



(19) österreichisches  
patentamt

(10) AT 500 838 B1 2007-11-15

(12)

## Patentschrift

- (21) Anmeldenummer: A 674/2004 (51) Int. Cl.<sup>8</sup>: C12N 15/67 (2006.01)  
(22) Anmeldetag: 2004-04-20  
(43) Veröffentlicht am: 2007-11-15

(56) Entgegenhaltungen:  
CUNIFF, N.F.A. ET AL., THE JOURNAL  
OF BIOLOGICAL  
CHEMISTRY 268(11) (1993): 8317-8324  
MANUEL, M. ET AL., EUROPEAN  
JOURNAL OF BIOCHEMISTRY  
269(10) (2002): 2527-2537  
LARDANS, V. ET AL., BIOCHIMA ET  
BIOPHYSICA ACTA - GENE  
STRUCTURE AND EXPRESSION  
1519(3) (2001): 230-234

(73) Patentanmelder:  
VETERINÄRMEDIZINISCHE  
UNIVERSITÄT WIEN  
A-1210 WIEN (AT)

(54) **MULTIPLE HSE**

(57) Ein DNA-Molekül ist vorgesehen, welches 4-20, vorzugsweise 7-10, noch mehr bevorzugt 8, Konsensus-Sequenzen umfasst, wobei jede Konsensus-Sequenz aus 3 pentameren Einheiten besteht, wobei diese pentameren Einheiten eine Sequenz XGAAY oder eine inverse Sequenz Y'TTCX' aufweisen, worin X ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T, G und C, und Y von mindestens einer, vorzugsweise von zwei, noch mehr bevorzugt von allen drei dieser 3 pentameren Einheiten von mindestens einer Konsensus-Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T und C, wobei das Y der übrigen pentameren Einheiten der mindestens einen Konsensus-Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T, G und C, wobei im Falle, dass das DNA-Molekül mehr als 6 Konsensus-Sequenzen umfasst, Y aller pentameren Einheiten ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T, G und C.

AT 500 838 B1 2007-11-15

DVR 0078018

Die vorliegende Erfindung betrifft ein DNA-Molekül, die Verwendung eines DNA-Moleküls in einem Expressionssystem und ein Verfahren zur Herstellung eines Expressionssystems.

5 Komplizierte Gen-regulierende Netzwerke sind während der embryonalen Entwicklung aktiv. Das resultierende Timing der Gen-Aktivität bestimmt die Gen-Funktion in entscheidender Weise. Dieses Timing bestimmt sowohl das Vorhandensein eines induzierenden Signals, sowie die Kompetenz eines Gewebes, auf das Signal zu antworten. Beispielsweise ist bekannt, dass Signal-Transduktions-Wege, bei welchen Mitglieder der Fgf- und Wnt-Familien eine Rolle spielen, zahlreiche Funktionen während der embryonalen Entwicklung haben. Fehlexpressions-  
10 Versuche, welche diese Wege stören, können daher je nach dem Zeitfenster der Aktivität ganz entgegengesetzte Ergebnisse liefern. Von großer Bedeutung für diese Funktionserwerb-Versuche sind daher wirksame Induktionssysteme, die von außerhalb des Embryos gesteuert werden können.

15 Induzierbare Fehlexpressionssysteme bestehen aus zwei Komponenten: einem induzierbaren Transkriptionsfaktor und einem auf diesen Transkriptionsfaktor reagierenden Promotor. Im Falle von durch Hormone induzierbaren Systemen, dem tet-System, lac-Promotoren und dem rapalog-System wird eine Komponente durch einen von außen zugesetzten Arzneistoff beeinflusst und muss konstitutiv exprimiert werden, wogegen die zweite, die den induzierbaren Promotor  
20 zusammen mit dem Gen, an dem ein Interesse besteht, enthält, im nicht-induzierten Zustand transkriptional inaktiv sein muss. Diese entgegengesetzten Ebenen transkriptionaler Aktivität für die beiden Komponenten verhindern normalerweise eine Kombination innerhalb eines einzigen DNA-Konstrukts und erfordern eine separate Integration in das Genom. Eine erfolgreiche Anwendung *in vivo* hängt daher normalerweise von zwei transgenen Linien ab, die gekreuzt werden müssen. Im Gegensatz dazu werden Hitzeschockprotein(HSP)-Promotoren durch endogene Faktoren induziert, wodurch das System auf ein einziges ektopisches DNA-Konstrukt reduziert wird. Somit liefern HSP-Promotoren ein einfaches Einkomponenten-System für eine induzierbare Fehlexpression. Insbesondere sind Systeme wie Fische oder Insekten für die Induktion einer Hitzeschock-Reaktion bei erhöhten Temperaturen ideal.

30 Die Hitzeschock-Aktivierung ist eine hoch-konservierte Antwort auf zellulären Stress. Hitzeschockproteine, die als Chaperonine wirken, helfen der Zelle, die Stress-Situation zu überleben. Die Aktivierung dieser Antwort wird auf Transkriptions-Ebene reguliert, und Hitzeschockelemente (HSE), kurze Sequenzen, die in allen HSP-Promotoren vorhanden sind, wurden als wesentlich für die Stress-Induzierbarkeit identifiziert. HSEs enthalten multiple Kopien der 5-Basenpaar-Sequenz NGAAN, und eine detaillierte Mutationsanalyse identifizierte AGAAC als die optimale Sequenz (Cunniff und Morgan, The Journal of Biological Chemistry, 268 (11) (1993), 8317-8324). Die Anzahl der pentameren Einheiten in einem HSE kann variieren, jedoch ist ein Minimum von 3 für eine effiziente Hitze-induzierbare Expression erforderlich. Positioniert stromaufwärts eines heterologen Promotors können HSEs heterologen Promotoren eine Hitzestress-Induzierbarkeit verleihen. Der Hitzeschockfaktor 1 (HSF1) wurde als Zellkomponente identifiziert, die an diese Sequenz-Elemente bindet. Unter normalen Wachstumsbedingungen existiert HSF1 als phosphoryliertes Monomer, in welchem DNA-Bindungs- und Transkriptions-Aktivitäten unterdrückt sind. Als Antwort auf Hitzeschock und andere chemische, Umwelt- oder physiologische Stresse macht HSF1 eine Trimerisierung durch, bindet an das HSE und zeigt eine  
45 Transkriptionsaktivität. Mehrere Untersuchungen zeigten, dass die Temperatur, bei welcher HSF1 aktiviert wird, nicht feststeht, was impliziert, dass zusätzliche Faktoren wichtige Rollen bei der Regulierung der Aktivität dieses Proteins spielen. Die Bindung von HSF1 an HSE erwies sich als hoch kooperativ, Abweichungen von der NGAAN-Konsensus-Sequenz werden *in vivo* toleriert, weil multiple HSEs kooperative Interaktionen zwischen multiplen HSF-Trimeren fördern. Sequenz-Variationen der Bindungsstelle beeinflussen die Affinität von HSF1 für das HSE eines bestimmten Ziel-Gens und ergeben dadurch eine Feinabstimmung der Hitzeschock-Antwort. So zeigte ein direkter Vergleich zwischen einem natürlichen HSE aus dem humanen HSP70.1 Promotor und einer idealisierten Sequenz eine 57-fache Differenz in der Bindungsaffinität für HSF1.  
55

Hitzeschock-Promotoren wurden in verschiedenen Versuchssystemen umfassend verwendet. Die hoch-konservierte Natur der Hitze-Stress-Antwort ermöglicht die Verwendung heterologer Promotoren. So wurden Xenopus- und Maus-HSP70-Promotoren zuerst im Fisch-System getestet, worauf später Versuche mit Fisch-Promotoren folgten. Das bei diesen Versuchen beobachtete Hauptproblem zeigte große Mengen an Hintergrund-Aktivität für diese Promotoren. Im Gegensatz zu Drosophila werden bei Vertebraten die HSP70-Promotoren während bestimmter Entwicklungsstadien stark exprimiert, was die hohe Grundmenge in diesen Versuchen erklärt. Die Erzeugung transgener Linien kann dieses Problem verringern, doch werden transiente Injektions-Versuche durch die Undichtigkeit des Promotors behindert.

Transiente Injektions-Versuche stellen für Fisch- und Frosch-Embryonen ein Verfahren zum raschen Funktionserwerb dar. Bei Fisch-Embryonen führt die mRNA-Injektion im Einzellen-Stadium zu einer einheitlichen Fehlexpression im Embryo, wogegen injizierte DNA Verteilungsphänomenen unterliegt, die zu einer Mosaik-Expression führen. Es wurden daher verschiedene Modifizierungen getestet, um die DNA-Verteilung zu verbessern. Das kürzlich eingeführte Meganuklease-Verfahren führt zu einer gesteigerten Integrations-Effizienz der DNA in das Genom (Ristoratore et al., Development 26, 3769-79). Als Folge davon wird die integrierte DNA unter den somatischen Zellen stabil weitergegeben, wodurch die Menge der fehlexprimierenden Zellen stark erhöht wird. Außerdem wird die Anzahl der transgenen Nachkommen drastisch erhöht.

Die WO 87/00861 betrifft ein Hitzeschock-Steuerverfahren, wobei ein rekombinantes DNA-Gen unter der Transkriptions- und/oder Translations-Kontrolle eines Hitzeschock-Kontrollelements funktionell gebunden ist. Ein Kontrollelement ist eine Hitzeschock-Promotor-Konsensus-Region, wobei diese Region nicht mehr als 11 Desoxynukleotide einer Formel C (T/G) (C/A) GnnnnTTC umfasst, wobei n unabhängig ausgewählt ist aus A, T, C oder G. Spezifische Beispiele mutierter Promotor-Regionen sind gezeigt, wobei die Mutanten SE 1-12 nur synthetische Konsensusartige Sequenzelemente in ihren Promotoren (AGAAGCTTCT) enthalten, die 1 bis 12 mal wiederholt sind. Es wurde gezeigt, dass eine Mutante SE7, die 7 Sequenzelemente enthielt, die in den einem Hitzeschock ausgesetzten Zellen aktivste ist.

In der WO 98/06864 ist auch die Kontrolle der Gen-Expression unter Verwendung eines Hitzeschock-Protein-Promotors beschrieben, wobei erwähnt ist, dass das Hitzeschockelement die Sequenz nGAAn beinhaltet, die mindestens 2 mal in Kopf-an-Kopf- oder Schwanz-an-Schwanz-Orientierung nGAAnnTTCn oder nTTCnnGAAn wiederholt ist.

Die US 5 614 399 betrifft ein Verfahren zur induzierbaren Verstärkung der Expression einer DNA-Sequenz, wobei die DNA-Sequenz funktionell mit einer regulierenden Region verbunden ist, die aus einem Hitzeschockelement und einem Promotor besteht. Das Hitzeschockelement ist als CTGGAATTTCTAGA beschrieben. Eine Hitzeschock-regulierende Region, die multiple Hitzeschockelemente umfasst, ist geoffenbart.

Die EP 0 159 884 B1 betrifft einen Hitzeschock-Promotor, der die Konsensus-Sequenz CTXGAAXXTACXXX umfasst, wobei X A, T, C oder G ist.

Die WO 87/04727 A1 betrifft ein induzierbares Hitzeschock- und Amplifikationssystem, wobei das für ein Polypeptid oder Protein codierende Gen unter die Kontrolle eines induzierbaren Hitzeschock-Promotors gestellt wird. Der in diesem Dokument beschriebene Hitzeschock-Promotor wird jedoch aus einer eukaryontischen Quelle isoliert und ist daher ein natürlicher und nicht ein künstlich entworfener Promotor.

In Manuel M et al. (European J Biochem 269 (2002): 2527-2537) wird die Bestimmung der Konsensus-Bindungssequenz eines gereinigten embryonischen Hitzeschockfaktors beschrieben. Im Zuge dieser Arbeiten wurden „band shift assays“ durchgeführt, bei denen die Bindung des Hitzeschockfaktors zu einem Oligonukleotid, welches eine zunehmende Anzahl an konser-

vierten Pentameren mit der allgemeinen Sequenz nGAAM und deren reversen Sequenz m'TTCn', untersucht wird. Die Pentamere wurden in diesen Oligonukleotiden in 2 bis 6-facher Anzahl eingeführt.

- 5 In Lardans V et al. (Biochim Biophys Acta 1519 (2001): 230-234) wird eine idealisierte HSE Konsensus-Sequenz nGAAnnTTCnnGAAn offenbart.

Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist es daher, einen Promotor oder ein regulierendes Element für die Protein-Expression vorzusehen, welcher (welches) den bekannten Promotoren und regulierenden Elementen überlegene Eigenschaften hat, insbesondere mit einer geringen Hintergrund-Aktivität, einer hohen Induzierbarkeit und dem Fehlen einer Gewebe-spezifischen Expression.

15 Dieses Ziel wird mit einem DNA-Molekül erreicht, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es 4-20, vorzugsweise 7-10, noch mehr bevorzugt 8, Konsensus-Sequenzen umfasst, wobei jede Konsensus-Sequenz aus 3 pentameren Einheiten besteht, wobei diese pentameren Einheiten eine Sequenz XGAAY oder eine inverse Sequenz Y'TTCX' aufweisen, worin X ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T, G und C, und Y von mindestens einer, vorzugsweise von zwei, noch mehr bevorzugt von allen drei dieser 3 pentameren Einheiten von mindestens einer  
20 Konsensus-Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T und C, wobei das Y der übrigen pentameren Einheiten der mindestens einen Konsensus-Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T, G und C, wobei im Falle, dass das DNA-Molekül mehr als 6 Konsensus-Sequenzen umfasst, Y aller pentameren Einheiten ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T, G und C. Dieses DNA-Molekül erwies sich als optimal bei der Expressions-Induktion mit geringer Hintergrund-Aktivität, hoher Induzierbarkeit und fehlender Gewebe-spezifischer Expression.

Der Ausdruck „DNA-Molekül“ bezieht sich auf eine Sequenz, die bei Induktion die Protein-Expression induziert, wobei ein zusätzlicher, z.B. heterologer Promotor anwesend sein kann.

