

Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Technischen Universität München

**Genetische Modifikation des  $\alpha_{1C}$  L-Typ Kalziumkanals der Maus  
mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems**

**Verena Specht**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Staudenbauer
2. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann

Die Dissertation wurde am 19.04.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 22.05.2000 angenommen.

---

1	ENLEITUNG .....	1
<b>1.1</b>	<b>Spannungsaktivierte Kalziumkanäle .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Die Hilfsuntereinheiten des high-voltage aktivierten Kalziumkanalkomplexes... 4	
<b>1.2</b>	<b>L-Typ Kalziumkanäle.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b>Gene targeting .....</b>	<b>7</b>
2	MATERIAL UND METHODEN .....	10
<b>2.1</b>	<b>Bakterienstämme .....</b>	<b>10</b>
2.1.1	Verwendete Stämme .....	10
2.1.2	Nährmedien und Antibiotika.....	10
2.1.3	Kultivierung .....	11
2.1.4	Bestimmung der Zelldichte.....	11
<b>2.2</b>	<b>Verwendete Plasmide.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3</b>	<b>Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren .....</b>	<b>12</b>
2.3.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	12
2.3.2	Präzipitation .....	13
2.3.3	Phenol/Chloroform-Extraktion .....	13
<b>2.4</b>	<b>Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden .....</b>	<b>13</b>
2.4.1	Aneinanderlagerung und Phosphorylierung von Oligonukleotidsequenzen .....	14
<b>2.5</b>	<b>Isolierung von Plasmid-DNS.....</b>	<b>14</b>
2.5.1	Kochschnelltest .....	14
2.5.2	Alkalische Lyse mit Säulenchromatographie (Qiagen Kits).....	15
2.5.3	Isolierung von P1 Plasmid-DNS .....	15
<b>2.6</b>	<b>Isolierung von genomischer DNS .....</b>	<b>16</b>
2.6.1	Isolierung von genomischer DNS aus Mausgewebe.....	16
2.6.2	Isolierung von genomischer DNS aus einem Teil des Mausschwanzes .....	16
<b>2.7</b>	<b>Enzymatische Modifikation von DNS .....</b>	<b>17</b>
2.7.1	Restriktionsenzyme .....	17
2.7.2	Alkalische Phosphatase.....	17
2.7.3	Auffüllreaktion.....	17
2.7.4	T4-DNS-Ligase .....	18
<b>2.8</b>	<b>Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten.....</b>	<b>18</b>
2.8.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	19
2.8.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	19
2.8.3	Field Inversion Gelectrophoresis .....	19
2.8.4	Elektroelution.....	20
<b>2.9</b>	<b>Sequenzierung von Plasmid-DNS.....</b>	<b>20</b>
2.9.1	Sequenzreaktion mit radioaktivmarkierten Nukleotiden ( $\alpha$ - <sup>35</sup> S-dATP) .....	21

2.9.2	Automatische Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese mit fluoreszenzmarkierten Terminatoren .....	22
<b>2.10</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>24</b>
2.10.1	Verschiedene PCR Protokolle .....	25
2.10.2	Long Template PCR .....	28
<b>2.11</b>	<b>Transformation von Bakterien .....</b>	<b>29</b>
2.11.1	Präparation von kompetenten Bakterienzellen .....	29
2.11.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	29
<b>2.12</b>	<b>Herstellung <sup>32</sup>P-markierter DNS-Gensonden .....</b>	<b>30</b>
<b>2.13</b>	<b>Southern Hybridisierung .....</b>	<b>30</b>
<b>2.14</b>	<b>Isolierung und Analyse von RNS aus eukaryotischen Zellen .....</b>	<b>33</b>
2.14.1	Isolierung von Gesamt- RNS .....	34
2.14.2	Synthese von einzelsträngiger cDNA .....	34
<b>2.15</b>	<b>Transiente Transfektion von COS Zellen mit CaPO<sub>4</sub>-Präzipitation .....</b>	<b>34</b>
<b>2.16</b>	<b>Zellkultur embryonaler Stammzellen .....</b>	<b>36</b>
2.16.1	Nährmedium .....	36
2.16.2	Lösungen .....	37
2.16.3	Präparation und Kultivierung embryonaler Fibroblasten .....	38
2.16.4	Erstes ES Zell Targeting .....	39
2.16.4.1	Analyse der ES Zellklone mittels Southern Hybridisierung .....	43
2.16.5	Zweites ES Zell Targeting .....	43
<b>2.17</b>	<b>Erzeugung genetisch veränderter Mäuse .....</b>	<b>44</b>
2.17.1	Haltung und Zucht der Mäuse .....	44
2.17.2	Injektion genetisch modifizierter ES Zellen in Blastozysten .....	44
2.17.3	Genotypisierung der „agouti“ Nachkommen mittels PCR .....	46
2.17.4	Genotypisierung der Mäuse mittels Southern Hybridisierung .....	47
<b>2.18</b>	<b>Charakterisierung der <math>\alpha_{1C}</math> (-/-) Embryos .....</b>	<b>47</b>
2.18.1	Anfertigung von Embryoschnitten .....	47
2.18.1.1	Histologische Färbungen .....	48
2.18.1.2	Mikroskopie und Photographie .....	49
<b>2.19</b>	<b>Elektrophysiologische Untersuchungen .....</b>	<b>49</b>
2.19.1	Isolierung kardialer Myozyten aus Embryos am Tag 12,5 p.c. ....	49
2.19.2	Versuchsdurchführung .....	50
<b>2.20</b>	<b>Lösungen .....</b>	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Restriktionskartierung der P1-Plasmide .....</b>	<b>53</b>
3.1.1	„Field Inversion“ Gelelektrophorese .....	53
3.1.2	Long Template PCR .....	54

