999. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat Genet* 23: 433-6.
- Jarman, A.P., Y. Grau, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 1993. atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the Drosophila peripheral nervous system. *Cell* 73: 1307-21.
- Jen, Y., K. Manova, and R. Benezra. 1997. Each member of the Id gene family exhibits a unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis. *Dev Dyn* 208: 92-106.
- Jero, J., D.E. Coling, and A.K. Lalwani. 2001. The use of Preyer's reflex in evaluation of hearing in mice. *Acta Otolaryngol* 121: 585-9.
- Jia, Y., G. Xie, J.B. McDermott, and E. Aamodt. 1997. The C. elegans gene pag-3 is homologous to the zinc finger proto-oncogene gfi-1. *Development* 124: 2063-73.
- Jin, J., H. Zeng, K.W. Schmid, M. Toetsch, S. Uhlig and T. Möröy. The zinc finger pro-

- tein Gfi1 acts upstream of TNF to attenuate endotoxin mediated inflammatory responses in the lung. *Eur. J. Immunol.*, 2006, im Druck.
- Karsunky, H., H. Zeng, T. Schmidt, B. Zevnik, R. Kluge, K.W. Schmid, U. Duhrsen, and T. Möröy. 2002. Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet* 30: 295-300.
- Kasai, S. und J.G. Scott. 2001. A house fly gene homologous to the zinc finger proto-oncogene Gfi-1. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 644-7.
- Malynn, B.A., I.M. de Alboran, R.C. O'Hagan, R. Bronson, L. Davidson, R.A. DePinho, und F.W. Alt. 2000. N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes Dev* 14: 1390-9.
- Möröy, T. 2005. The zinc finger transcription factor Growth factor independence 1 (Gfi1). *Int J Biochem Cell Biol* 37: 541-6.
- Nolo, R., L.A. Abbott, und H.J. Bellen. 2000. Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* 102: 349-62.
- Ogilvy, S., A.G. Elefanty, J. Visvader, M.L. Bath, A.W. Harris, und J.M. Adams. 1998. Transcriptional regulation of *vav*, a gene expressed throughout the hematopoietic compartment. *Blood* 91: 419-30.
- Orkin, S.H. 2000. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1: 57-64.
- Passegue, E., W. Jochum, A. Behrens, R. Ricci, und E.F. Wagner. 2002. JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nat Genet* 30: 158-66.
- Person, R.E., F.Q. Li, Z. Duan, K.F. Benson, J. Wechsler, H.A. Papadaki, G. Eliopoulos, C. Kaufman, S.J. Bertolone, B. Nakamoto, T. Papayannopoulou, H.L. Grimes, und M. Horwitz. 2003. Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet* 34: 308-12.
- Rathinam, C., R. Geffers, R. Yücel, J. Buer, K. Welte, T. Möröy, und C. Klein. 2005. The transcriptional repressor Gfi1 controls STAT3-dependent dendritic cell development and function. *Immunity* 22: 717-28.
- Roberts, T. und J.K. Cowell. 1997. Cloning of the human Gfi-1 gene and its mapping to chromosome region 1p22. *Oncogene* 14: 1003-5.
- Rödel, B., T. Wagner, M. Zörnig, J. Niessing, und T. Möröy. 1998. The human homologue (GFI1B) of the chicken GFI gene maps to chromosome 9q34.13-A locus fre-

- quently altered in hematopoietic diseases. *Genomics* 54: 580-2.
- Rödel, B., K. Tavassoli, H. Karsunky, T. Schmidt, M. Bachmann, F. Schaper, P. Heinrich, K. Shuai, H.P. Elsässer, und T. Möröy. 2000. The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3. *Embo J* 19: 5845-55.
- Saleque, S., S. Cameron, und S.H. Orkin. 2002. The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes Dev* 16: 301-6.
- Scheijen, B., J. Jonkers, D. Acton, und A. Berns. 1997. Characterization of pal-1, a common proviral insertion site in murine leukemia virus-induced lymphomas of c-myc and Pim-1 transgenic mice. *J Virol* 71: 9-16.
- Schmidt, T., H. Karsunky, B. Rödel, B. Zevnik, H.P. Elsässer, und T. Möröy. 1998b. Evidence implicating Gfi-1 and Pim-1 in pre-T-cell differentiation steps associated with beta-selection. *Embo J* 17: 5349-59.
- Schmidt, T., H. Karsunky, E. Gau, B. Zevnik, H.P. Elsässer, und T. Möröy. 1998a. Zinc finger protein GFI-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene* 17: 2661-7.
- Shroyer, N.F., D. Wallis, K.J. Venken, H.J. Bellen, und H.Y. Zoghbi. 2005. Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev* 19: 2412-7.
- Sikder, H.A., M.K. Devlin, S. Dunlap, B. Ryu, und R.M. Alani. 2003. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 3: 525-30.
- Timchenko, N., D.R. Wilson, L.R. Taylor, S. Abdelsayed, M. Wilde, M. Sawadogo, und G.J. Darlington. 1995. Autoregulation of the human C/EBP alpha gene by stimulation of upstream stimulatory factor binding. *Mol Cell Biol* 15: 1192-202.
- Tong, B., H.L. Grimes, T.Y. Yang, S.E. Bear, Z. Qin, K. Du, W.S. El-Deiry, und P.N. Tsichlis. 1998. The Gfi-1B proto-oncoprotein represses p21WAF1 and inhibits myeloid cell differentiation. *Mol Cell Biol* 18: 2462-73.
- Tsai, F.Y., C.P. Browne, und S.H. Orkin. 1998. Knock-in mutation of transcription factor GATA-3 into the GATA-1 locus: partial rescue of GATA-1 loss of function in erythroid cells. *Dev Biol* 196: 218-27.
- Tsai, S.F., E. Strauss, und S.H. Orkin. 1991. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev* 5: 919-31.