30 In Bezug auf die inverse Sequenz bezieht sich „X“ auf ein Nukleotid, das zum „X“ der nicht-inversen pentameren Einheit komplementär ist. Dies bedeutet, dass „X“ ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T, G und C. Das „Y“, welches zum „Y“ der nicht-inversen pentameren Einheit komplementär ist, ist daher ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus T, A und G für  
35 mindestens eine, vorzugsweise zwei, noch mehr bevorzugt alle, pentameren Einheiten mindestens einer Konsensus-Sequenz, wobei das „Y“ der übrigen pentameren Einheiten ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T, G und C. Daher umfasst im DNA-Molekül mindestens eine pentamere Einheit, sei es die inverse oder die nicht-inverse Sequenz, entweder ein Y, das ausgewählt ist aus A, T und C, oder ein Y', das ausgewählt ist aus A, T und G. Es zeigte sich,  
40 dass es im Falle, dass das DNA-Molekül eine geringere Anzahl von Konsensus-Sequenzen, z.B. zwei bis sechs Konsensus-Sequenzen, umfasst, wichtig ist, dass die Konsensus-Sequenz eine optimale Induzierbarkeit aufweist, was dann der Fall ist, wenn Y nicht ein G, oder Y' nicht ein C ist. Wenn jedoch das DNA-Molekül eine größere Anzahl von Konsensus-Sequenzen, z.B. mehr als sechs Konsensus-Sequenzen, umfasst, kann das Y oder das Y' ausgewählt sein aus  
45 der Gruppe bestehend aus A, T, G und C, da die höhere Anzahl von Konsensus-Sequenzen eine Protein-Expressions-Induktion mit besseren Eigenschaften bewirkt. Anders gesagt: je geringer die Anzahl der Konsensus-Sequenzen im DNA-Molekül ist, desto wichtiger ist es, eine optimale pentamere Einheit vorzusehen, was dann der Fall ist, wenn Y nicht G und Y' nicht C ist.

50 Es ist möglich, dass eine Konsensus-Sequenz nur nicht-inverse pentamere Einheiten XGAAY, oder nur inverse pentamere Einheiten Y'TTCX' umfasst. Es ist jedoch auch möglich, dass eine Konsensus-Sequenz zwei nicht-inverse pentamere Einheiten und eine inverse pentamere Einheit, oder eine nicht-inverse pentamere Einheit und zwei inverse pentamere Einheiten umfasst.  
55 Eine Konsensus-Sequenz kann identische pentamere Einheiten in Bezug auf das X/X' und Y/Y'

umfassen. Jedoch können in einer Konsensus-Sequenz zwei oder alle drei pentameren Einheiten im X/X' und Y/Y' variieren.

Das DNA-Molekül kann weiters identische Konsensus-Sequenzen oder nicht-identische Konsensus-Sequenzen umfassen, oder falls es drei oder mehr Konsensus-Sequenzen im DNA-Molekül gibt, so können zwei oder mehr Konsensus-Sequenzen identisch sein und die übrigen Konsensus-Sequenzen verschieden sein. Der Unterschied kann entweder in Bezug auf die Wahl des X und/oder Y (Y' und/ oder X'), oder in Bezug auf das Vorhandensein nicht-inverser und inverser Sequenzen, oder in Bezug auf beides, bestehen.

Es ist wichtig, dass das DNA-Molekül mindestens zwei Konsensus-Sequenzen umfasst. Das DNA-Molekül kann jedoch mehr als 10, mehr als 20, mehr als 30, mehr als 40 oder mehr als 50 Konsensus-Sequenzen umfassen. Weiters kann das DNA-Molekül zusätzliche Sequenzen, Sequenzfragmente oder einzelne Nukleinsäuren umfassen, die von jeder spezifischen oder nicht-spezifischen Sequenz sein können, oder selbst eine zusätzliche pentamere Einheit. Beispielsweise kann das DNA-Molekül 2 Konsensus-Sequenzen und zusätzliche 1 oder 2 pentamere Einheiten umfassen.

Das erfindungsgemäße DNA-Molekül umfasst 4-20, vorzugsweise 7-10, noch mehr bevorzugt 8, Konsensus-Sequenzen. Es zeigte sich, dass diese Mengen an Konsensus-Sequenzen optimal sind, da einerseits das DNA-Molekül eine ausreichende Anzahl an Konsensus-Sequenzen umfasst, um eine starke Induzierbarkeit zu zeigen, und andererseits das DNA-Molekül nicht zu lang ist, um negative Neben-Aktivitäten, wie Rekombination und anderes, zu zeigen.

Vorteilhaft sind die Konsensus-Sequenzen durch 2 bis 10 bp, vorzugsweise durch abwechselnd 3 und 6 pb, voneinander getrennt. Es zeigte sich, dass der jeweilige Faktor, z.B. der Hitzeschock-Faktor, optimal bindet, wenn die Konsensus-Sequenzen nicht direkt mit einander verbunden sind. Diese kurzen Abstandhalter-Sequenzen ermöglichen eine spezifische Bindung und Aktivierung des jeweiligen Faktors an jede Konsensus-Sequenz.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die mittlere pentamere Einheit mindestens einer, vorzugsweise jeder, Konsensus-Sequenz eine inverse Sequenz im Vergleich zu den äußeren pentameren Einheiten, vorzugsweise Sequenz Y'TTCX'. Dies bedeutet, dass die mittlere pentamere Einheit die nicht-inverse oder die inverse Sequenz sein kann, je nachdem, ob die beiden äußeren Sequenzen invers oder nicht-invers sind. Durch abwechselndes Vorsehen einer nicht-inversen und einer inversen Sequenz bindet der jeweilige Faktor stark und zeigt eine hohe Induzierbarkeit, wobei es sich als optimal erweist, wenn mindestens eine, vorzugsweise jede, Konsensus-Sequenz folgendermaßen aussieht: XGAAY Y'TTCX' XGAAY.

Vorteilhaft ist das X C oder G, noch mehr bevorzugt, A. Falls X ein C oder G ist, so zeigt der entsprechende Faktor ausgezeichnete Bindungs- und Aktivierungseigenschaften, die jedoch noch besser sind, falls X ein A ist. Demgemäß ist X' vorzugsweise G oder C, und noch mehr bevorzugt T. Dies gilt für mindestens ein X des gesamten DNA-Moleküls, vorzugsweise für mehrere X des DNA-Moleküls, noch mehr bevorzugt, für alle X des DNA-Moleküls. Ein DNA-Molekül, das pentamere Einheiten umfasst, in welchen X immer A ist, weist daher ideale Eigenschaften auf.

Bei einem weiteren vorteilhaften DNA-Molekül ist Y C. Demgemäß ist für die inverse Sequenz Y' vorzugsweise G. Wie oben für X erwähnt, gilt dies für mindestens ein Y des gesamten DNA-Moleküls, vorzugsweise für mehrere Y des DNA-Moleküls, noch mehr bevorzugt, für alle Y des DNA-Moleküls. Daher weist ein DNA-Molekül, in welchem alle Y C sind, eine optimale Induzierbarkeit auf.

Vorteilhaft sind daher mindestens 1, vorzugsweise alle, Konsensus-Sequenzen AGAAC GTTCT AGAAC. Wie bereits oben erwähnt, ist es, falls das DNA-Molekül 6 oder weniger Konsensus-

Sequenzen umfasst, bevorzugt, dass alle Konsensus-Sequenzen der obigen Definition entsprechen. Falls das DNA-Molekül mehr als 6 Konsensus-Sequenzen aufweist, ist es möglich, dass 1 oder mehrere pentamere Einheiten die oben erwähnten Variationen von X oder Y oder dem jeweiligen X' oder Y' aufweisen, jedoch mit ähnlich hohen Leistungen.

5

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein regulierendes Molekül, welches ein DNA-Molekül gemäß der vorliegenden Erfindung, wie oben definiert, und einen Promotor stromaufwärts und/oder stromabwärts vom DNA-Molekül umfasst. Da das DNA-Molekül bidirektional ist, kann der Promotor an jeder Seite des DNA-Moleküls platziert werden. Nach Induzieren des DNA-Moleküls durch Bindung mit einem entsprechenden Faktor, wird (werden) der Promotor (die Promotoren) aktiviert. Ein solches regulierendes Molekül ist zur Verwendung in spezifischen induzierbaren Protein-Expressionssystemen ideal.

Noch mehr bevorzugt ist der Promotor ein Minimal-Promotor, vorzugsweise CMV-Minimalpromotor. Die Kombination des erfindungsgemäßen DNA-Moleküls zusammen mit einem Minimal-Promotor erwies sich als optimal, insbesondere infolge der geringen Hintergrund-Aktivität und wobei gleichzeitig ein stark induzierbarer Promotor vorgesehen ist.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Anmeldung betrifft ein Gen, welches in seiner regulierenden Region das obige erfindungsgemäße regulierende Molekül umfasst. Nach Induzieren des Promotors wird das Protein oder Polypeptid, für welches das Gen codiert, exprimiert. Dabei kann das Gen eine Sequenz sein, die für jedes beliebige Protein oder Polypeptid codiert. Das Gen kann z.B. für ein Protein codieren, das beispielsweise therapeutisch oder analytisch von Interesse ist. Es ist jedoch auch möglich, dass das Gen für ein Protein codiert, welches selbst ein regulierendes Element ist. Ein solches regulierendes Protein kann z.B. das Gal4-VP16 sein, welches im Amplifikationssystem, wie von Köster und Fraser beschrieben (Dev. Biol. 233, 329-346 (2001)), verwendet wird, wobei das Gal4-VP16 - wenn es einmal exprimiert ist, einen Promotor aktiviert, welcher jedes Protein oder Polypeptid, an dem ein Interesse besteht, auf amplifizierte Weise exprimiert. Diese Definition von Proteinen, die vom vorliegenden System exprimiert werden, gilt für die gesamte Anmeldung.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, der in seiner regulierenden Region das oben erwähnte erfindungsgemäße regulierende Molekül umfasst. Der Vektor ist eine Polynukleinsäure, die verschiedene DNA-Fragmente umfasst, und die vermehrbar ist. Abgesehen vom erfindungsgemäßen regulierenden Molekül, umfasst der Vektor vorzugsweise eine multiple Klonierungsstelle, in welche jede beliebige DNA-Sequenz - insbesondere DNA-Sequenzen, die für Proteine oder Polypeptide codieren - inseriert werden kann. Weiters umfassen die Vektoren definierte Restriktionsstellen und vorzugsweise spezifische Selektions-Sequenzen, z.B. Sequenzen, die eine Resistenz gegen ein Antibiotikum vorsehen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Anmeldung betrifft ein Konstrukt, welches ein erfindungsgemäßes regulierendes Molekül, wie oben definiert, mit zwei Promotoren umfasst, wobei ein Promotor stromaufwärts und ein zweiter Promotor stromabwärts des DNA-Moleküls platziert ist, ein Gen unter die Kontrolle eines Promotors und ein zweites Gen unter die Kontrolle des zweiten Promotors gestellt ist, wobei das Konstrukt vorzugsweise weitere Globin-UTRs und Polyadenylierungssignale umfasst. Dieses erfindungsgemäße Konstrukt induziert das DNA-Molekül - nach Bindung eines entsprechenden Faktors, insbesondere des Hitzeschockfaktors - welches dann beide Promotoren aktivieren wird, wonach beide Gene exprimiert werden. Vorzugsweise sind beide Promotoren identisch, um eine identische Aktivierung der Protein-Expression vorzusehen. Vorzugsweise sind die beiden Gene, die auf dem Konstrukt vorgesehen sind, verschieden. Für Expressions-Untersuchungen ist es z.B. ideal, einerseits ein Gen vorzusehen, das für Luciferase codiert, welches für eine empfindliche Quantifizierung verwendet wird, und andererseits ein Gen vorzusehen, welches für Gfp codiert, welches als Expressions-Marker verwendet wird. Diese beiden Gene haben daher komplementäre Merkmale, so dass das erfindungsgemäße Konstrukt zum Vorsehen eines optimalen Systems für Expressions-Untersuchungen

entworfen werden kann.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Zelle, vorzugsweise eine Human-, Tier-, Pflanzen-, Insekten- oder Hefezelle, welche ein erfindungsgemäßes Gen, einen erfindungsgemäßen Vektor oder ein erfindungsgemäßes Konstrukt, wie oben definiert, umfasst. Dabei bezieht sich der Ausdruck „Tier“ auch auf kaltblütige Tiere, insbesondere Fische und Frösche. Natürlich kann die Zelle auch die Zelle eines Mikroorganismus sein, wie z.B. eine Hefezelle. Infolge der geringen Hintergrund-Aktivität ist es möglich, transiente Expressionsversuche durchzuführen, weil die Induzierbarkeit verbessert und die Hintergrund-Aktivität verringert ist, was bei herkömmlichen Expressionssystemen nicht möglich ist, wobei z.B. der bekannte Hitzeschock-Promotor HSP70 verwendet wird.