3.1.3	Restriktionskarte .....	54
<b>3.2</b>	<b>Konstruktion des Targeting Vektors .....</b>	<b>55</b>
3.2.1	Wesentliche Merkmale des Targeting Vektors .....	55
3.2.2	Gensonden zum Nachweis der Mutation im Genom der ES Zellen .....	56
<b>3.3</b>	<b>Transiente Transfektion in COS Zellen.....</b>	<b>57</b>
<b>3.4</b>	<b>ES Zell Targeting .....</b>	<b>60</b>
3.4.1	Erstes Targeting .....	60
3.4.1.1	Analyse der ES Zellklone mittels Southern Hybridisierung .....	61
3.4.1.1.1	Southern Hybridisierung mit der 5' Sonde .....	61
3.4.1.1.2	Southern Hybridisierung mit der 3' Sonde .....	62
3.4.1.1.3	Southern Hybridisierung mit der neo Sonde.....	63
3.4.2	Zweites Targeting .....	64
3.4.2.1	Analyse der ES Zellklone mittels Southern Hybridisierung .....	65
3.4.2.1.1	Southern Hybridisierung mit der 5' Sonde .....	66
3.4.2.1.2	Southern Hybridisierung mit der 3' Sonde .....	66
3.4.2.1.3	Southern Hybridisierung mit der <i>EcoRI</i> Sonde .....	67
<b>3.5</b>	<b>Injektion positiver ES Zellklone in Blastozysten .....</b>	<b>68</b>
<b>3.6</b>	<b>Genotypisierung „agouti-farbener“ Nachkommen .....</b>	<b>69</b>
3.6.1	Genotypisierung der $\alpha_{1C}$ (+/+ <sup>flox</sup> ) Mäuse .....	69
3.6.2	Genotypisierung der $\alpha_{1C}$ (+/-) Mäuse .....	70
<b>3.7</b>	<b>Analyse der „geflochten“ und (+/-) Mäuse .....</b>	<b>72</b>
3.7.1	Weitere Verpaarungen der $\alpha_{1C}$ (+/+ <sup>flox</sup> ) Mäuse.....	72
3.7.2	RNS Analysen der $\alpha_{1C}$ (+ <sup>flox</sup> /+ <sup>flox</sup> ) Mäuse.....	73
3.7.3	Weitere Verpaarungen der (+/-) Mäuse .....	75
<b>3.8</b>	<b>Charakterisierung der <math>\alpha_{1C}</math> (-/-) Embryos .....</b>	<b>75</b>
3.8.1	Färbungen von Embryoschnitten von (+/-) und (-/-) Embryos .....	75
3.8.2	Southern Hybridisierung der Embryos isoliert am Tag 12,5 p.c.....	76
3.8.3	RT PCR.....	77
3.8.4	Sequenzvergleich der RT PCR von Exon 13 bis Exon 16 eines (-/-) Embryos mit der $\alpha_{1C}$ Wildtyp Sequenz in diesem Bereich .....	79
3.8.5	Elektrophysiologische Charakterisierung kardialer Myozyten .....	80
3.8.5.1	Strom-Spannungskurven.....	81
3.8.5.2	Block mit Nisoldipin.....	83
4	DISKUSSION .....	86
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	91
6	ANHANG .....	92
<b>6.1</b>	<b>Auflistung der verwendeten Oligonukleotide (Primer).....</b>	<b>92</b>
6.1.1	Exonprimer .....	92
6.1.2	Intronprimer .....	92

6.1.3	Sonstige, verwendete Oligonukleotide.....	93
<b>6.2</b>	<b>Sequenzvergleich der Wildtyp <math>\alpha_{1C}</math> Untereinheit mit einem RT PCR Fragment eines (-/-) Embryos in der kritischen Region.....</b>	<b>95</b>
<b>6.3</b>	<b>Mittelwerte der Kontraktionen der Herzen, isoliert am Tag 12,5 p.c. und der Herzzellen einen Tag nach der Kultivierung. ....</b>	<b>96</b>
<b>6.4</b>	<b>Verwendete Restriktionsenzyme.....</b>	<b>97</b>
<b>6.5</b>	<b>Drei-Buchstaben-Code und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren: .....</b>	<b>97</b>
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	98
<b>7.1</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen .....</b>	<b>104</b>

**Abkürzungen**

A	Adenin, Ampere
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie (1Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq)
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
cpm	counts per minute
Cre	cyclization recombination
d	Tag
Da	Dalton
ddNTP	2',3'-Dodesoxynukleosid-5'-triphosphat
DHP	Dihydropyridin
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EF	embryonale Fibroblasten
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N',-tetraessigsäure
ES Zellen	embryonale Stammzellen
F	Farad (Kapazität)
FBS	Fötales Rinderserum
FIGE	Field Inversion Gel Electrophoresis
flox	loxP-flankiert
G	Guanin
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HP	Haltepotential
HVA	high voltage activated
$I_{Ba}$	Bariumstrom
$I_{Na}$	Natriumstrom
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
kb	kilobase
k. o.	knock out
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
loxP	locus of cross-over of P1
LVA	low voltage activated
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )

M	Mega ( $10^6$ ) bzw. molar
m	Milli ( $10^{-3}$ ) bzw. Meter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
n	Nano ( $10^{-9}$ )
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
OT	Objektträger
p	Piko ( $10^{-12}$ )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
p.c.	post coitum
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
ssDNA	(salmon sperm DNA) = Lachssperma-DNS
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	$\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
tRNA	Transfer-RNS
U	Unit, Einheit
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid

## 1 Einleitung

Die Änderung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration ist einer der wichtigsten Regulationsmechanismen der Zelle. Spannungsaktivierte Kalziumkanäle sind wesentlich an der Kontrolle der intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt. Zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Regulationsmechanismen zählt man unter anderem die Synthese und Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen, die Regulation von Enzymaktivitäten, die Kontraktion des Herzens, des glatten Muskels und die elektromechanische Kopplung im Skelettmuskel. Die Öffnung dieser Kanäle wird hauptsächlich durch das Membranpotential reguliert, wird aber auch durch Hormone, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, Toxinen und Pharmaka beeinflusst (Hofmann et al., 1999).