- Tsuda, H., H. Jafar-Nejad, A.J. Patel, Y. Sun, H.K. Chen, M.F. Rose, K.J. Venken, J. Botas, H.T. Orr, H.J. Bellen, and H.Y. Zoghbi. 2005. The AXH domain of Ataxin-1 mediates neurodegeneration through its interaction with Gfi-1/Senseless proteins. *Cell* 122: 633-44.
- Vassen, L., K. Fiolka, S. Mahlmann, and T. Möröy. 2005. Direct transcriptional repression of the genes encoding the zinc-finger proteins Gfi1b and Gfi1 by Gfi1b. *Nucleic Acids Res* 33: 987-98.
- Wallis, D., M. Hamblen, Y. Zhou, K.J. Venken, A. Schumacher, H.L. Grimes, H.Y. Zoghbi, S.H. Orkin, and H.J. Bellen. 2003. The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival. *Development* 130: 221-32.
- Wang, V.Y., B.A. Hassan, H.J. Bellen, and H.Y. Zoghbi. 2002. *Drosophila* atonal fully rescues the phenotype of Math1 null mice: new functions evolve in new cellular contexts. *Curr Biol* 12: 1611-6.
- Yücel, R., C. Kosan, F. Heyd, and T. Möröy. 2004. Gfi1:green fluorescent protein knock-in mutant reveals differential expression and autoregulation of the growth factor independence 1 (Gfi1) gene during lymphocyte development. *J Biol Chem* 279: 40906-17.
- Yücel, R., H. Karsunky, L. Klein-Hitpass, and T. Möröy. 2003. The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *J Exp Med* 197: 831-44.
- Zeng, H., R. Yücel, C. Kosan, L. Klein-Hitpass, and T. Möröy. 2004. Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *Embo J* 23: 4116-25.
- Zörnig, M., T. Schmidt, H. Karsunky, A. Grzeschiczek, and T. Möröy. 1996. Zinc finger protein GFI-1 cooperates with myc and pim-1 in T-cell lymphomagenesis by reducing the requirements for IL-2. *Oncogene* 12: 1789-801.
- Zweidler-Mckay, P.A., H.L. Grimes, M.M. Flubacher, and P.N. Tsichlis. 1996. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 16: 4024-34.

7 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

7.1 Fachartikel

Vassen, L., **K. Fiolka**, S. Mahlmann, und T. Möröy. 2005. Direct transcriptional repression of the genes encoding the zinc-finger proteins Gfi1b and Gfi1 by Gfi1b. *Nucleic Acids Res* 33: 987-98.

Vassen, L., **K. Fiolka** und T. Möröy. 2006. Gfi1b alters histone methylation at target gene promoters and sites of g-satellite containing heterochromatin
in Revision

Fiolka, K., R. Hertzano, L. Vassen, H. Zeng, O. Hermesh, K. B. Avraham, U. Dührsen und T. Möröy. 2006. Gfi1 and Gfi1b act equivalently in hematopoiesis but have distinct, non-overlapping functions in inner ear development. *EMBOreports*
in Druck

7.2 Poster

Fiolka K., L. Vassen, R. Yücel, F. Heyd und T. Möröy. Partial Rescue of the Growth-Factor-Independence 1 (Gfi1) null phenotype and negative regulation of Gfi1 expression by Gfi1b
12th International Congress of Immunology, Montreal; Clinical and investigative Medicine (CIM) Vol.27, No.4, August 2004

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Tarik Möröy für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Zellbiologie. Besonders hervorzuheben ist seine unerschütterliche Überzeugung davon, dass „am Ende alles gut werden wird“. Dies hat mich in Momenten der Verzweiflung über den Ausgang mancher Experimente wieder motiviert, mit neuem Optimismus weiterzumachen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Ulrich Dührsen für die Auszählung der Zellen in den Zytospins und Blutausrichen.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Karen B. Avraham und Ronna Hertzano. Ronnas Anleitung zur Innenohr-Präparation war so gut beschrieben, dass es mir gelungen ist, die Präparation hier in Essen durchzuführen. Ich danke Ronna außerdem für die Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbungen und die Aufnahme der wunderschönen Bilder dieser Färbungen.