Vorzugsweise ist der Gen-Vektor oder das Konstrukt stabil in die Zelle integriert. Dies kann beispielsweise mit der Meganuklease-Methode durchgeführt werden, da dies zu einer verbesserten Integrationseffizienz der DNA in das Genom führt. Daher wird die integrierte DNA unter den somatischen Zellen stabil übertragen, und die Anzahl transgener Nachkommen ist wesentlich höher.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Anmeldung betrifft eine transgene Pflanze, ein transgenes Tier oder Insekt, welches das stabil transfektierte erfindungsgemäße Gen, den erfindungsgemäßen Vektor oder das erfindungsgemäße Konstrukt, wie oben definiert, umfasst. Unter „Pflanze, Tier und Insekt“ versteht man, dass diese Organismen sich in jedem beliebigen Entwicklungsstadium befinden können, daher sind beispielsweise auch Larven, Samen oder Embryonen mit umfasst. Weiters sind von diesem Aspekt auch Teilstücke dieser Organismen, wie z.B. Blätter, Wurzeln, Kalli, Augen usw., mit umfasst.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines DNA-Moleküls gemäß der vorliegenden Erfindung, wie oben definiert, in einem Expressionssystem, vorzugsweise einem induzierbaren Fehlexpressionssystem, wobei ein erfindungsgemäßes Gen, ein Vektor oder Konstrukt, wie oben definiert, in eine Zelle inseriert wird, wonach diese Zelle einem Stress ausgesetzt wird, so dass der Promotor aktiviert wird, um die Gen-Expression zu induzieren. Daher ist es möglich, ein System vorzusehen, in welchem die Gen-Expression in jedem gewählten Moment induzierbar ist, da das DNA-Molekül bei Stress-Einwirkung aktiviert wird, wonach der Promotor aktiviert wird und die Gen-Expression induziert. Es zeigte sich, dass das erfindungsgemäße DNA-Molekül insbesondere kombiniert mit einem Minimal-Promotor keine oder eine geringe Hintergrund-Aktivität, eine hohe Induzierbarkeit und das Fehlen einer Gewebe-spezifische Expression aufweist, was notwendige Merkmale für ein Fehlexpressionssystem mit überlegenen Eigenschaften sind. Verständlicherweise kann nicht nur eine einzelne Zelle verwendet werden, sondern auch eine Mehrzahl von Zellen, die eine Zellkultur, ein Organismus, z.B. eine Pflanze, ein Tier oder Insekt oder ein Teilstück davon sein kann. Der Ausdruck „Insertieren“ bezieht sich auf jede Art von Verfahren zum Integrieren des Gens, Vektors oder Konstrukts in die Zelle oder in den Organismus. Dies kann eine herkömmliche Transfektion mit Partikelbeschleunigung („particle gun“) oder auch eine Injektion sein, z.B. eine Mikroinjektion, oder andere Techniken. Weiters bezieht sich diese Verwendung auch auf die Gentherapie, wobei das Gen für ein therapeutisch aktives Protein codiert und in den zu behandelnden Organismus inseriert wird. Durch Einwirkung von Stress, vorzugsweise nachdem sich das Gen im ganzen Organismus verbreitet hat, wobei der Stress lokal angewendet werden kann, z.B. an einem spezifischen Gewebe oder Organ, wird das Protein, an dem ein Interesse besteht, in dem spezifischen Bereich des Organismus, z.B. einem Tumorgewebe, exprimiert. Daher ist die erfindungsgemäße Verwendung besonders für die Tumor-Therapie von Interesse. Im Falle eines Organismus oder eines Gewebes kann der aufgebrachte Stress auch eine Hochfrequenz-Bestrahlung sein, die ein Erwärmen des Gewebes bewirkt und besonders sanft ist.

Vorzugsweise ist der Stress Hitze, Strahlung, Trockenheit, erhöhte Konzentrationen von Salz, organischen Verbindungen bzw. Schwermetall. Natürlich ist es möglich, zwei oder mehrere

Stress-Arten zu kombinieren, wie z.B. die Zelle Hitze und Trockenheit oder Hitze und einer erhöhten Salzkonzentration usw. auszusetzen. Ob ein Stress aufgebracht wird oder nicht hängt von der Zelle ab, die man verwendet. Beispielsweise werden Humanzellen einem Stress bei einer Temperatur ausgesetzt, die höher ist als jene für die Zellen von Kaltblütern, welche eine Steigerung der Promotor-Aktivität schon bei einer Temperatur von 35°C zeigen. Dasselbe gilt für Trockenheit, erhöhte Salz- und Schwermetall-Konzentration, da die optimalen Wachstumsbedingungen verschiedener Zellen beträchtlich variieren.

Noch mehr bevorzugt ist die Insertion eine stabile Transfektion. Der Fachmann kann das optimale Transfektions-Protokoll entwerfen, um eine stabile Transfektion zu erreichen, was bedeutet, dass die spezifische Sequenz stabil in das Genom der Zellen integriert wird, was zu einer kontinuierlichen Expression in der Nachkommenschaft führt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung eines Expressionssystems, vorzugsweise eines induzierbaren Fehlexpressionssystems, wobei ein erfindungsgemäßes Gen, ein Vektor oder ein Konstrukt, wie oben definiert, in eine Zelle inseriert wird, wonach die Zelle vorzugsweise gezüchtet wird. Wiederum bezieht sich der Ausdruck „insertieren“ auf jede Art von Verfahren zum Integrieren des Gens, Vektors oder Konstrukts in die Zelle. Dies können herkömmliche Transfektions- oder Transformationsmethoden sein, je nachdem, ob die Zelle eukaryontisch oder prokaryontisch ist, die Insertion kann aber auch eine Injektion, z.B. eine Mikroinjektion, oder andere Techniken sein. Vorzugsweise wird die Zelle nach der Insertion gezüchtet, was zu einer stabil transfektierten Zelllinie führt, oder, falls die Zelle ein Embryo war, zu weiter entwickelten Stadien des jeweiligen Organismus, z.B. Larven und Fische oder ähnliches. Wenn die Zelle stabil transfektiert wurde, weist auch die Nachkommenschaft den erfindungsgemäßen Gen-Vektor oder das Konstrukt auf.

Vorzugsweise ist die Zelle eine Pflanzen-, Tier-, Insekten- oder Humanzelle, wobei dieselben Definitionen und vorteilhaften Ausführungsformen wie oben gelten.

Noch mehr bevorzugt ist die Zelle ein Fisch- oder Frosch-Embryo, und die Züchtungsergebnisse sind Larven bzw. Fische oder Frösche. Diese Systeme erwiesen sich als besonders vorteilhaft für Hitzeschock-Expressionssysteme, da bei Säugern eine genaue Steuerung der Körpertemperatur die Anwendung dieses Systems *in vivo* schwierig macht. Systeme, wie Fische oder Insekten, sind jedoch für die Induktion einer Hitzeschock-Antwort bei höheren Temperaturen ideal.

Vorteilhaft ist die Insertion eine stabile Insertion, die zu einer stabilen, transgenen Zelllinie führt. Hier gelten dieselben Definitionen und weiteren Ausführungsformen wie oben.

Noch mehr bevorzugt wird die Zelle, vorzugsweise die gezüchtete Zelle, einem Stress ausgesetzt, wobei der Stress vorzugsweise Hitze, Trockenheit, eine erhöhte Salz- bzw. Schwermetallkonzentration ist. Auch hier gelten dieselben bevorzugten Ausführungsformen und Definitionen wie oben.

Vorteilhaft wird ein Meganuklease-Enzym zusammen mit dem Gen, Vektor oder Konstrukt in die Zellen co-insertiert. Dies führt zu einer erhöhten Integrationseffizienz der DNA in das Genom, so dass die integrierte DNA unter den somatischen Zellen stabil übertragen wird, wodurch die Menge der fehlexprimierenden Zellen stark zunimmt. Weiters wird die Anzahl der transgenen Nachkommenschaft drastisch erhöht.

Ein Gen, Vektor oder Konstrukt gemäß der vorliegenden Erfindung kann in einem Verfahren zur Gentherapie eines Organismus dem Organismus verabreicht werden, wonach Stress, vorzugsweise lokal, am Organismus aufgebracht wird, so dass mindestens ein Protein in dem Organismus exprimiert wird. Dabei kann die Verabreichung des Gens, Vektors oder Konstrukts gemäß jeder für die Gentherapie bekannten Methode durchgeführt werden, wobei es bevorzugt ist,

dass das Gen, der Vektor oder das Konstrukt im ganzen Organismus, welcher vorzugsweise ein Mensch ist, verbreitet wird. Stress wird vorzugsweise lokal aufgebracht, so dass das mindestens eine Protein, an dem ein Interesse besteht, dort exprimiert wird, wo es therapeutisch notwendig ist. Diese Gentherapie ist von besonderem Interesse für die Behandlung eines Tumors, da das Protein, an dem ein Interesse besteht, spezifisch am und/oder rund um den Tumor exprimiert werden kann. Natürlich ist es möglich, mehr als ein Protein zu exprimieren. Weiters kann jede Art von Stress lokal aufgebracht werden, insbesondere Hitze-Stress sowie Bestrahlung, um den Bereich, an dem ein Interesse besteht, zu erwärmen.

Ein weiterer bevorzugter Aspekt der vorliegenden Anmeldung betrifft ein Verfahren zum Überwachen von Stress-induzierbaren Substanzen, wobei ein Gen, ein Vektor oder ein Konstrukt gemäß der vorliegenden Erfindung wie oben erwähnt in eine Zelle oder in Zellen inseriert wird, wonach die Expression des Proteins nachgewiesen wird. Hier können, wie bereits oben definiert, eine Mehrzahl von Zellen eine Zellkultur oder ein ganzer Organismus sein, beispielsweise eine Pflanze, ein Tier, ein Insekt oder ein Mensch. Eine Möglichkeit ist, nachzuweisen, ob die Zelle oder Zellen Stress-induzierbaren Substanzen ausgesetzt ist (sind) oder nicht, in welchem Fall die Expression des Proteins nachgewiesen wird. Eine andere Möglichkeit ist, die Zelle(n) mindestens einer Stress-induzierbaren Substanz auszusetzen, wonach die Expression des Proteins überprüft wird. Falls die Expression des Proteins nachgewiesen wird, ist dies ein Hinweis darauf, dass die Substanz Stress-induzierbar ist. Weiters kann dieses Verfahren verwendet werden, um die Stelle (in der Zelle oder im Organismus) nachzuweisen, an welcher die Substanz Stress induziert. Dabei wird (werden) die Zelle(n) mindestens einer Stress-induzierbaren Substanz ausgesetzt, und nach einer gewissen Zeit beispielsweise der Zellzüchtung oder der Züchtung des Organismus wird die Stelle der Expression des Proteins nachgewiesen. Diese Stress-induzierbaren Substanzen sind beispielsweise Salze, organische Verbindungen, (Schwer-)Metalle usw.

Die vorliegende Erfindung ist anhand der folgenden Beispiele und Figuren genauer beschrieben, auf welche sie jedoch nicht eingeschränkt ist, wobei

Fig. 1 die Aktivierung des Hitzeschockelement(HSE)-Promotors in Japankärpfling („medaka“)-Embryonen und in Zellkultur zeigt;

Fig. 2 zeigt eine stabile Integration eines HSE-Konstrukts in ein Japankärpfling-Genom;

Fig. 3 zeigt die Quantifizierung der Hitzeschock-Induktion des HSE-Promotors *in vivo*;

Fig. 4 zeigt den quantitativen Vergleich des HSE-Promotors mit dem Zebrafisch-HSP70-Promotor;

Fig. 5 zeigt eine transiente Fehlexpression mit Hitzestress-induzierbaren Konstrukten;

Fig. 6 zeigt einen Vergleich zwischen dem HSE-Promotor und dem HSP70-Promotor bei einem typischen transienten Versuch; und

Fig. 7 zeigt Phenotypen von Japankärpfling-Embryonen, die Fgf8 fehlexprimieren.

### *Beispiele*

#### *Beispiel 1: Herstellung transgener Zelllinien*

Japankärpfling-Embryonen und erwachsene Exemplare vom durch Inzucht erzeugten Stamm Cab wurden für alle Versuche verwendet. Erwachsene Fische wurden bei 26°C unter einem Reproduktionssystem (14 h Licht/10 h Dunkelheit) gehalten. Die Embryonen wurden täglich sofort nach dem Laichen eingesammelt. Die embryonalen Stadien wurden gemäß Iwamatsu bestimmt.

Multimerisierte Hitzeschock-Elemente (HSE) mit der idealisierten Sequenz AGAACGTTCTA-GAAC, die abwechselnd durch 3 und 6 bp getrennt waren, wurden durch Oligonukleotid-Ligation erzeugt. Ein 8 HSEs enthaltendes Fragment wurde stromaufwärts eines CMV-Minimal-Promotors inseriert, der das Leuchtkäfer-Luciferase-Gen treibt, flankiert von 5'- und 3'-Globin-

UTRs und dem SV40-Polyadenylierungs(pA)-Signal. In der entgegengesetzten Orientierung wurde eine ähnliche Kasette, die gfp anstelle des Luciferase-Gens, aber den gleichen Minimal-Promotor, UTRs und das pA-Signal enthielt, insertiert, was das gfp:HSE:luc-Konstrukt ergab. Das gfp:HSE:Fgf8-Konstrukt wurde erhalten, indem das Luciferase-Gen mit der Zebrafisch-Fgf8-cDNA ersetzt wurde. Diese cDNA mit denselben Flankierungssequenzen und dem pA-Signal wurde verwendet, um das CMV:Fgf8-Konstrukt zu erzeugen, wobei die vollständige CMV-Promotor/Enhancer-Region des pCS2-Vektors verwendet wurde.

Befruchtete Japankärpfling-Eier wurden durch das Chorion in das Zytoplasma im Einzellen-Stadium mikroinjiziert. Nach der Injektion wurden die Embryonen bei 28°C inkubiert. Die mRNA wurde *in vitro* transkribiert, wobei das T7-Message-Maschinen-Set (Ambion) verwendet wurde, und in 1x Yamamoto-Puffer injiziert. Die DNA wurde mit einem Jetstar midiprep-Set (Genomed) hergestellt und ebenfalls in 1x Yamamoto-Puffer injiziert. Für das Meganuklease-System wurde die DNA mit *I-SceI*-Meganuklease-Enzym (0,5 Einheiten/ $\mu$ l) in 1x *I-SceI*-Puffer (New England BioLabs) co-injiziert. Für alle Versuche wurde ein Druck-Injektor (FemtoJet, Eppendorf) mit Borsilikat-Glas-Kapillaren (GC100-10; Clark Electromedical Instr.), die auf einem Sutter-Instruments P-97 gezogen worden waren, verwendet. Die Kapillaren wurden mit der Injektionslösung wieder aufgefüllt.