### 1.1 Spannungsaktivierte Kalziumkanäle

High voltage aktivierte (HVA) Kalziumkanäle sind heterooligomere Komplexe (**Abbildung 1-1**), die aus bis zu vier Untereinheiten bestehen. Die wichtigste und größte ist die  $\alpha_1$  Untereinheit, ein Transmembranprotein, das aus vier homologen Domänen gebildet wird, die sich wiederum aus 6 transmembranen Segmenten zusammensetzen. Sie enthält die Pore, den Spannungssensor, den Ionen Selektivitätsfilter und die Bindungsstellen für alle bekannten Kalziumkanalblocker. Die anderen am Aufbau beteiligten Proteine werden als Hilfsuntereinheiten bezeichnet. Dazu zählen die  $\beta$  Untereinheit, die  $\alpha_2\delta$  Untereinheit und die  $\gamma$  Untereinheit. Unter anderem beeinflussen sie die Kinetik und Amplitude des Kalziumstromes und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung von Kalziumkanalblockern. Teilweise sind sie auch für den richtigen Einbau des gesamten Kalziumkanals in der Zellmembran wichtig (Shistik et al., 1995).

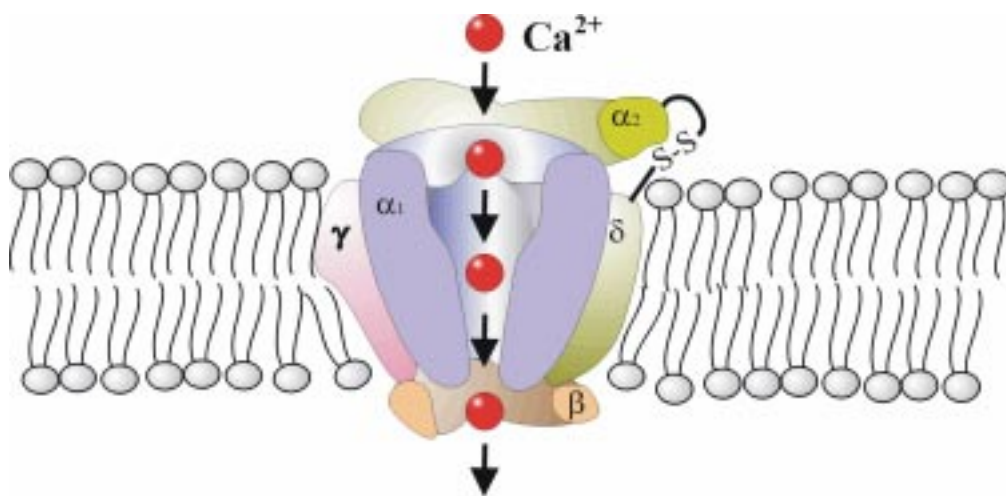


Abbildung 1-1 Zusammensetzung eines high-voltage-aktivierten Kalziumkanal-Komplexes.



Bis zum heutigen Tag sind zehn Gene identifiziert worden, die für die  $\alpha_1$  Untereinheit spannungsabhängiger Kalziumkanäle codieren (**Tabelle 1-1**).

Tabelle 1-1 Klassifizierungsschema spannungsabhängiger Kalziumkanäle.

Bezeichnungen			Gewebeverteilung	Blocker
LVA	$\alpha_{1G}$	T-Typ	Hirn, Herz	Mibefradil, Kurtoxin
	$\alpha_{1H}$	T-Typ	Niere, Herz, Hirn	Mibefradil, Kurtoxin
	$\alpha_{1I}$	T-Typ	Hirn	Mibefradil
HVA	$\alpha_{1S}$	L-Typ	Skelettmuskel	DHP, PAA, BTZ
	$\alpha_{1C}$	L-Typ	Herz, glatter Muskel, Hirn	DHP, PAA, BTZ
	$\alpha_{1D}$	L-Typ	neuronale, endokrine Gewebe, Cochlea	DHP, PAA, BTZ
	$\alpha_{1F}$	L-Typ	Auge (bisher noch nicht funktionell charakterisiert)	
	$\alpha_{1A}$	P/Q-Typ	Hirn, peripheres Nervensystem	$\omega$ -Agatoxin IVA
	$\alpha_{1B}$	N-Typ	Hirn	$\omega$ -Conotoxin GVIA
	$\alpha_{1E}$	R-Typ	Hirn, neuroendokrine Gewebe, Retina, Herz, Cochlea	

Zu einem sehr frühen Zeitpunkt während der Evolution trennte sich die Gruppe der low voltage aktivierten (LVA) von der der high voltage aktivierten (HVA) Kalziumkanäle ab. Beide Gruppen zeigen unterschiedliche elektrophysiologische und pharmakologische Eigenschaften (Hofmann et al., 1999). LVA-Kanäle, die auch als T-Typ Kalziumkanäle bezeichnet werden, beginnen sich zu öffnen, wenn das Membranpotential der Zelle auf  $-60$  bis  $-40$  mV depolarisiert wird. Sie öffnen und inaktivieren sehr schnell. HVA-Kanäle dagegen beginnen erst bei  $> -30$  mV sich zu öffnen. Auch in der Inaktivierung zeigen sich signifikante Unterschiede. Während LVA-Kanäle sich nach ihrer Aktivierung bereits nach wenigen Millisekunden wieder schließen (inaktivieren), bleiben z.B. L-Typ-Kanäle etwa 500 ms geöffnet. LVA-Kanäle besitzen im Vergleich zu HVA-Kanälen nur eine geringere Leitfähigkeit (Klugbauer, 1999c).