Florian Heyd und Denise Pargmann waren nicht nur Kollegen, sondern auch „Leidensgenossen“. Ihnen möchte ich danken, weil es gut tat, sich ab und zu mal über die Lebenslage eines Doktoranden im Allgemeinen und Speziellen auszutauschen und sie immer für wertvolle Tipps im Laboralltag zu haben waren. Außerdem habe ich mit Denise viele kurzweilige Mittagspausen und mit Florian ebenso kurzweilige Fahrten zum Graduiererkolleg verbracht.

Herzlich danke ich Emeka Igwe, Cyrus Khandanpour und Taro Okayama für die hin und wieder notwendigen aufbauenden Worte.

Lothar Vassen sage ich Dank für die gute Zusammenarbeit, was das Gfi1b-Projekt betraf und natürlich besonders für die Co-IP, die in dem EMBO-Paper noch gefehlt hat, um die Reviewer zu überzeugen.

Ganz besonders danken möchte ich Wojtek Wegrzyn, ohne dessen großartige Blastozysteninjektionen keine der Mausmutanten je geboren wäre und der immer für ein nettes Pläuschchen zu haben war.

Bei Tomas Civela bedanke ich mich vor allem für diverse Plug- und Geburtenchecks am Wochenende und die superleckeren Fruchtbonbons, für die es sich schon gelohnt hat, nach dem Stand der Verpaarungen zu fragen.

Inge Spratte war der „gute Geist“ der Arbeitsgruppe. Sie hat neben der Herstellung unzähliger Southern-Blots und Mausschwanz-Biopsien für alle ein offenes Ohr gehabt und uns wöchentlich mit Kuchen oder anderen Köstlichkeiten versorgt. Sie ist ein herzenguter Mensch, der immer ein Kompliment auf den Lippen hat. Dafür danke ich ihr.

Insbesondere danke ich Hui Zeng für sowohl fachlichen Rat, aber auch viele interessante und kurzweilige Gespräche über die Forschung, die Doktorarbeit und das Leben an sich. Außerdem natürlich für die Einführung in die chinesische Kochkunst.

Ralph Waldschütz bin ich dafür dankbar, dass er in allen Dingen rund um die ES-Zellkultur und sämtlichen Fragen zu den Mäusen immer wertvollen fachlichen Rat geben konnte und durch das Organisieren von Mineralwasser dem Rest der Arbeitsgruppe viel Schlepperei erspart hat.

Christian Kosan danke ich dafür, dass er immer hilfsbereit war, wenn man alternative Versuchsprotokolle und Auskunft zu Methoden brauchte und wenn nötig auch bei der Entscheidungsfindung geholfen hat. Sein Witz trug zu einer angenehm lockeren Arbeitsatmosphäre bei.

Angelika Warda möchte ich für unzählige Minis, Maxis und SDS-Gele danken, die sie immer noch angefertigt hat, egal wieviele Kollegen sich ebenfalls auf der „to do Liste“ eingetragen hatten.

Außerdem möchte ich den ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danken. Jianmin Jin für viele lustige Gespräche und das freundschaftliche Verhältnis, Stefan Mahlmann für diverse mit trockenem Humor vorgetragene Witze, Raif Yücel für die fachliche Anleitung zur Herstellung der Konstrukte und der Benutzung des Durchflußzytometers, Malte Bachmann für sein soziales Engagement für die Gruppe und unterhaltsame Mittagspausen.

Mein größter und inniger Dank gilt meinen Eltern Monika und Arno Fiolka, die mir das Studium ermöglicht, meine Entscheidungen mitgetragen und mich in allen Lebenslagen unterstützt haben.

Der Dank meines Herzens gilt Torsten Wagner, der immer für mich da war und mich mit viel Geduld unterstützt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Katharina Fiolka
Geburtsdatum: 26.12.1977
Geburtsort: Bottrop
Familienstand: ledig
Anschrift: Güldenberg 8
46242 Bottrop

Schulbildung:

von/bis:
1984-1986 Fichteschule (Grundschule) in Bottrop
1986-1988 Agathaschule (Grundschule) in Bottrop
1988-1997 Josef-Albers-Gymnasium in Bottrop
(Abschluß: Abitur)

Studium:

1997-2002 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum

Diplomarbeit am Lehrstuhl für Tierphysiologie unter der Leitung von Prof. Dr. H. Lübbert mit dem Titel: Herstellung von DNA-Konstrukten für alpha-Synuclein knock in Maus-mutanten.

seit Juli 2002 Promotion am Institut für Zellbiologie (Universitätsklinikum Essen) in der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. T. Möröy

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2 Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Generierung zweier *knock in* Mausmutanten zur funktionellen Charakterisierung einzelner Domänen des Gfi1-Zinkfingerproteins" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Katharina Fiolka befürworte.

Essen, 13.12.2005

Prof. Dr. Tarik Möröy

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2 Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 13.12.2005

Katharina Fiolka

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2 Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, 13.12.2005

Katharina Fiolka