Zur Herstellung transgener Linien wurde das gfp:HSE:luc-Konstrukt zu 10 ng/ $\mu$ l zusammen mit *I-SceI*-Meganuklease (0,5 Einheiten/ $\mu$ l) in Embryonen im Einzellen-Stadium injiziert. Zum Screenen wurden 60 Larven, die 14 Tage alt waren, bei 39°C 1 h lang mit Hitze behandelt und nach 1 Tag unter dem Fluoreszenz-Mikroskop beobachtet. 17 Larven waren gfp-positiv, und die acht mit der stärksten Expression wurden ausgewählt. Nach 8 Wochen wurden die reifen Fische mit Wildtyp-Fisch gekreuzt, und ihre F1-Nachkommenschaft wurde auf transgene Expression nach Hitzeschock untersucht. Vier der acht ausgewählten Fische erzeugten eine Nachkommenschaft, die nach Hitze-Induktion gfp-Fluoreszenz aufwies. Die durchschnittliche Keimbahn-Übertragungsrate war von Gründer zu Gründer verschieden (10-27%). Der Gründer mit der höchsten Keimbahn-Übertragungsrate (27%) wurde für die Analyse des F1-Nachkommens ausgewählt.

Humane Hela- und Maus-Cop8-Zellen wurden unter Standard-Zellkultur-Bedingungen mit DMEM-Medium, das mit 10% FCS ergänzt worden war, gehalten.  $1 \times 10^5$  Zellen wurden in einer Platte mit 24 Vertiefungen mit 400 ng DNA (nötigenfalls mit pBS-Plasmid aufgefüllt) und 0,5  $\mu$ l Transfast (Promega) in 200  $\mu$ l Medium ohne FCS transfektiert. Als interne Referenz wurden 5 ng eines Renilla-Luciferase-Expressionsvektors (SV40:Rluc) co-transfektiert. Nach 6 Stunden wurde das Medium durch frisches DMEM + FCS ersetzt. Eine Hitzebehandlung wurde nach 24 Stunden durch Transferieren der Platten in einen anderen Inkubator (ohne CO<sub>2</sub>) angewendet. Die Zellen wurden 24 Stunden nach dem Hitzeschock lysiert, und die Luciferase-Aktivität wurde mit dem Dual Luciferase Kit (Promega) gemessen. Zwecks Normalisierung wurden die Leuchtkäfer-Luciferase-Aktivitätswerte danach durch Renilla-Luciferase-Werte geteilt.

#### *Beispiel 2: Hitzeschock-Behandlung und Luciferase-Aktivitätsmessung von Japankärpfling-Embryonen*

Für die Hitzebehandlung wurden 10-20 Embryonen oder 5 Larven in 0,5 ml Embryonen-Zuchtmedium (Embryo Rearing Medium, ERM) in einem 1,5 ml Röhrchen bei der erhöhten Temperatur in einem Heizblock inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Embryonen in Petri-Schalen transferiert und auf 28°C gehalten. Für die Luciferase-Aktivitätsmessungen (üblicherweise 24 Stunden nach dem Hitzeschock) wurden die Embryonen einzeln in 1,5 ml-Röhrchen transferiert, mit einem Stößel in 100  $\mu$ l Lyse-Puffer homogenisiert, 15 min lang auf einem Schüttler bei RT inkubiert und danach 5 min lang bei 14000 U/min (RT) zentrifugiert. Die Luciferase-Aktivität wurde aus dem Überstand mit dem Dual Luciferase Kit (Promega) bestimmt.

Ein zweistündiger Hitzeschock bei 37°C führte zu einigen gfp-positiven Zellen nach 24 Stunden, daher wurden höhere Temperaturen getestet. Tatsächlich konnte bei den Embryonen nach einer zweistündigen Behandlung bei 39°C eine wesentliche gfp-Expression beobachtet werden (Fig. 1B), wogegen eine Kontrollgruppe keine ektopische Gen-Aktivierung aufwies (Fig. 1A; C = Kontrolle, I = Induktion; m = Maus). Luciferase-Aktivitäts-Messungen für diese Embryonen zeigten weiters eine bidirektionale Promotor-Aktivität des Konstrukts. Auf ähnliche Weise bestätigte ein Versuch bei Maus-Cop8-Zellen eine Hitze-Stress-Induzierbarkeit des vorliegenden Konstrukts in einem anderen System (Fig. 1C und 1D): Das gfp:HSE:luc-DNA-Konstrukt wurde mit Meganuklease in Embryonen des Japankärpflings (A, B) im Einzellen-Stadium co-injiziert oder in Maus-Cop8-Zellen transfektiert (C, C', D, D'). Die injizierten Embryonen wurden in eine Kontrollgruppe und eine Testgruppe geteilt. Die Embryonen der unbehandelten Kontrollgruppe (A) waren gfp-negativ. Die Embryonen der Testgruppe wurden 2 Stunden lang bei 39°C behandelt, was zu einer starken gfp-Expression (B) führte. Typische Embryonen (Stadium 24) sind für beide Gruppen gezeigt. Nach der Transfektion in Maus-Cop8-Zellen blieben die Kontrollplatten gfp-negativ (C). Eine zweistündige Behandlung bei 44°C induzierte eine starke gfp-Antwort in den transfektierten Zellen (D). C' und D' sind die entsprechenden Hellfeld-Ansichten für C bzw. D. A, B, C und D sind Fluoreszenz-Bilder, Hintergrund-Licht wurde für Bild A zugesetzt, um den ansonsten gfp-negativen Embryo sichtbar zu machen. Eine schematische Darstellung des HSE-Promotors ist in (E) gezeigt. Der künstliche Promotor enthält acht multimerisierte Hitzeschock-Elemente, flankiert von zwei Minimal-Promotoren in entgegengesetzter Orientierung. Gfp an der einen Seite und das Gen, an dem ein Interesse besteht (Luciferase oder Fgf8) an der anderen Seite werden vom bicistronischen Promotor exprimiert. Der Vektor ist von *I-SceI*-Meganuklease-Stellen (Pfeile) flankiert. Abkürzungen: od = Öltröpfchen; pA = SV40-Polyadenylierungssignal; HSE = Hitzeschockelement; g.o.i. = Gen, an dem ein Interesse besteht.

### *Beispiel 3: Erzeugung einer HSE-transgenen Japankärpfling-Zelllinie*

Um die Eigenschaften des HSE-Promotors *in vivo* gründlich zu analysieren, wurde das gfp:HSE:luc-Konstrukt in das Japankärpfling-Genom stabil integriert. Alle transgenen Embryonen der 4 unabhängigen transgenen Japankärpfling-Linien waren gänzlich ohne grundlegende gfp-Expression in allen Entwicklungsstadien, entwickelten jedoch nach Hitzeschock-Behandlung eine starke gfp-Fluoreszenz im gesamten Embryo (Fig. 2A-2D). Eine Quantifizierung offenbarte ähnliche Expressionsmengen und Induktionsraten bei allen 4 Linien, wodurch Positionseffekte der transgenen Integration ausgeschlossen wurden. Alle transgenen Embryonen entwickelten sich normal. Eine transgene Linie wurde für weitere Versuche ausgewählt. 2,5 Stunden nach der Behandlung der Embryonen bei 39°C war gfp erstmals unter dem Fluoreszenz-Mikroskop nachweisbar (Fig. 2A). Die Signal-Intensität nahm bis zu 24 h lang zu und dauerte infolge der Stabilität des Proteins mehrere Tage lang an (Fig. 2B-2D). Eine induzierte Expression war in allen embryonalen Geweben, einschließlich der Linse (Fig. 2F) sichtbar, wogegen den Linsen von nicht-induzierten Embryonen jegliche gfp-Aktivität fehlte (Fig. 2E). Eine grundlegende gfp-Expression in der Linse wird typischerweise beim HSP70:gfp-transgenen Zebrafisch im nicht-induzierten Stadium beobachtet und kann durch eine kombinierte Wirkung der hohen Promotor-Aktivität und des niedrigen Protein-Umsatzes in diesem Gewebe erklärt werden. Tatsächlich bestätigte eine Injektion eines Zebrafisch-HSP70:gfp-Konstrukts die bevorzugte Aktivierung des nicht-induzierten Promotors in der Japankärpfling-Linse (Fig. 2G). Daher kann der HSE-Promotor in allen embryonalen Geweben ohne jegliche Hintergrund-Aktivität effizient induziert werden.

### *Beispiel 4: Eigenschaften des HSE-Promotors und Vergleich mit dem Zebrafisch-HSP70-Promotor*

Unter Verwendung der hohen Reproduzierbarkeit der transgenen Linie wurden verschiedene Bedingungen für die Aktivierung des HSE-Promotors quantitativ getestet. Zu diesem Zweck wurde das Luciferase-Gen des bicistronischen Promotor-Konstrukts verwendet. Transgene Embryonen wurden gesammelt und bei 28°C inkubiert. 24 Stunden nach der Befruchtung, als

die Embryonen die Gastrulation beendet hatten (Stadium 19) wurde die Hitzebehandlung begonnen. 24 Stunden später wurden die Embryonen lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Selbst für diesen hochsensiblen Marker waren die Aktivitätsmessungen der nicht-induzierten Kontroll-Embryonen nahe der Nachweisgrenze, was die geringe Hintergrund-Aktivität des HSE-Promotors bestätigt. Bei einer ersten Reihe von Versuchen wurde die Temperatur der Hitzebehandlung variiert. Die Luciferase-Aktivitätsmessungen zeigten im Vergleich zu nicht-behandelten Kontroll-Embryonen, die bei 28°C gehalten wurden, nach einer zweistündigen Behandlung bei 37°C eine 9,3-fache Steigerung der Promotor-Aktivität (Fig. 3A; Fi = -fache Induktion; s = stabil; t = transient). Die stärkste Reaktion (bis zu 680-fache Induktion) wurde bei 39°C erhalten. Eine Verringerung der Zeit zwischen der Hitzeschock-Behandlung und der Lyse der Embryonen von 24 auf 5 Stunden führte zu einer gleichzeitigen 5,5-fachen Verringerung der Luciferase-Aktivität (bei 39°C, Fig. 3A). Die Luciferase-Aktivität wurde 5 Stunden (5 h stabil) oder 24 Stunden nach der Hitze-Behandlung (24 h stabil) gemessen. Zum Vergleich wurde ein transients Injektions-Versuch mit demselben Konstrukt auf identische Weise quantifiziert (24 h transient). Die Induktion wird auf einer Logarithmen-Skala angezeigt. Die Dauer der Hitzebehandlung bei 39°C wurde bei (B) variiert, die Luciferase-Aktivität wurde 24 Stunden nach der Induktion gemessen. Zur Berechnung der Werte (transgene Embryonen) wurden zwischen 2 und 7 unabhängige Messungen durchgeführt (5 für die nicht-induzierte Kontrolle, die als Referenz verwendet wurde), und 17 für den transienten Japankärpfling-Versuch (20 für die nicht-induzierte Kontrolle). Es wurde keine weitere Steigerung der Induktionsraten für 41°C beobachtet, wogegen eine Behandlung mit 42°C zum umfangreichen Tod von Embryonen führte (Daten nicht gezeigt). Dieselben Überlebensraten wurden bei nicht-injizierten Kontroll-Embryonen erhalten, was darauf hindeutet, dass 2 Stunden bei 41°C das Limit für die Hitzebehandlung von Japankärpfling-Embryonen ist. Unter Verwendung der optimalen Temperatur von 39°C wurde dann die Dauer der Hitzeschock-Behandlung variiert. Ein allmähliches Ansteigen der Induktionsrate wurde ab 15 Minuten (13,5-fach) bis zu 2 h Behandlung (680-fach, Fig. 3B) beobachtet. Daher ist der HSE-Promotor bei stabiler Integration in das Japankärpfling-Genom hoch induzierbar, wobei eine optimale Aktivierungstemperatur bei 39°C liegt.

Die Luciferase-Aktivitätsmessungen von Embryonen, welche im Einzellen-Stadium mit gfp:HSE:luc-DNA injiziert wurden, zeigte eine durchschnittliche 250-fache Induktion nach einer zweistündigen Behandlung mit 39°C. Unter Berücksichtigung der Variabilitäten der Injektionsversuche stimmt dieses Ergebnis mit den Daten für die transgene Linie (Fig. 3A) gut überein.

Bei Säuger-Zellen, die optimierte Wachstumsraten bei 37°C aufweisen, wurde die Induktion der Hitzeschock-Antwort für 42°C beschrieben, jedoch wurden erhöhte Aktivitäten für Temperaturen von bis zu 44°C beobachtet. Wenn diese Temperatur 2 h lang an Maus-Cop8-Zellen angewendet wurde, wurde eine 22-fache Aktivierung der Luciferase-Aktivität für Zellen beobachtet, die transient mit dem HSE-Konstrukt transfektiert waren (Fig. 4A). Diese Induktionsrate ist im Vergleich zu den für Japankärpfling-Embryonen erhaltenen Werten schwach. Daher wurde die Temperatur der Hitzeschock-Behandlung erhöht, und tatsächlich wurde bei 43°C eine 134-fache Induktion beobachtet. Bei 44°C war die Antwort noch deutlicher (1020-fache Induktion, Fig. 4A), doch in einigen Versuchen wurde bei dieser Temperatur ein teilweiser Zelltod beobachtet. Dieser toxische Effekt könnte auf den hohen Grad der gfp-Expression in diesen Zellen zurückzuführen sein, da nicht-transfektierte Kontroll-Zellen diese Behandlung überlebten. Andere Arten von Zell-Stress, wie Schwermetalle, führen in ähnlicher Weise zu einer starken Aktivierung des Konstrukts (100 µM Cd<sup>++</sup>). Diese Daten beweisen eine hohe Induzierbarkeit des HSE-Konstrukts auch in Zellkultur-Zellen. Um diese Daten mit einem natürlichen Hitzeschock-Promotor zu vergleichen, wurde ein Konstrukt verwendet, das ein vom Luciferase-Gen angetriebenes 1,5 kb Fragment des Zebrafisch-HSP70-Promotors enthielt, verwendet. Bei Zellkultur-Versuchen zeigte dieses Konstrukt eine hohe Induzierbarkeit nach Hitzebehandlung. Trotzdem lagen bei allen Versuchen die absoluten Zahlen der HSP70-Promotor-Induktion deutlich unter jenen für das HSE-Konstrukt unter vergleichbaren Bedingungen (Fig. 4A; Fi = -fache Induktion; Rla = relative Luciferase-Aktivität). Die idealisierte Sequenz und die Multimerisierung des HSE steigerten somit die Induzierbarkeit im Durchschnitt um das Fünffache im Vergleich

zum natürlichen Promotor. In ähnlicher Weise wurde eine verbesserte Induktionsrate für das Konstrukt bei Injektions-Versuchen in Japankärpfling-Embryonen im Vergleich zum HSP70-Konstrukt beobachtet.