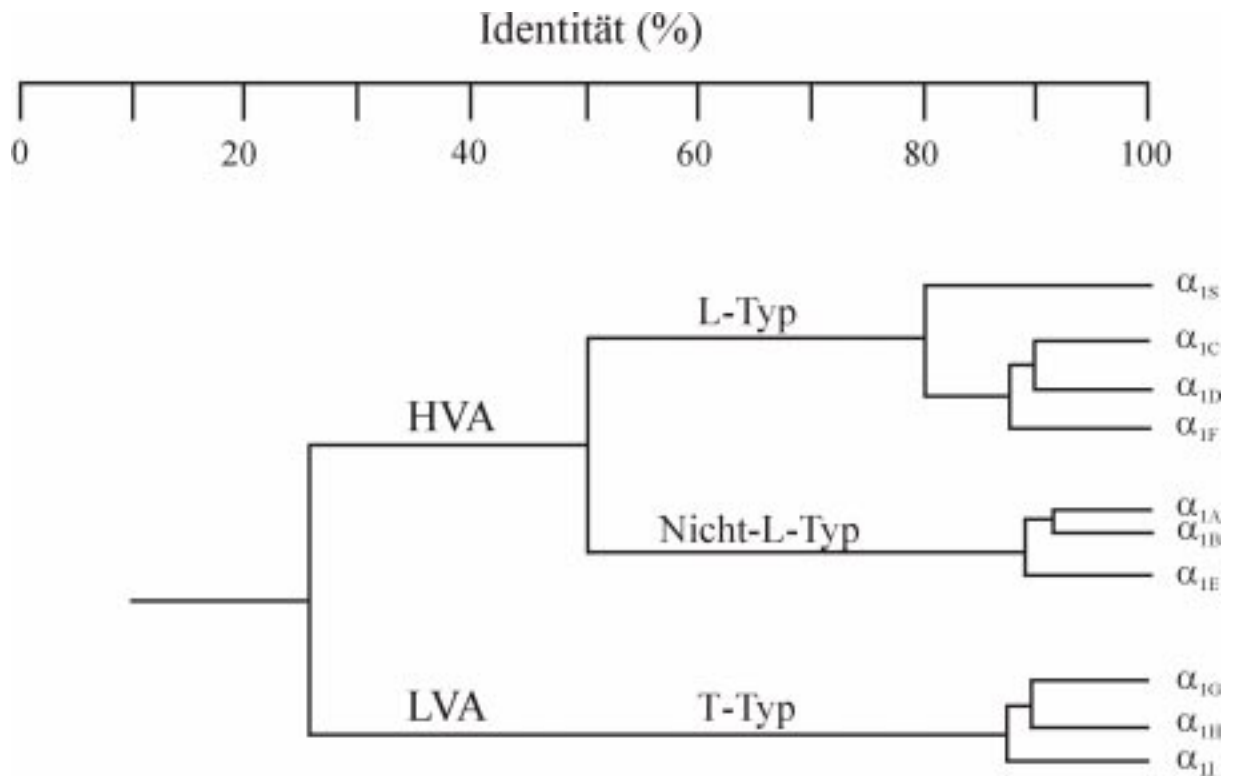


Abbildung 1-2 Phylogenetischer Stammbaum der spannungsaktivierten Kalziumkanäle.

Die Familie der LVA-Kanäle umfasst drei Mitglieder  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$ ,  $\alpha_{1I}$  (Perez-Reyes et al., 1998; Cribbs et al., 1998, Klugbauer et al. 1999b., Chuang et al., 1998) Die Familie der HVA-Kanäle lässt sich weiter unterteilen in die Gruppe der L-Typ-Kalziumkanäle und der „Nicht-L-Typ-Kalziumkanäle“ (**Tabelle 1-1**). Zu den L-Typ-Kanälen zählen die  $\alpha_{1S}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$  und  $\alpha_{1F}$  Untereinheiten. Die  $\alpha_{1S}$  Untereinheit wird im Skelettmuskel exprimiert (De Jongh et al., 1991). Das  $\alpha_{1C}$  Gen wird im Herz, im glatten Muskel und im Gehirn exprimiert. Die  $\alpha_{1D}$  Untereinheit wurde in neuronalen und endokrinen Geweben (Williams et al. 1992b, Seino et al. 1992) und der Cochlea (Kollmar et al., 1997 a+b) identifiziert, die  $\alpha_{1F}$  Untereinheit in der Retina (Bech-Hansen et al., 1998, Strom et al., 1998).

Die Gruppe der „Nicht-L-Typ-Kalziumkanäle“ umfasst die  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  und  $\alpha_{1E}$  Untereinheiten. Sie wurden in neuronalen und endokrinen Geweben identifiziert.

### 1.1.1 Die Hilfsuntereinheiten des high-voltage aktivierten Kalziumkanalkomplexes

Die Strukturen der Hilfsuntereinheiten des Kalziumkanals sind in **Abbildung 1-3** dargestellt.