- 5 Neben der Verbesserung der Induzierbarkeit war eine Begründung der vorliegenden Vorgangsweise die Verringerung der Hintergrund-Aktivität des Promotors. Um dies zu testen, wurden Luciferase-Aktivitätswerte der transferierten, nicht-induzierten Kontroll-Zellen mit beiden Konstrukten verglichen. Infolge der komplexen Struktur des HSP70-Promotors und bekannter Gewebe-spezifischer Expressionsmerkmale wurden verschiedene Zelllinien getestet und zusätzlich quantifizierte Japankärpfling-Injektionsversuche durchgeführt. In allen Fällen wies der HSP70-Promotor im Vergleich zum künstlichen HSE-Konstrukt eine drastisch höhere Hintergrund-Aktivität auf (Fig. 4B). Die beobachteten Unterschiede waren 13- und 18-fach für Zellkultur-Zellen (Hela bzw. Cop8), und 12-fach für *in vivo*-Injektionsversuche. Insgesamt zeigt das künstliche HSE-Konstrukt eine verbesserte Induzierbarkeit zusammen mit einer verringerten Hintergrund-Expression.

*Beispiel 5: Ein transientes Fehlexpressionssystem für Japankärpfling-Embryonen auf Basis des HSE-Promotors*

- 20 Der Hitzeschock-Promotor erwies sich als wertvolles Werkzeug für die induzierbare Fehl-expression in Fisch-Embryonen. Trotzdem ist die stabile Integration in das Genom notwendig, um das Problem einer hohen Hintergrund-Aktivität dieses Promotors zu überwinden. Im Vergleich zu einfachen DNA-Injektionsversuchen ist die Erzeugung transgener Linien zeitaufwändig. Eine verringerte Hintergrund-Aktivität und eine hohe Induzierbarkeit machen den HSE-Promotor zu einem idealen Anwärter für eine Anwendung in transienten Versuchen. Ein zusätzliches Werkzeug, das für diese Versuche angewendet wird, war ein kürzlich entwickeltes Verfahren auf Basis des Restriktionsenzym Meganuklease, welches zu einer gleichmäßigeren Expression nach Injektion von DNA führt.

- 30 Das DNA-Konstrukt gfp:HSE:luc wurde in Japankärpfling-Embryonen im Einzellenstadium injiziert. Nach 24 Stunden, als sie die Gastrulation (Stadium 19) durchgemacht hatten, wurden die Embryonen auf Hintergrund-Expression unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bewertet. Bei einem typischen Versuch wiesen 6% der Embryonen eine schwache gfp-Aktivität auf (Fig. 6). Diese Hintergrund-Aktivität wurde auf weniger als 10 Zellen eingeschränkt und hing von den Injektionsbedingungen ab. Ein Hintergrund von bis zu 24% wurde bei Versuchen gesehen, in welchen die Embryonen teilweise durch nicht-optimale Injektionsnadeln verletzt waren, wogegen Werte von bis zu 0% bei den besten Versuchen erhalten wurden. Weiters nahm die Anzahl der gfp-positiven Zellen im Laufe der Zeit ab, was darauf schließen lässt, dass die Mehrzahl dieser Zellen einen Zelltod durchmachte. Die positiven Embryonen wurden von einer weiteren Analyse ausgeschlossen, und die übrigen gfp-negativen Embryonen wurden in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe diente als nicht-induzierte Kontrollgruppe, wogegen die andere Gruppe 2 Stunden lang bei 39°C hitzebehandelt wurde. Keiner der Embryonen der Kontrollgruppe entwickelte irgendwelche gfp-Signale während der weiteren Entwicklung. Dagegen waren 87% der hitzebehandelten Embryonen nach 24 h positiv (Fig. 6), und mehr als ein Drittel dieser Embryonen wies eine starke gfp-Aktivität auf (Fig. 5A-5C; e = Embryo; Inj. = Injektion; n = negativ; p = positiv; w = schwach; mod = moderat; str. = stark, Hs = Hitzeschock; C = Kontrollgruppe). Die gfp-Expression wurde 5 Stunden (A), 24 Stunden (B) und 72 Stunden (C) nach der Induktion aufgezeichnet. Nicht induzierte Embryonen wurden bis zum Schlüpfen gezüchtet und wiesen keine gfp-Expression auf (D). Die Gelbfärbung stammt von autofluoreszierenden Zellen. Diese Larven wurden induziert (39°C/1h) und wiesen nach 24 Stunden eine starke Reaktion auf (E). Zum Vergleich wurde den Embryonen auf dieselbe Weise HSP70:gfp-Konstrukt injiziert und unter denselben Bedingungen induziert (F, F', G). Die gfp-Signale wurden vorzugsweise in Dotterzellen (F') beobachtet, gfp-positive Zellen innerhalb des Embryos sind durch Pfeile markiert. (G) Derselbe Embryo 48 Stunden später. F ist eine Hellfeld-Ansicht von F'. Abkürzungen: od = Öltröpfchen; ey = Auge. Die Gruppen starker, moderater und schwacher gfp-Aktivität

unterschieden sich hauptsächlich durch die Anzahl der positiven Zellen, jedoch nicht durch die Intensität der Expression innerhalb einzelner Zellen. Eine stellenweise Fehlexpression in einzelnen Zellen oder Zellklonen, wie sie in der schwachen gfp-Gruppe beobachtet wird, ist weiters ein wichtiger Aspekt der Technik für bestimmte Versuchsfragen. In allen Fällen war die Fehl-  
5 expression hauptsächlich auf den Embryo beschränkt (Fig. 5A-5C), wogegen starke gfp-Signale in Dotterzellen selten beobachtet wurden. Insgesamt wies bei diesem typischen Injektionsexperiment (88 injizierte Embryonen) eine Gruppe von 36 Embryonen eine induzierte Fehlexpression auf, wovon 14 eine weitreichende Aktivierung zeigten und eine Kontrollgruppe von 35 nicht-induzierten Embryonen keinerlei Fehlexpression aufwies (Fig. 6).

Um diese Ergebnisse direkt zu vergleichen, wurde ein ähnlicher Versuch mit dem Zebrafisch-HSP70-Promotor durchgeführt. Dasselbe DNA-Grundgerüst einschließlich gfp-Gen, flankierende UTRs, Polyadenylierungssignal und Meganuklease-Stellen, wurden für das Konstrukt verwendet. Nach Injektion wiesen 64% der Japankarpfing-Embryonen nach 24 Stunden eine Hintergrund-gfp-Aktivität auf (Fig. 6). In der Mehrzahl der Fälle trat in Dotterzellen eine weitverbreitete Expression auf, was auf eine Präferenz des HSP70-Promotors für dieses Gewebe hinweist. Unter Ausschluss der gfp-positiven Embryonen wurden die übrigen Embryonen wiederum in 2 Gruppen unterteilt. 30% der nicht-induzierten Kontrollgruppe entwickelte ein gfp-Signal innerhalb von 24 Stunden, was die hohe Hintergrund-Aktivität dieses Promotors bestätigt. Bei der hitzebehandelten Gruppe waren 66% der Embryonen nach 24 Stunden positiv. In allen Fällen wurde eine bevorzugte Aktivität für Dotterzellen beobachtet, was den Nachweis positiver Zellen im Embryo schwierig macht (Fig. 5F-5G). In absoluten Zahlen ausgedrückt wies nur 1 von 97 Embryonen, welchen das HSP70-Konstrukt injiziert worden war, eine starke induzierte Fehlexpression auf (Fig. 6). Dies muss man mit 14 Embryonen dieser Gruppe für den HSE-Promotor-Versuch vergleichen. Daher ist infolge der hohen Hintergrund-Aktivität dieses Promotors sowohl die Evaluierung der nicht-induzierten Kontrollgruppe schwierig, als auch die Anzahl der stark exprimierenden Embryonen innerhalb eines Versuchs stark reduziert. Eine transiente Anwendung des natürlichen HSP70-Promotors ist daher nur von beschränktem Nutzen.

Die DNA-Injektion führt typischerweise zu einer Mosaik-Verteilung der Expressions-Konstrukte. Der hohe Prozentsatz von Embryonen mit weit verbreiteter Aktivierung des HSE-Transgens muss sowohl auf die hohe Induzierbarkeit des Promotors als auch auf das Meganuklease-Verfahren zurückgeführt werden. Erhöhte Integrationsraten für die injizierten DNA-Konstrukte in das Genom des frühen Embryos sind für die spätere Wirkung verantwortlich. Während dies zu einer allmählichen Verschiebung hin zu einer weiter verbreiteten Fehlexpression während der frühen Entwicklung führt, wird in späteren Stadien ein dramatischerer Unterschied beobachtet. Bei herkömmlichen Injektionstechniken ist die Fehlexpression innerhalb von ein paar Tagen der Entwicklung fast verloren. Infolge der stabilen Integration in das Genom somatischer Zellen kann das Meganuklease-System zu einer kontinuierlichen Fehlexpression in Larven und in erwachsenen Fischen führen. Es wurde getestet, ob die Kombination des Meganuklease-Systems mit dem HSE-Promotor verwendet werden kann, um in späten Stadien der Entwicklung eine induzierbare Fehlexpression zu erhalten. 60 Embryonen wurden mit dem gfp:HSE:luc-DNA-Konstrukt im Einzellen-Stadium injiziert, und danach wurden sie bis zum Stadium 40 (14 Tage) gezüchtet, wo sie alle gfp-negativ waren (Fig. 5D). Nach einer einstündigen Hitzebehandlung bei 39°C wiesen 28% dieser Larven eine moderate oder starke gfp-Expression auf (Fig. 5E). Daher kann der HSE-Promotor in Kombination mit dem Meganuklease-System verwendet werden, um späte Entwicklungsprozesse durch induzierte Fehlexpression in transienten Experimenten zu untersuchen.

#### *Beispiel 6: Fehlexpression von Fgf8 mit dem transienten HSE-System*

Für eine erste Anwendung des vorliegenden induzierbaren Fehlexpressionssystems wurde das Fgf8-Gen selektiert. Ein gfp:HSE:Fgf8-Konstrukt enthaltend die Zebrafisch-Fgf8-cDNA zusammen mit dem gfp-Marker-Gen, bidirektional aus demselben Promotor exprimiert, wurde in Emb-

ryonen im Einzellen-Stadium in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit Meganuklease injiziert. Bei einer Konzentration von 5 ng/μl waren 45% der hitzebehandelten Embryonen gfp-positiv, wogegen kein Embryo der nicht-induzierten Kontrollgruppe eine gfp-Expression aufwies (Tabelle 1). Die Marker-Gen-Expression war gleich den durch Fgf8-Fehlexpression verursachten Entwicklungsdefekten. Alle überlebenden Embryonen der Kontrollgruppe erschienen normal, wogegen 23% der hitzebehandelten Tiere morphologische Defekte entwickelten (Tabelle 1). Ein Anheben der DNA-Konzentration auf 12 ng/μl und 25 ng/μl hatte wenig Wirkung auf die gfp-Expression, doch hatte die höhere Fgf8-Dosis einen direkten Einfluss auf die Häufigkeit der beeinflussten Embryonen (bis zu 43%). In ähnlicher Weise führten die erhöhten DNA-Mengen zum Auftreten missgebildeter Embryonen in der Kontrollgruppe (bis zu 10%). Daher ist das durch das HSE-System induzierte Ausmaß der Entwicklungseffekte durch die DNA-Dosis beeinflussbar. Für hoch-wirksame Gene, wie Fgf8, ist eine niedrige Konzentration notwendig, um eine Induktion bei Embryonen zu beginnen, wo die Menge der Fehlexpression unter der Nachweisgrenze liegt, wie aus dem Fehlen jeglicher morphologischer Defekte in der Kontrollgruppe geschlossen wurde. Andererseits können höhere Konzentrationen hilfreich sein, um drastischere Phänotypen infolge des hohen Grades an Fehlexpression zu detektieren.

*Tabelle 1*

Dosis-Abhängigkeit der von durch HSE induzierten Fehlexpression von Fgf8 in Japankärpfling-Embryonen

Konzentration <i>gfp:HSE:Fgf8</i>	Hitzeschock 39°C/2h	Gfp- Expression	Entwick- lungsdefekte	Normale Embryonen	Tote Emb- ryonen	Anzahl der Embryonen
5 ng/μl	+	45%	23%	62%	14%	109
	-	0%	0%	92%	7%	67
12 ng/μl	+	56%	56%	35%	36%	60
	-	1%	1%	98%	0%	58
25 ng/μl	+	47%	43%	26%	30%	96
	-	4%	10%	60%	10%	46

Das Spektrum der beobachteten Fehlbildungen für die Fgf8-Fehlexpression stimmt mit den veröffentlichten Rollen für Fgf8 in verschiedenen Geweben gut überein. Bei einer geringen Häufigkeit wurde die Bildung einer sekundären Achse, Abnormalitäten der Brust- und der Schwanzflosse und Probleme mit dem Blutkreislaufsystem und dem Herz beobachtet. Phänotypen, die einen Einfluss auf die Augen und die Ohrbläschen hatten, traten häufiger auf und wurden daher genauer analysiert. Induzierbare Fehlexpressionssysteme bieten den Vorteil, die Genfunktion während unterschiedlicher Zeitfenster zu untersuchen, die sich durch die Reaktivität verschiedener Gewebe auf verschieden starke ektopische Gen-Aktivität voneinander unterscheiden. In der nächsten Versuchsreihe wurde die Zeit der Induktion (Tabelle 2) systematisch variiert. Außerdem wurde die Injektion von Fgf8-mRNA und einem CMV:Fgf8-Konstrukt in diese Versuche mit eingeschlossen. So wurde die ektopische Gen-Aktivierung beginnend ab dem Einzellen-Stadium (mRNA), im mittleren Blastula-Stadium (CMV:Fgf8) und zu verschiedenen Zeitpunkten während und kurz nach der Gastrulation mit dem HSE-Induktionssystem abgedeckt. Die resultierenden Augen-Phänotypen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

*Tabelle 2*

Nach Fgf8-Fehlexpression beobachtete Augen-Phänotypen

1. Embryonal bestimmt gemäß Iwamatsu (1994) sind in Klammern geschrieben

2. Gesamtzahl der Embryonen mit sichtbaren Entwicklungsdefekten in Prozent

3. Gesamtzahl der Embryonen mit Augendefekten

n.d. = nicht detektiert

5	HSE:Fgf8 (12)	2 Somiten (19)	3 (12)	1	0	0	0	25
	HSE:Fgf8 (5)	mittlere Gastrula (15)	13 (19)	1	n.d.	n.d.	1	67
10	HSE:Fgf8 (12)	vor mittlerer Gastrula (14)	17 (48)	9	0	2	5	35
	HSE:Fgf8 (5)	vor mittlerer Gastrula (14)	17 (24)	13	6	4	2	70
	HSE:Fgf8 (25)	frühe Gastrula (13)	23 (50)	7	0	4	2	46
15	CMV:Fgf8 (5)	mittlere Blastula (10)	29 (39)	20	14	1	0	74
	CMV:Fgf8 (25)	mittlere Blastula (10)	4 (4)	2	1	1	0	91
20	Fgf8 mRNA (25)	Einzellen	23 (45)	17	14	0	0	51
	Konstrukt (ng/µl)	Aktivierungsstadium <sup>1</sup>	Entwicklung AI-Defekte <sup>2</sup> (%)	Augen-defekte <sup>3</sup>	Augen-verlust	Pigmen-tierungs-fehler im Auge	Zyklo-pen-auge	injizierte Embry-onen
25	-----							
	Fgf8 mRNA (5)	Einzellen	15 (37)	4	2	0	0	40

Der nach der Injektion von Fgf8-mRNA beobachtete typische Phänotyp war ein vollständiger Verlust der Augen, häufig von einer Dysgenese des Vorhirns begleitet (Tabelle 2, Fgf8-mRNA 25 ng). Dieser drastische Phänotyp wurde mit ähnlicher Häufigkeit nach Injektion von Fgf8-DNA-Expressions-Konstrukten beobachtet (CMV:Fgf8 25 ng), was darauf hindeutet, dass dieses Gewebe zuständig ist, auf Fgf8 bis zum mittleren Blastula-Stadium zu reagieren. Dagegen führt die Aktivierung des Proteins in einem etwas späteren Stadium mit dem HSE-Promotor (frühe Gastrulation, Tabelle 2) nicht mehr zu diesem Phänotyp. Während verschiedene Auswirkungen auf die Augengröße für alle Stadien der Aktivierung beobachtet wurden (Fig. 7F), war der vollständige Verlust beider Augen hauptsächlich mit einer frühen Fehlexpression verbunden. Die Injektion von Fgf8-mRNA und CMV:Fgf8 führt vorwiegend zu einem starken Augen/Vorhirn-Phänotyp (A). In den meisten Fällen ist das Vorhirn drastisch verringert, doch scheinen weiter hinten befindliche Strukturen normal zu sein (die Position der Mittel-Rautenhirn-Grenze ist durch eine Pfeilspitze markiert und ein Augenbläschen durch einen Pfeil). (B und C) zeigen Beispiele für beobachtete Augen-Phänotypen nach Induktion der gfp:HSE:Fgf8-DNA im Stadium 14. (b' und c'): gfp-Expression in dem die schwarzen quadratischen Markierungen umfassenden Gebiet in den entsprechenden Bildern (B und C). Embryonen, welche Zyklo-pen-auge (B) entwickeln, weisen eine Fehlexpression nicht innerhalb des Auges, sondern im benachbarten Gewebe (b') auf. Der Verlust eines Auges (C) korrelierte mit der Fehlexpression an derselben Seite des Embryos (c'), das andere Auge ist durch Pfeilspitzen markiert. (D, E) zeigen den Embryo mit dem Zyklo-pen-Phenotyp in einem späteren embryonalen Stadium (D) und im Larvenstadium (E). Ein im 2-Somiten-Stadium (Stadium 19) induzierter Embryo wies eine verringerte Größe eines Auges auf, was durch eine Pfeilspitze markiert ist (F). Ein Pigmentierungs-Phänotyp in einem Auge (Pfeilspitze) und ein erweitertes Ohrbläschen (Pfeil) wurde bei einer während der mittleren Gastrula induzierten Larve gefunden (G). Ektopische Ohrbläschen wurden wiederholt beobachtet, eine Vergrößerung eines solchen Embryos ist in (H) gezeigt; das ektopische Ohrbläschen ist durch einen Pfeil markiert. Es sei bemerkt, dass gfp, das die Fgf8-fehlexprimierenden Zellen markiert, nicht im Inneren des Bläschens zu sehen ist (H'); autofluoreszierende Japankärpfling-Zellen sind durch eine Pfeilspitze markiert. Abkürzungen:

cyc. = Zyklopedaue; od = Öltröpfchen. Interessanterweise erschienen unterschiedliche Augen-Phänotypen, wenn die Fgf8-Expression etwas später induziert wurde. Es kam zu einer Ansammlung von Pigmentierungsfehlern im Auge (Fig. 7G) und der Bildung von Zyklopeda-Augen (Fig. 7A, 7B, 7D und 7E) bei Induktionszeiten zwischen der frühen und mittleren Gastrulation (Tabelle 2). Beide Phänotypen wurden nicht bei mRNA-Injektionen beobachtet. Dies hängt nicht von der hohen Protein-Dosis ab, die nach mRNA-Injektion erhalten wird, da eine Verringerung der Menge an injizierter mRNA zu denselben Phänotypen führt, jedoch mit verringerter Häufigkeit (Tabelle 2, Fgf8-mRNA 5 ng).

Ein großer Vorteil des HSE-Konstrukts ist, dass fehl-exprimierende Zellen durch ihr gfp-Signal verfolgt werden können. So wurde eine gfp-Aktivität in Zellen direkt angrenzend an die Zyklopeda-Augen beobachtet (Fig. 7A und 7B), doch interessanterweise trat innerhalb dieser Augen kein gfp-Signal auf. Bei anderen Versuchen erschien das Muster von gfp mehr eingeschränkt, wobei folglich drastische Phänotypen auf diese Teile des Embryos beschränkt waren. In Fig. 7C ist ein Beispiel gezeigt, in welchem man die Fehlexpression in der rechten Hälfte des Embryos fand, was zum Verlust des Auges speziell auf dieser Seite führte. Dieser transiente Ansatz stellt daher einen direkten Ansatz zur Verfolgung fehlexprimierender Zellen oder Zellklone und zur Untersuchung von durch Positionseffekte verursachten Entwicklungs-Konsequenzen dar. Auf der Basis von Funktionsverlust-Versuchen konnte die Fgf-Signalisierung mehreren Schritten bei der Ohrbildung von Zebrafisch-Embryonen zugeordnet werden, was während der Somitogenese mit der Induktion der Ohrplakode und später des Ohrbläschens beginnt. Beim Zebrafisch ist Fgf8 nicht in der Plakode vor dem Somiten-Stadium 18 exprimiert, doch lieferten Versuche auf Basis von mRNA-Injektion und Fgf8-Kügelchen-Implantation den Beweis, dass Fgf8 als Plakoden-Inducer fungiert, der vom Rautenhirn-Primordium wirkt. Jedoch war mit diesen Verfahren die Induktion von ektopischen Ohrbläschen durch eine Überexpression von Fgf8 alleine nicht möglich und versagte auch bei Hühnerembryonen. Bei Anwendung des HSE-Systems wurden häufig sowohl erweiterte als auch duplizierte Ohrbläschen nach einer Aktivierung der Fgf8-Expression im mittleren Gastrula-Stadium beobachtet (Fig. 7G und 7H). In Übereinstimmung mit der Idee, dass Fgf8 als Induktionsmittel aus der Ferne wirkt, erschienen gfp-positive Zellen nicht innerhalb, jedoch angrenzend an die Ohrbläschen (Fig. 7H'). Andere Phänotypen, wie die Verringerung der Anzahl von Otolithen, fand man bevorzugt bei mit mRNA-injizierten Embryonen.

Fgf8 spielt zahlreiche Rollen während verschiedener Stadien der embryonalen Entwicklung. Eine induzierte Fehlexpression von Fgf8 mit dem HSE-System ist ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung dieser Funktionen. Hier dient die Fgf8-Fehlexpression hauptsächlich zur Untersuchung der grundlegenden Erfordernisse für ein transient induzierbares System. Viele interessante Fragen betreffend die Fgf8-Gen-Funktion könnten mit diesem Werkzeug untersucht werden.

## 7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Der künstliche HSE-Promotor war hochaktiv, sowohl nach Hitzebehandlung als auch Einwirkung von Schwermetall-Ionen, was darauf hindeutet, dass die volle Antwort auf Zell-Stress tatsächlich durch isolierte HSEs vermittelt werden kann. Daher konnte im Gegensatz zu früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass HSEs genügen, um eine volle Stress-Reaktion zu vermitteln, und dass andere Elemente von Hitzeschock-Promotoren vorwiegend zur grundlegenden Expression, jedoch nicht zur Induzierbarkeit beitragen. Weiters führt die Multimerisierung und Optimierung der HSEs zu einer verbesserten Induzierbarkeit im Vergleich zu natürlichen Promotoren. Die Kombination mit einer TATA-Box führt zu einem induzierbaren Promotor minimaler Größe, der auf bidirektionale Weise verwendbar ist.

### Überlegene Eigenschaften des HSE-Promotors nach Hitzeschock-Behandlung

Drei Parameter sind für die Anwendung eines induzierbaren Promotors von großer Bedeutung: 1) eine geringe Hintergrund-Aktivität, 2) eine hohe Induzierbarkeit, und 3) das Fehlen einer

Gewebe-spezifischen Expression. Im nicht-induzierten Zustand muss die Aktivität des Promotors so gering wie möglich sein, um jegliche unspezifische Auswirkungen zu verhindern. Gewebe-spezifische Präferenzen des Promotors können die Situation weiters komplizieren, indem sie den Hintergrund in bestimmten Geweben verstärken. Bei Induktion sollte der Promotor eine ausreichend hohe Aktivität liefern, die eine ubiquitäre Expression ergibt. Eine geringe Hintergrund-Aktivität und eine hohe Expression sind für einen Promotor ganz gegensätzliche Eigenschaften. Die Quantifizierung dieser beiden extremen Mengen und die Berechnung der Induzierbarkeit ist daher ein gutes Maß für die Anwendbarkeit des Promotors. Der HSE-Promotor wurde in transienten Versuchen und in stabilen transgenen Linien, in Zellkulturzellen sowie in Japankärpfling-Embryonen getestet. Luciferase-Aktivitätsmessungen wurden verwendet, um eine empfindliche Quantifizierung zu ermöglichen, und eine gfp-Expression, um Expressionsmuster während der Entwicklung zu verfolgen. Bei all diesen Tests bewies der HSE-Promotor überlegene Eigenschaften.

Natürliche Hitzeschock-Promotoren, wie der HSP70-Promotor, wurden erfolgreich für eine induzierte Fehlexpression während der embryonalen Entwicklung verwendet. Die Undichtheit im nicht-induzierten Zustand ist der Hauptnachteil dieses Promotors und führt zu einer hohen Hintergrund-Aktivität. Durch Reduzieren der komplexen Struktur der Hitzeschock-Promotoren war es möglich, die Hintergrund-Expression drastisch zu verringern. Ein hoher Grundwert kann auf Promotor-Elemente wie CCAAT- und SP1-Boxen zurückgeführt werden, von welchen man weiß, dass sie eine ubiquitäre Expression vorsehen (CCAAT-Xenopus-Publikationen). Man erwartete daher, dass das Fehlen dieser Elemente zu einer verringerten Hintergrund-Menge in allen Zellen führen sollte. Ein Vergleich der Luciferase-Aktivitäts-Grundwerte für beide Promotoren in verschiedenen Zelllinien und *in vivo* zeigte tatsächlich eine mehr als 10-fache durchschnittliche Verringerung der Hintergrund-Aktivität für das künstliche HSE-Konstrukt.

Der direkte Vergleich zwischen dem HSE- und dem HSP70-Promotor sollte deutliche Daten hinsichtlich der Anwendbarkeit des vorliegenden Konstrukts liefern. Neben einem verringerten Hintergrund wies der künstliche HSE-Promotor in allen Versuchen eine verbesserte Induzierbarkeit auf. Im Durchschnitt wurde eine 5-fache Steigerung für diesen wichtigen Parameter beobachtet. Eine bis zu 1000-fache Aktivierung führt zu hohen Mengen von Fehlexpression selbst unter weniger günstigen Bedingungen, einschließlich DNA-Injektion, die zu größeren Schwankungen bei diesen Versuchen führen.

Endogene Hitzeschock-Promotoren sind entwicklungsmäßig reguliert. Die Gewebe-spezifischen Komponenten dieser Promotoren wurden im Detail nicht charakterisiert, führen jedoch beispielsweise zu einer bevorzugten Expression des HSP70-Promotors im Dotter und in der Linse. Eine hohe transkriptionelle Aktivität im Dotter war bei diesen Versuchen das vorherrschende Problem für eine transiente Anwendung des HSP70-Promotors bei Japankärpfling-Embryonen. Mit dem Entfernen aller nicht-induzierbaren Sequenzen wurden alle Gewebe-spezifischen Komponenten aus dem HSE-Promotor erfolgreich eliminiert, welcher daher im gesamten Embryo gleiche Expressionsmengen aufwies. Die Hintergrund-Expression in der Linse konnte ebenfalls eliminiert werden, ein wichtiger Faktor für Fehlexpressionsversuche im sich entwickelnden Auge. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die erhöhte Hintergrund-Expression in Dotter- und Linsenzellen nicht von einem hohen Grundwert der auf die HSEs wirkenden Zellstress-Antwort abhängt, sondern von anderen Sequenzelementen im HSP70-Promotor abhängig ist.

Wenn man die für den künstlichen HSE-Promotor im Vergleich zur natürlichen Version erhaltenen Verbesserungen zusammenfasst, so war es möglich, die allgemeine Hintergrund-Aktivität zu verringern, die Induzierbarkeit zu steigern und alle Gewebe-spezifischen Komponenten zu eliminieren.