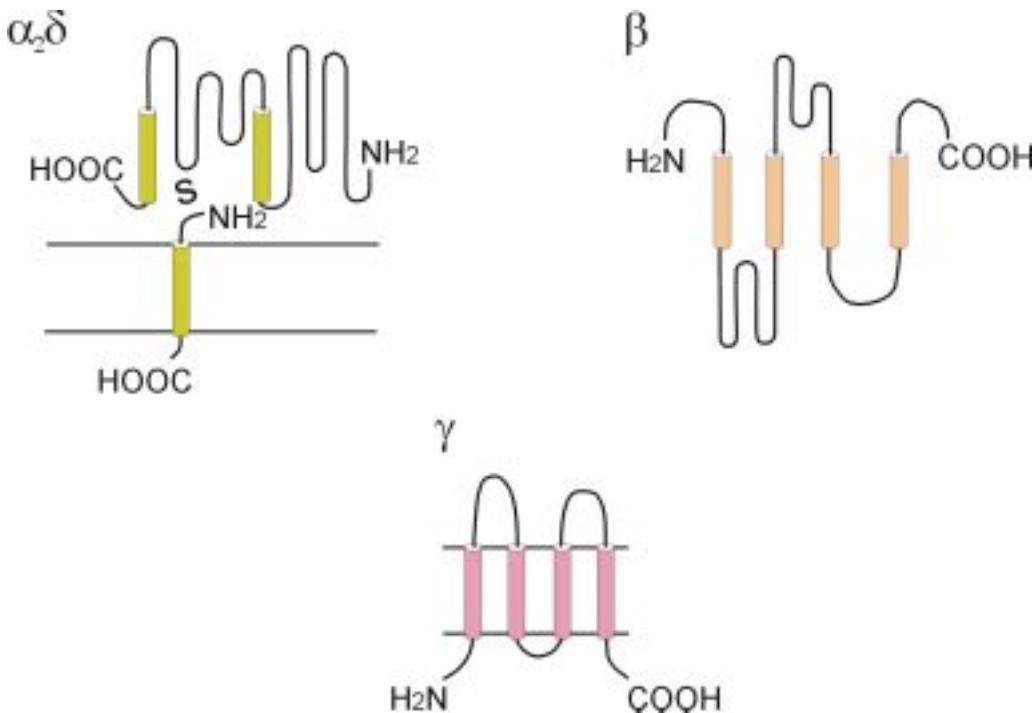


Abbildung 1-3 Strukturmodelle der Hilfsuntereinheiten des Kalziumkanalkomplexes

Die  $\beta$  Untereinheiten sind intrazellulär lokalisierte Proteine mit einer Größe von 50 bis 72 kDa. Bis heute wurden vier Gene identifiziert (Ruth et al., 1989; Hullin et al., 1992; Perez-Reyes et al., 1992; Castellano et al., 1993). Alle werden alternativ gespleißt, so dass mehrere Isoformen vorkommen. Sequenzvergleiche der  $\beta$  Untereinheiten zeigten, dass alle einen gemeinsamen zentralen Kern besitzen, während sich ihre Amino- und Carboxy-Termini und ein Teil der zentralen Region signifikant unterscheiden.

Die erste cDNA einer  $\beta$  Untereinheit wurde aus dem Skelettmuskel isoliert (Ruth et al., 1989). Durch alternatives Spleißen des  $\beta_1$  Gens entstehen drei Isoformen (Pragnell et al., 1991; Williams et al., 1992). Die  $\beta_{1a}$  Untereinheit wird ausschließlich im Skelettmuskel zusammen mit den Untereinheiten  $\alpha_{1S}$ ,  $\alpha_2\delta$ -1 und  $\gamma_1$  exprimiert, während die anderen zwei Isoformen im Hirn, Herz und in der Milz identifiziert wurden (Powers et al., 1992). Das  $\beta_2$  Gen, ein 72 kDa Protein, wird stark im Herz und in Aorta, Trachea, Lunge und Hirn exprimiert (Biel et al., 1991). Die  $\beta_3$  Untereinheit, ein 60 kDa Protein, wird im glatten Muskel und im Hirn, die  $\beta_4$  Untereinheit, ein 58 kDa Protein, wird im Hirn (Hullin et al., 1992; Castellano et al., 1993; Ludwig et al., 1997) detektiert.

Durch die Coexpression verschiedener  $\beta$  Untereinheiten mit der  $\alpha_1$  Untereinheit werden die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung, Kinetik und Größe des Stromes abhängig von der Kombination der Untereinheiten verändert. Am  $\alpha_{1C}$  Kanal bewirkt die  $\beta$  Untereinheit eine Erhöhung des Spitzenstromes, eine Beschleunigung der Aktivierung und Inaktivierung und eine Verschiebung der Strom-Spannungsbeziehungskurven zu negativeren Potentialen (Singer et al., 1991; Wei et al., 1991; Welling et al., 1993)

Die  $\alpha_2\delta-1$  Untereinheit des Skelettmuskels ist ein stark glykosyliertes Membranprotein von 125 kDa (Ellis et al., 1988). Das Protein wird durch Proteolyse posttranslational gespalten und führt zu einem  $\alpha_2$  Protein mit den N-terminalen 934 Aminosäuren und einem  $\delta$  Protein mit den Aminosäuren 935 bis 1080, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (De Jongh et al., 1990). Die transmembrane  $\delta$  Untereinheit verankert die extrazelluläre  $\alpha_2$  Untereinheit am Kalziumkanalkomplex (Wiser et al., 1996). Spleißvarianten dieser Untereinheit wurden im Hirn des Menschen und der Ratte identifiziert (Williams et al., 1992). Unterschiedliches Spleißen der  $\alpha_2\delta-1$  Untereinheit führt zu fünf verschiedenen Isoformen, die gewebespezifisch exprimiert werden (Angelotti und Hofmann, 1996). Zwei zusätzliche  $\alpha_2\delta$  Gene,  $\alpha_2\delta-2$  und  $\alpha_2\delta-3$  wurden kürzlich identifiziert (Klugbauer et al., 1999a). Die Primärstrukturen der  $\alpha_2\delta-2$  und  $\alpha_2\delta-3$  Untereinheiten sind ungefähr 50% und 30% identisch mit der  $\alpha_2\delta-1$  Untereinheit.  $\alpha_2\delta-1$  wird ebenso ubiquitär exprimiert wie  $\alpha_2\delta-2$ .  $\alpha_2\delta-3$  wird ausschließlich im Hirn exprimiert. Die Coexpression der  $\alpha_2\delta-1$  Untereinheit mit  $\alpha_1$  und  $\beta$  führt zu einer Vergrößerung der Stromamplitude und zu einer Beschleunigung der Kanalaktivierung und -inaktivierung (1991; Singer et al., 1991; Klugbauer et al., 1999a).

Die  $\gamma_1$  Untereinheit ist ein integrales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 25 kDa (Bosse et al., 1990; Jay et al., 1990). Northern und RT-PCR Analysen ergaben, dass die  $\gamma$  Untereinheit ausschließlich im Skelettmuskel exprimiert wird (Eberst et al., 1997). Hydrophobizitätsanalysen zufolge besteht die  $\gamma$  Untereinheit aus vier möglichen Transmembransegmenten mit intrazellulären Amino- und Carboxy-Termini. Zwei putative extrazelluläre N-Glycosylierungsstellen stehen im Einklang mit der beobachteten starken Glycosylierung des Proteins (Takahashi et al., 1987).