#### *Optimierung der Bedingungen der Hitzebehandlung*

Wie erwartet führen höhere Temperaturen und eine längere Einwirkung des Stressfaktors zu

einer gesteigerten Antwort. Um hohe Expressionsmengen zu erhalten, muss ein übermäßiger Zellstress angewendet werden, was für die Zellen schädlich sein kann und in extremen Fällen zum Zelltod führt. Insbesondere scheinen Säugerzellen Abweichungen von ihren optimalen Wachstumsbedingungen weniger gut zu tolerieren. Die Aktivierung der Hitzestress-Antwort war bei 42°C schwach (20-fach). Bei einer etwas höheren Temperatur (44°C) stieg dieser Wert drastisch an auf eine etwa 1000-fache Aktivierung. Dies scheint die Grenze zu sein, da nach einer längeren Einwirkung dieser Temperatur das Absterben einer zunehmenden Anzahl von Zellen beobachtet wurde. Fisch-Embryonen tolerieren verschiedene Temperaturen leichter. Da sie normalerweise bei 26-28°C gehalten werden, sieht man eine erste Hitzestress-Antwort bei Japankärpfling-Embryonen bei 37°C (10-fach). Wiederum stieg bei einer Erhöhung der Temperatur um nur 2 Grad die Induktion sprunghaft auf den Maximalwert von 680-fach an. Selbst nach einer längeren Inkubation bei 41°C entwickelten sich die Embryonen normal, und bei 42°C starben die Embryonen schließlich. Daher ist die Anwendung der Hitzeschock-Antwort bei Japankärpfling-Embryonen *in vivo* eine direkte Vorgangsweise. Eine Behandlung bei 39°C führt zu optimalen Induktionsraten, womit ein vernünftiger Abstand zu 42°C, wo die Embryonen sterben, beibehalten wird.

Wenn man diese Ergebnisse mit der Literatur vergleicht, so wurden für Zebrafisch-Embryonen ganz ähnliche Daten erhalten. Für heterologe HSP70-Promotoren wurden Induktions-Spitzenwerte bei 39°C erhalten, und bei Verwendung des endogenen Promotors erwies sich eine Temperatur von 40°C als optimal. Der HSP70-Promotor wurde auch in einer Kombination mit dem Gal4-UAS-System versucht. Der Amplifikations-Effekt von Gal4-VP16 verringert die Dauer der Hitzebehandlung drastisch, ermöglicht kurze Aktivierungs-Impulse, eliminiert jedoch nicht das Hintergrund-Problem dieses Promotors, insbesondere während transienter Anwendungen.

#### *Ein transientes Fehlexpressionssystem auf Basis des HSE-Promotors*

Transiente Fehlexpressionsversuche sind ein schneller Weg zur Untersuchung der Gen-Funktion *in vivo*. Eine Injektion von mRNA, die sofort translatiert wird, führt häufig zu drastischen frühen Phänotypen. Die Anwendung von DNA-Konstrukten verschiebt die Initiierung der Expression auf das mittlere Blastula-Stadium, doch um die Gen-Funktion in späteren Entwicklungsstadien zu untersuchen, muss ein Induktionssystem verwendet werden. Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Injektions-Prozedur und Verteilungsphänomene, die die DNA-Kopienzahl beeinflussen, erschweren die transiente Anwendung von Induktionssystemen. Diese Probleme können nur durch Systeme von überlegener Qualität kompensiert werden. Hitzeschock-Promotoren stellen ein attraktives Einzelkomponenten-Induktionssystem dar. Beim Testen des HSP70-Promotors in transienten Versuchen wurde eine hohe Hintergrund-Expression beobachtet. Dagegen zeigt der künstliche HSE-Promotor eine verbesserte Induzierbarkeit und eine stark verringerte Hintergrund-Aktivität und kann daher für transiente Versuche in Fisch-Embryonen effizient verwendet werden.

Bei einem typischen transienten Versuch wurden etwa 100 Embryonen injiziert. Weniger als 10 Embryonen weisen eine schwache Hintergrund-Aktivierung von gfp auf und werden eliminiert. Die übrigen Embryonen werden in eine Kontrollgruppe und eine Testgruppe unterteilt. Im erforderlichen Entwicklungsstadium werden die Embryonen der Testgruppe hitzebehandelt und erreichen innerhalb weniger Stunden nach der Induktion hohe Mengen an Fehlexpression. Man kann etwa 40 fehlexprimierende Embryonen erwarten. Infolge der Anwendung der Meganuklease-Methode zeigt ein hoher Anteil dieser Embryonen eine weit verbreitete Aktivierung des Transgens. Gleichzeitig kann die Kontrollgruppe analysiert werden. Infolge der verbesserten Induzierbarkeit des HSE-Promotors können geringe Mengen an DNA injiziert werden, wodurch das Auftreten jeglicher Phänotypen vor der Induktion vermieden wird. Die Expressionsmenge kann durch die Dauer der Hitzebehandlung reguliert werden.

Ein besonderer Vorteil des HSE-Konstrukts ist die Koexpression des gfp-Marker-Gens aus demselben Promotor. Die bicistronische Expression erfordert eine kurze und symmetrische

Struktur des DNA-Moleküls, wogegen die meisten natürlichen Promotoren eine starke Tendenz zur unidirektionalen Transkription aufweisen. So führte die Addition einer TATA-Box zum 5'-Ende des Aktin-Promotors zu ungleichen Expressionsmengen. Eine starke Aktivierung des HSE-Promotors wurde in beide Orientierungen bemerkt. Die Koexpression von gfp ist ein wichtiges Werkzeug zur Eliminierung von Embryonen mit Hintergrund-Expression und ermöglicht die sofortige Erkennung der Promotor-Aktivierung in der Test- und in der Kontrollgruppe. Weiters kann die exakte Position der fehlexprimierenden Zellen im Embryo bestimmt werden. Diese Versuchsgestaltung liefert daher ein wirksames Werkzeug für die Gen-Funktionsanalyse bei Fisch-Embryonen.

#### *Fehlexpression von Fgf8 mit dem transienten HSE-Fehlexpressionssystem*

Eine frühe Fehlexpression von Fgf8 im Japankärpfling ergab einen drastischen Phänotyp. Die Embryonen entwickelten keine Augen und eine schwere Dysgenese des Vorhirns wurde beobachtet. Überraschenderweise zeigten mRNA-Injektionsversuche beim Zebrafisch einen ganz anderen Phänotyp. Die Embryonen wiesen Abnormitäten entlang der dorsoventralen Achse auf. Selbst in den schwersten Fällen, in welchen posteriore Strukturen des Embryos verloren gingen, blieben anteriore Strukturen, wie die Augen und das Vorhirn, intakt. Da die Zebrafisch-cDNA für die Japankärpfling-Versuche verwendet wurde, kann die Fgf8-Protein-Funktion für diese Unterschiede nicht verantwortlich sein. Japankärpfling-Embryonen scheinen eine divergente Kompetenz für das Vorhirngewebe, auf erhöhte Mengen von Fgf8 zu reagieren, zu haben. Interessanterweise wurden ähnliche Augen/Vorhirn-Phänotypen für En2-Fehlexpressionsexperimente beim Japankärpfling beobachtet. Eine Überexpression von En2 in diesen Embryonen aktiviert im Vorhirn ein genetisches Programm, das mit jenem vergleichbar ist, das in der Mittel-/Rautenhirn-Grenze wirkt. Sowohl En2 als auch Fgf8 sind Teil dieser genetischen Kaskade und könnten daher beide fähig sein, denselben Reaktionsweg zu aktivieren. Ein ähnlicher Phänotyp wurde für die En-Fehlexpression bei *Xenopus* beobachtet, wogegen mRNA-Injektionen von *Eng2* in Zebrafisch-Embryonen zu einem unauffälligeren Phänotyp führten und keine Mittel-/Rautenhirn-grenzspezifischen Gene im Vorhirn aktivierten. Daher unterscheiden sich sowohl Japankärpfling als auch *Xenopus* vom Zebrafisch durch die Kompetenz, das genetische Programm der Mittel-/Rautenhirn-Grenze in einer ektopischen Position zu aktivieren. Normalerweise wird dieser latente Reaktionsweg während der embryonalen Entwicklung nicht aktiviert, doch eine Fehlexpression von *En* und gegebenenfalls auch *Fgf8* kann die genetische Kaskade auslösen, was zu drastischen Konsequenzen führt. Zebrafischen fehlt diese Kompetenz, was auf das Fehlen einer für den Reaktionsweg wesentlichen Komponente zurückzuführen sein könnte. Dies hat keine weiteren Konsequenzen auf die Entwicklung, da dieser Reaktionsweg normalerweise im Vorhirn nicht aktiviert ist. Dies könnte erklären, warum eine Fehlexpression von sowohl *En* oder *Fgf8* keine dramatischen Konsequenzen auf die Entwicklung des Vorhirns beim Zebrafisch hat.

*Fgf8* ist ein Beispiel für ein hochaktives Gen mit multiplen Funktionen während der embryonalen Entwicklung. Eine frühe Überexpression mit mRNA oder DNA-Injektion führt zu schweren Phänotypen, welche eine weitere Analyse späterer Funktionen blockieren. Die Anwendung eines transienten induzierbaren Systems löst dieses Problem. Eine verspätete Aktivierung von *Fgf8* mit dem HSE-System verhinderte somit den schweren frühen Phänotyp (vollständiger Verlust der Augen), der nach mRNA/DNA-Injektionsversuchen beobachtet wurde und ermöglichte die Untersuchung später *Fgf8*-Funktionen, insbesondere im Auge. So wurde die Bildung von Zyklo-penaugen, die bisher für *Fgf8*-Fehlexpressionsversuche noch nicht beschrieben wurde, beobachtet. Interessanterweise wurde beim Japankärpfling ein ähnlicher Phänotyp für die Überexpression eines dominant negativen *Fgf*-Rezeptors, der die *Fgf*-Signalgebung stört, beobachtet. Daher führt sowohl eine Aktivierung als auch eine Blockierung der *Fgf8*-Funktion zum selben Phänotyp. Eine ähnliche Beobachtung machte man unlängst für das *Fgf8*-abhängige Zellüberleben im Vorhirn der Maus. Bei diesen Versuchen führte sowohl die Reduktion der Gendosis als auch eine Überexpression zum selben Phänotyp (apoptotischer Zelltod).

Die Ohrplakode wird durch Signale aus dem benachbarten Rautenhirn während der frühen Somitogenese induziert. Fgf-Signalgebungsmoleküle wurden in diesem Prozess impliziert, und jüngste Untersuchungen lassen darauf schließen, dass Fgf3 und Fgf8 während der Ohr-Induktion redundant wirken. Eine kombinierte Inaktivierung der beiden Gene im Zebrafisch durch Verwendung der *acerebellar* (Fgf8)-Mutante, Morpholino-knock-down oder durch Inhibierung der Fgf-Signalgebung mit SU5402-Behandlung blockiert die Ohrentwicklung gänzlich. Funktionserwerb-Versuche bestärkten weiters die Rolle der Mitglieder der Fgf-Familie bei diesem induktiven Ereignis. Ektopische Ohrbläschen-Bildung wurde bei Überexpressionsversuchen für Fgf2 und Fgf3 bei *Xenopus*, für Fgf3 bei Hühnerembryonen und Fgf10 bei der Maus beobachtet. Überraschenderweise schlugen ähnliche Versuche für Fgf8 durch mRNA-Injektion und Fgf8-Kügelchen-Implantation sowohl bei Fisch- als auch bei Hühner-Embryonen fehl. Unter Anwendung des HSE-Systems war es möglich, zusätzliche Ohrbläschen beim Japankärpfling zu induzieren. Eine Fgf8-Fehlexpression wurde bei diesen Embryonen in der mittleren Gastrulation induziert, was mit früheren Untersuchungen gut übereinstimmt, womit das induktive Ereignis auf dieses Stadium zeitlich festgelegt wird. Zusätzlich zum exakten Timing kann die Expressionsmenge und die Position des Signals für eine erfolgreiche Induktion von wesentlicher Bedeutung sein. Tatsächlich bestätigte das Verfolgen der gfp-Aktivität als Marker für fehlexprimierende Zellen in diesen Versuchen die Wirkung von Fgf8 aus der Ferne. Im Gegensatz zur Duplizierung wurden häufige Fehlbildungen des Ohrbläschens beobachtet, welche am markantesten in mRNA-Versuchen aufschienen. Die mRNA-Injektion führt typischerweise zur gleichmäßigen Fehlexpression, was nahe legt, dass eine breite Überexpression von Fgf8, einschließlich des sich entwickelnden Ohres, zu diesem Phänotyp führen kann. Die Implantation von Kügelchen ist einem induktiven Ereignis aus der Ferne mehr ähnlich, doch ist es schwierig, alle möglichen Positionen und Proteinmengen zu testen. Andererseits bieten transiente DNA-Injektionsversuche ein großes Spektrum von Variationen sowohl hinsichtlich der Expressionshöhe als auch hinsichtlich der Position fehlexprimierender Zellen. Da dabei zusätzlich die Option besteht, das Timing der Aktivierung zu manipulieren, ist das HSE-System für solche Versuche ideal. Durch Anwenden dieser Technik können hunderte Embryonen, die jeweils geringfügig verschiedene Parameter für eine Fehlexpression aufweisen, rasch innerhalb einiger weniger Versuche gescannt werden. Weiters können die Position und Intensität des gfp-Signals *in vivo* verfolgt werden.