Eine zweite  $\gamma_2$  Untereinheit wurde im Hirn identifiziert, die zu 25% identisch mit der  $\gamma_1$  Untereinheit (Letts et al., 1998) ist. Kürzlich sind noch weitere  $\gamma$  Untereinheiten identifiziert worden,  $\gamma_3$  (Black et al., 1999),  $\gamma_4$  und  $\gamma_5$  (Klugbauer et al., 2000). Die  $\gamma_3$  Untereinheit wurde ebenfalls im Hirn identifiziert. Die  $\gamma_3$  und  $\gamma_4$  Untereinheiten sind homolog zu der  $\gamma_2$  Untereinheit und werden in verschiedenen Hirnregionen exprimiert. Die  $\gamma_5$  Untereinheit ist zu 25% identisch mit der  $\gamma_1$  Untereinheit und wird im Skelettmuskel, in der Leber, in der Niere, in der Lunge und im Herz exprimiert.

## 1.2 L-Typ Kalziumkanäle

L-Typ Kalziumkanäle besitzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression verschiedene Funktionen. Im Skelettmuskel sind sie entscheidend an der elektromechanischen Kopplung beteiligt. Dieser Prozess benötigt keinen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem extrazellulären Raum durch den Kanal (Rios et al., 1992). Im Herz sind die L-Typ Kalziumkanäle notwendig für die Entstehung elektrischer Impulse und für die Kontraktion des Herzmuskels. Im glatten Muskel sind sie verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Gefäßtonus. L-Typ Kanäle werden durch die drei Gruppen der klassischen Kalziumkanalblocker: 1,4-Dihydropyridine, Phenylalkylamine oder Benzothiazepine blockiert.

Das  $\alpha_{1C}$  Gen umfasst ungefähr 150 kb und ist aus 44 invarianten und mehr als 6 alternativen Exons zusammengesetzt (Soldatov, 1994). Im Herz, im glatten Muskel und im Gehirn wurden unterschiedliche Spleißformen des  $\alpha_{1C}$  Gens gefunden. Die Spleißformen des kardialen ( $\alpha_{1C-a}$ ; Mikami et al., 1989) und des glatt-muskulären ( $\alpha_{1C-b}$ ; Biel et al., 1990) Kalziumkanals unterscheiden sich am Aminoterminal, in den Transmembransegmenten IS6 und IVS3 und in einem Insert in der intrazellulären Schleife zwischen Domäne I und II (**Abbildung 1-4**). Molekulare Analysen zeigten, dass das alternativ gespleißte Exon 8, welches das IS6 Segment codiert, im Herz und im glatten Muskel unterschiedlich exprimiert wird und teilweise für die unterschiedliche DHP Sensitivität des L-Typ Stromes im Herz und im glatten Muskel der Gefäße verantwortlich ist (Welling et al., 1997).

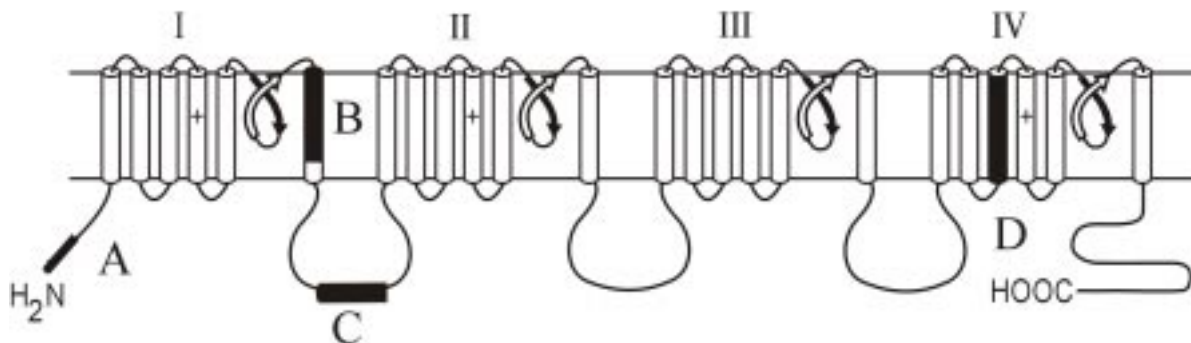


Abbildung 1-4 Spleißvarianten des kardialen ( $\alpha_{1C-a}$ ) und des glattmuskulären ( $\alpha_{1C-b}$ ) Kalziumkanals. Die Sequenzunterschiede zwischen dem  $\alpha_{1C-a}$  und dem  $\alpha_{1C-b}$  Gen sind schwarz gekennzeichnet.

Zur weiteren Aufklärung der unterschiedlichen Funktionen des  $\alpha_{1C}$  Gens in den verschiedenen Geweben, wurde in der vorliegenden Arbeit das  $\alpha_{1C}$  Gen der Maus mittels *gene targeting* inaktiviert.

### 1.3 Gene targeting

Die Fähigkeit das Genom von Mäusen durch zufällige Integration von Transgenen oder an gezielter Stelle in embryonalen Stammzellen zu modifizieren hat das Verständnis von Genfunktionen in Säugetieren sehr stark verbessert. Im allgemeinen bezeichnet man als *gene targeting* die Modifikation z.B. die Inaktivierung eines bestimmten Gens innerhalb des Genoms embryonaler Stammzellen (ES Zellen) durch homologe Rekombination (Jaenisch R, 1988; Capecchi MR, 1989).

Embryonale Stammzellen sind Zellen, die aus einem frühen Stadium der Mausentwicklung stammen und noch nicht differenziert sind, d.h. sie sind pluripotent. Werden diese ES Zellen auf ein frühes Mausembryo übertragen, können sie an der Entwicklung einer bestimmten Zelllinie (einschließlich den Keimzellen) der Maus teilnehmen. Die Übertragung genetisch modifizierter ES Zellen auf Mausembryos ermöglicht die Übertragung der Mutation in die Keimbahn (Rajewski et al., 1996). Die Weitergabe dieser Mutation an die nachfolgenden Generationen ist dadurch gewährleistet. Wurde das Ziel-Gen durch die Mutation allerdings zerstört, so ist dieses Gen in allen Zellen des Organismus schon während der prä- und postnatalen Entwicklung zerstört, was als klassische Geninaktivierung bezeichnet wird. Handelte es sich bei dem Ziel-Gen um ein lebenswichtiges Gen, so ist die Genfunktion nur bedingt aufklärbar. Als Weiterentwicklung des klassischen Ansatzes steht dem die konditionale Geninaktivierung gegenüber. Dieser konditionale Ansatz bietet die Möglichkeit, das Ziel-Gen räumlich und zeitlich kontrolliert zu inaktivieren. Die Vorteile der konditionalen gegenüber der klassischen Geninaktivierung sind beispielsweise die Untersuchung der Genfunktion innerhalb eines bestimmten Gewebes oder zu einem bestimmten Zeitpunkt während oder nach der Embryonalentwicklung. Für die konditionale Geninaktivierung eignet sich das Cre/loxP Rekombinationssystem aus dem Bakteriophagen P1 (Hoess und Abremski, 1990). Die Cre (cyclization recombination) Rekombinase ist ein 38 kDa Protein, das die Rekombination zwischen zwei 34 bp loxP (locus of cross-over of P1) Erkennungsseiten katalysiert, ohne Beteiligung eines Kofaktors. In Abhängigkeit der Orientierung und Lokalisierung der loxP Seiten führt die Rekombination zu DNS Inversion, Exzision/Integration und Translokation. Alle Reaktionen sind reversibel, die intramolekulare Rekombination (Inversion und Exzision) ist kinetisch effizienter als die intermolekulare Rekombination (Integration und Translokation) (Metzger und Feil, 1999). Die Voraussetzung für eine Cre/loxP-gerichtete Geninaktivierung durch Exzision ein oder mehrerer Exons ist, zwei gleichgerichtete loxP Seiten innerhalb der Introns in das Genom von ES Zellen so einzusetzen, dass sie essentielle Exons eines bestimmten Gens flankieren, die Genexpression dadurch aber nicht schwächen. Sobald die Cre Rekombinase zugeführt wird, entweder durch transiente Cre Expression in ES Zellen (Gu et al., 1997) oder durch Cre-transgene Mäuse (Tsien et al., 1996), kann die gewünschte Cre-vermittelte Rekombination zwischen den loxP Seiten erreicht werden. Die von den zwei loxP Seiten flankierten Exons werden dadurch deletiert, die Genstruktur und damit das Gen sind zerstört (**Abbildung 1-5**).