Eine Zusammenfassung sowohl der Daten betreffend die Quantifizierung von Luciferase und die gfp-Aktivierung in Verbindung mit den Ergebnissen für eine induzierbare Fehlexpression von Fgf8 während der embryonalen Entwicklung ergibt, dass der HSE-Promotor den Erfordernissen eines transient induzierbaren Systems perfekt entspricht. Mit einem solchen System kann die Genfunktion während späterer Entwicklungsstadien untersucht werden, insbesondere, wenn eine frühe Überexpression zu drastischen Phänotypen führt. Zeitfenster der Kompetenz, auf ein Signal zu reagieren, können rasch untersucht werden. Das Anwenden dieses Promotors in transienten Injektionsversuchen in Verbindung mit dem Meganuklease-System vergrößert weiters das Spektrum von Expressionsmustern von einer stellenweisen Fehlexpression in Einzelzellen, vorzugsweise für induktive Ereignisse aus der Ferne gesehen, bis zu einer weit verbreiteten Überexpression während aller Entwicklungsstadien. Die Expressionsmenge und Position der fehlexprimierenden Zellen kann *in vivo* leicht verfolgt werden.

#### Sequenzprotokoll

<110> Veterinärmedizinische Universität Wien

<120> Multiple HSE

<130> R 43104

<140> AT A 674/2004

<141> 2004-04-20

<160> 2  
 <170> PatentIn Version 3.3  
 5 <210> 1  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> consensus sequence  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (1)..(15)  
 <223> n = A, T, G or C  
 <400> 1  
 ngaannttcn ngaan 15  
 20 <210> 2  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> consensus sequence  
 <400> 2  
 30 agaacgttct agaac 15

### Patentansprüche:

- 35 1. DNA-Molekül, *dadurch gekennzeichnet*, dass es 4-20, vorzugsweise 7-10, noch mehr bevorzugt 8 Konsensus-Sequenzen umfasst, wobei jede Konsensus-Sequenz aus 3 pentameren Einheiten besteht, wobei diese pentameren Einheiten eine Sequenz XGAAY oder eine inverse Sequenz Y'TTCX' aufweisen, worin X ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T, G und C, und Y von mindestens einer, vorzugsweise von zwei, noch mehr
 40 bevorzugt von allen drei dieser 3 pentameren Einheiten von mindestens einer Konsensus-Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T und C, wobei das Y der übrigen pentameren Einheiten der mindestens einen Konsensus-Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus A, T, G und C, wobei im Falle, dass das DNA-Molekül mehr als 6 Konsensus-Sequenzen umfasst, Y aller pentameren Einheiten ausgewählt ist aus der
 45 Gruppe bestehend aus A, T, G und C.
2. DNA-Molekül nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Konsensus-Sequenzen durch 2 bis 10 bp, vorzugsweise abwechselnd 3 und 6 bp, voneinander getrennt sind.
- 50 3. DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, *dadurch gekennzeichnet*, dass die mittlere pentamere Einheit mindestens einer, vorzugsweise jeder, Konsensus-Sequenz eine inverse Sequenz im Vergleich zu den äußeren pentameren Einheiten, vorzugsweise Sequenz Y'TTCX', ist.
- 55 4. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet*, dass X C oder

G, noch mehr bevorzugt A ist.

5. DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, *dadurch gekennzeichnet*, dass Y C ist.
- 5 6. DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, *dadurch gekennzeichnet*, dass mindestens eine, vorzugsweise alle Konsensus-Sequenzen, AGAAC GTTCT AGAAC sind.
7. Regulierendes Molekül, *dadurch gekennzeichnet*, dass es ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und einen Promotor stromaufwärts und/oder stromabwärts vom  
10 DNA-Molekül umfasst.
8. Regulierendes Molekül nach Anspruch 7, *dadurch gekennzeichnet*, dass der Promotor ein Minimal-Promotor, vorzugsweise ein CMV-Minimal-Promotor, ist.
- 15 9. Gen, *dadurch gekennzeichnet*, dass es in seiner regulierenden Region ein regulierendes Molekül nach Anspruch 7 oder 8 umfasst.
10. Vektor, *dadurch gekennzeichnet*, dass er in seiner regulierenden Region ein regulierendes Molekül nach Anspruch 7 oder 8 umfasst.
- 20 11. Konstrukt, *dadurch gekennzeichnet*, dass es ein regulierendes Molekül nach Anspruch 7 oder 8 mit zwei Promotoren umfasst, wobei ein Promotor stromaufwärts und ein zweiter Promotor stromabwärts des DNA-Moleküls platziert ist, ein Gen unter die Kontrolle eines Promotors und ein zweites Gen unter die Kontrolle des zweiten Promotors gestellt ist, wobei das Konstrukt vorzugsweise weitere Globin-UTRs und Polyadenylierungssignale umfasst.  
25
12. Zelle, vorzugsweise eine Human-, Tier-, Pflanzen-, Insekten- oder Hefezelle, *dadurch gekennzeichnet*, dass sie ein Gen nach Anspruch 9, einen Vektor nach Anspruch 10 oder ein Konstrukt nach Anspruch 11 umfasst.  
30
13. Zelle nach Anspruch 12, *dadurch gekennzeichnet*, dass das Gen, der Vektor oder das Konstrukt stabil in die Zelle integriert ist.
- 35 14. Transgene(s) Pflanze, Tier beispielsweise Insekt, *dadurch gekennzeichnet*, dass sie (es) das stabil transfektierte Gen nach Anspruch 9, einen Vektor nach Anspruch 10 oder ein Konstrukt nach Anspruch 11 umfasst.
- 40 15. Verwendung eines DNA-Moleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in einem Expressionssystem, vorzugsweise einem induzierbaren Fehlexpressionssystem, *dadurch gekennzeichnet*, dass ein Gen nach Anspruch 9, ein Vektor nach Anspruch 10 oder ein Konstrukt nach Anspruch 11 in eine Zelle inseriert wird, wonach die Zelle Stress ausgesetzt wird, so dass der Promotor aktiviert wird, um die Gen-Expression zu induzieren.
- 45 16. Verwendung nach Anspruch 15, *dadurch gekennzeichnet*, dass der Stress Hitze, Strahlung, Trockenheit, erhöhte Konzentrationen an Salz, organischen Verbindungen bzw. Schwermetall ist.
- 50 17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Insertion eine stabile Transfektion ist.
- 55 18. Verfahren zur Erzeugung eines Expressionssystems, vorzugsweise eines induzierbaren Fehlexpressionssystems, *dadurch gekennzeichnet*, dass ein Gen nach Anspruch 9, ein Vektor nach Anspruch 10 oder ein Konstrukt nach Anspruch 11 in eine Zelle inseriert wird, wonach die Zelle vorzugsweise gezüchtet wird.

19. Verfahren nach Anspruch 18, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Zelle eine Pflanzen-, Tier-, Insekten- oder Humanzelle ist.
- 5 20. Verfahren nach Anspruch 18, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Zelle ein Fisch- oder Frosch-Embryo ist und die Kultivierung zu Larven und Fischen bzw. Fröschen führt.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Insertion eine stabile Insertion ist, die zu einer stabilen, transgenen Zelllinie führt.
- 10 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Zelle, vorzugsweise die gezüchtete Zelle, Stress ausgesetzt wird, wobei der Stress vorzugsweise Hitze, Trockenheit, erhöhte Salz- bzw. Schwermetall-Konzentration ist.
- 15 23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22, *dadurch gekennzeichnet*, dass ein Meganuklease-Enzym mit dem Gen, Vektor oder Konstrukt in die Zelle co-insertiert wird.
- 20 24. Verfahren zum Überwachen von Stress-induzierbaren Substanzen, *dadurch gekennzeichnet*, dass ein Gen nach Anspruch 9, ein Vektor nach Anspruch 10 oder ein Konstrukt nach Anspruch 11 in eine Zelle oder in Zellen insertiert wird, wonach die Expression des Proteins nachgewiesen wird.

## Hiezu 4 Blatt Zeichnungen

25

30

35

40

45

50

55



Fig. 1

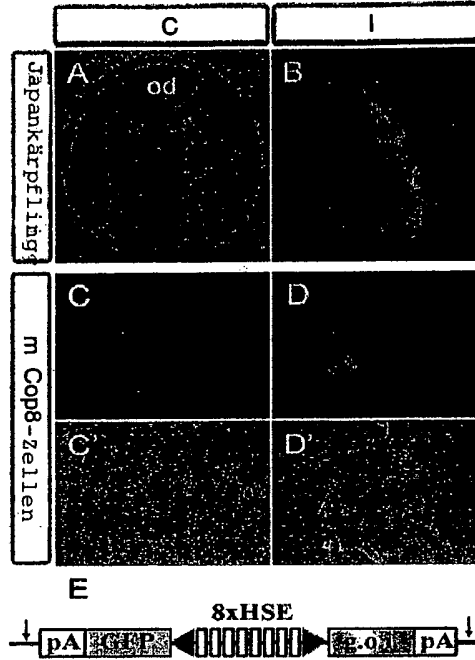


Fig. 2

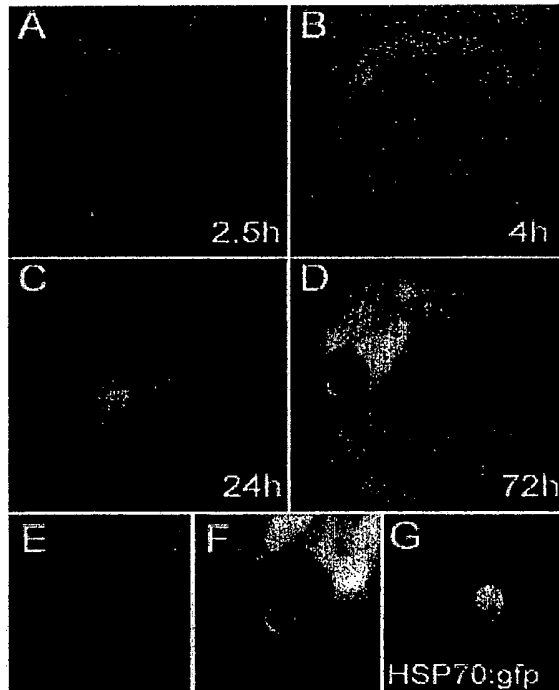




Fig. 3

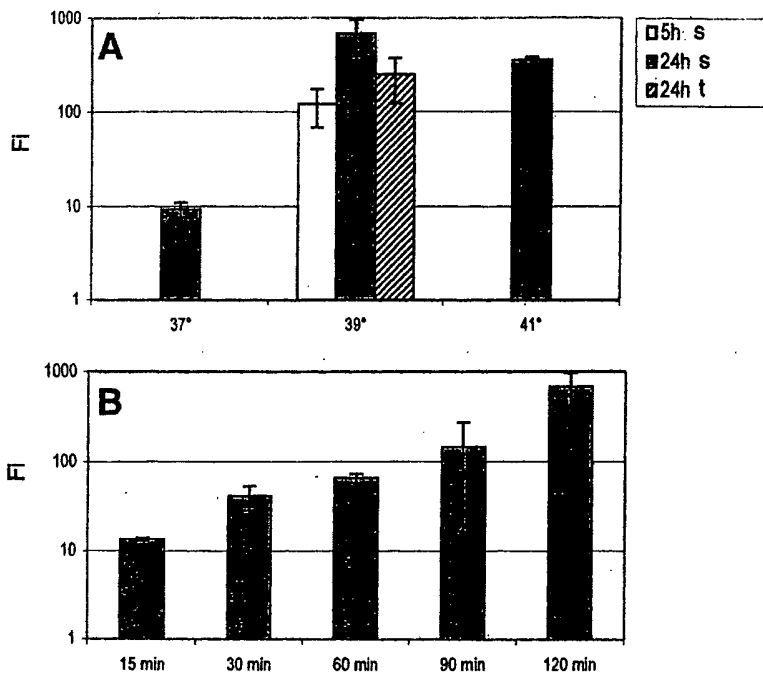


Fig. 4

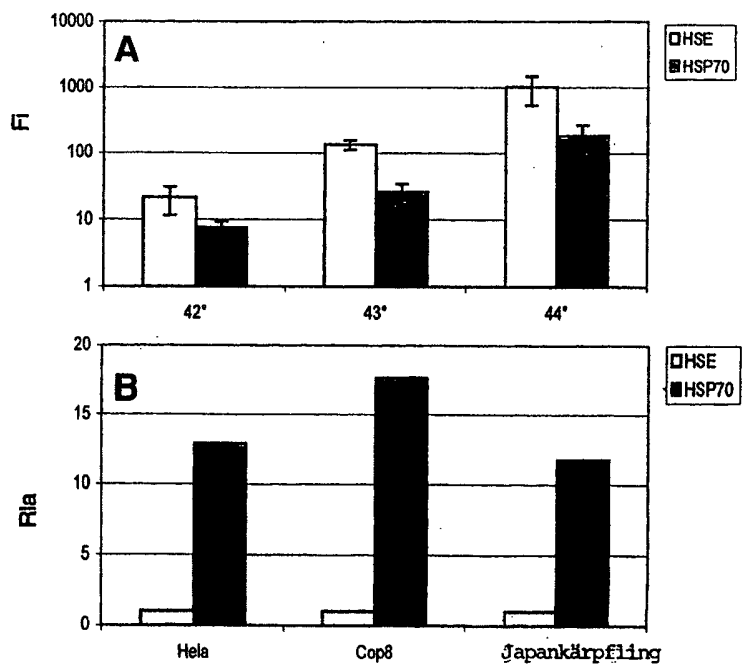




Fig. 5

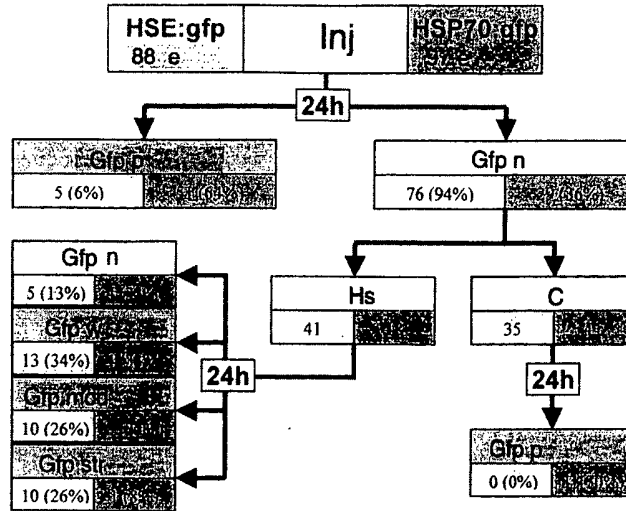


Fig. 6