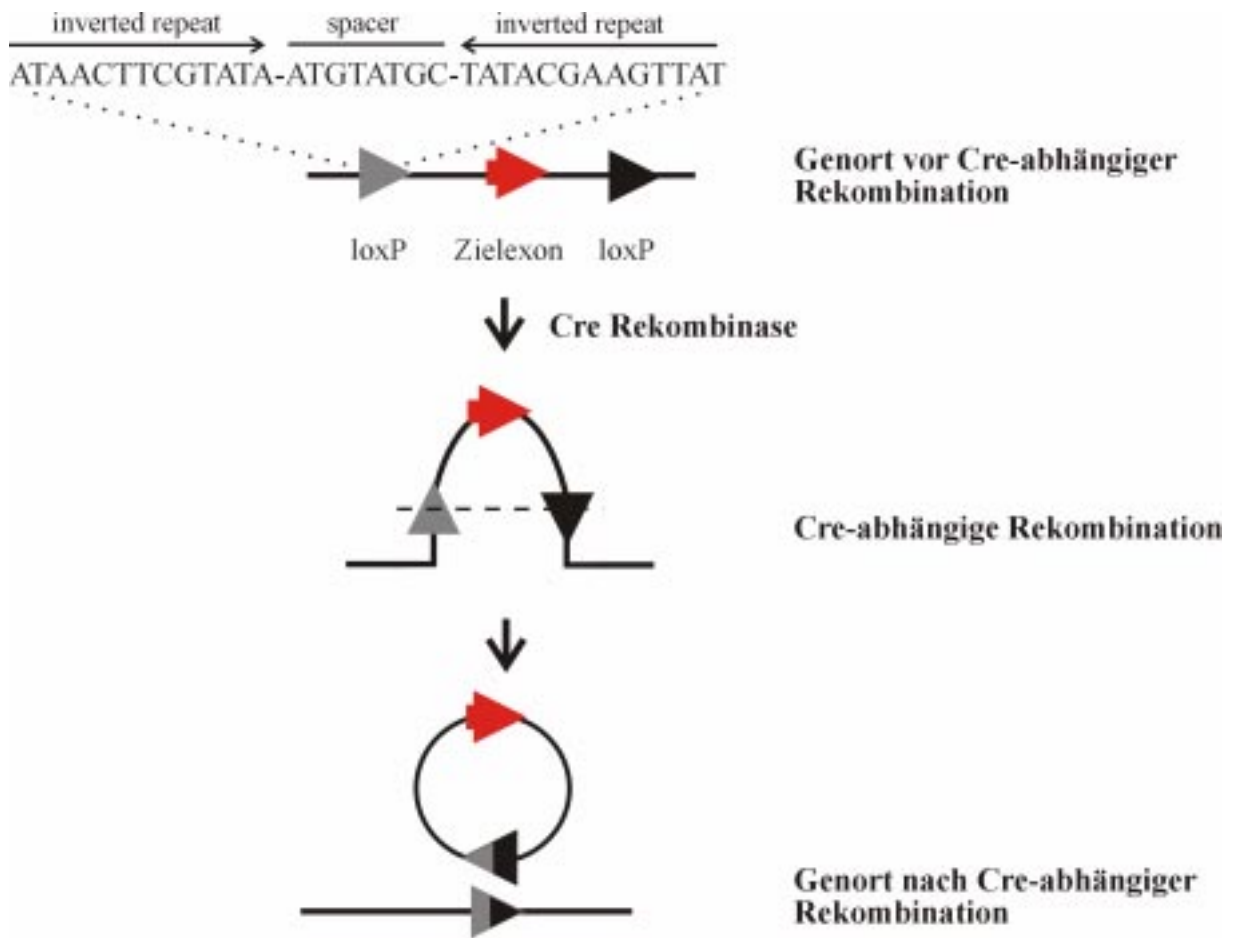


Abbildung 1-5 Cre-vermittelte Rekombination. Zweigleichgerichtete loxP Sequenzen flankieren ein Exon. Über Cre-vermittelte Rekombination wird das Exon deletiert, so dass eine einzelne loxP Sequenz in der DNS zurückbleibt.

### Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Ansätze zur Inaktivierung der  $\alpha_{1C}$  Untereinheit verfolgt. Das oben beschriebene Cre/loxP Rekombinationssystem bietet die Möglichkeit eine klassische und eine konditionale Geninaktivierung durchzuführen. Im Verlauf dieser Arbeit wurde mit Hilfe dieses Rekombinationssystems das  $\alpha_{1C}$  Gen inaktiviert. Die Inaktivierung des  $\alpha_{1C}$  Gens führte zu keinen lebensfähigen (-/-) Nachkommen. Aus diesem Grund war es ein zusätzliches Ziel dieser Arbeit die (-/-) Embryos zu analysieren.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine zukünftige konditionale Geninaktivierung vorzubereiten. Dazu wurde eine Mauslinie etabliert, die auf beiden Allelen des  $\alpha_{1C}$  Gens zwei gleichgerichtete loxP Sequenzen trägt, die die Exons 14 und 15 5' und 3' terminal flankieren, wodurch die Genexpression aber nicht beeinträchtigt wurde. Dadurch wurde die Möglichkeit geschaffen, durch gezielte Verpaarungen dieser homozygot „geflochten“ Mäuse mit Cre-exprimierenden Mäusen das  $\alpha_{1C}$  Gen gewebespezifisch und zeitlich kontrolliert zu inaktivieren. Verschiedenen konditionale Geninaktivierungen sind mittlerweile beschrieben worden. Je nach Expression der Cre Rekombinase wurde das Zielgen gewebespezifisch zerstört. Unterlag die Cre Expression der Kontrolle des MLC2v Promoters, so konnte eine herzspezifische Inaktivierung des RXRa Gens gezeigt werden (Chen et al., 1998). Die Verwendung von Rip-Cre Mäusen, bei denen die Cre Expression dem Insulin Promoter der Ratte unterlag, führte zum knock out des Insulin-Rezeptors in den  $\beta$  Zellen des Pankreas (Kulkarni et al., 1999) und zum knock out der Glukokinase, ebenfalls nur in den  $\beta$  Zellen (Postic et al., 1999).

Für weitere Untersuchungen der unterschiedlichen Funktionen des  $\alpha_{1C}$  Gens, wird die in dieser Arbeit beschriebene Maus, deren  $\alpha_{1C}$  Gen homozygot geflochte wurde, mit folgenden Cre-exprimierenden Mäusen verpaart werden: MLC 2a-Cre, Nex-Cre und Rip-Cre. Der MLC 2a Promoter wird im Herz exprimiert, wodurch eine herzspezifische Inaktivierung des  $\alpha_{1C}$  Gens erreicht wird. Die Cre Expression unter Kontrolle des Nex Promoters dagegen, verursacht eine Zerstörung des  $\alpha_{1C}$  Gens in neuronalen Bereichen. Die Verpaarung mit Rip-Cre Mäusen führt zur Inaktivierung der  $\alpha_{1C}$  Untereinheit in den  $\beta$  Zellen des Pankreas.

Desweiteren wird das  $\alpha_{1C}$  Gen zukünftig, zusätzlich zur gewebespezifischen Inaktivierung, auch noch zeitlich kontrolliert ausgeschaltet. Dazu wird die „geflochte“ Maus mit einer Cre-exprimierenden Maus verpaart, wobei die Aktivierung der Cre Rekombinase im glatten Muskel induzierbar ist (Kühbänder et al., 2000). Ein modifiziertes Cre-Gen (Cre-ER<sup>T</sup>) wurde dazu in den Genlokus eines glattemuskulären Proteins eingesetzt („knock in“). Der homozygote „knock in“ zeigte keine phänotypischen Auswirkungen. Die Expression des Cre-Gens ist damit auf den glatten Muskel beschränkt. Gleichzeitig wurde das Cre-Gen mit einer mutierten Liganden-Bindungsdomäne des Östrogenrezeptors fusioniert, so dass die Cre Rekombinase nur mit Tamoxifen aber nicht mit Östrogen aktiviert werden kann (Metzger et al., 1995; Feil et al., 1996; Brocard et al., 1997).



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

#### 2.1.1 Verwendete Stämme

Zur Amplifikation von Plasmiden wurde als Wirtsorganismus der *Escherichia coli* Stamm XL1-blue MRF' (Stratagene) verwendet. Sein Genotyp kann mit  $\Delta(mrcA)183 \Delta(mrcCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\Delta}Z\Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$  beschrieben werden.

#### 2.1.2 Nährmedien und Antibiotika

Die Züchtung von Bakterien erfolgte in dem Vollmedium Luria-Bertani (LB) mit Glucose. LB- und SOC-Medium wurden zur Sterilisation für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert, das LB-Medium bei Raumtemperatur und das SOC(-)-Medium bei -20°C gelagert. SOC-Medium wurde unter Zugabe von 50 µl MgCl<sub>2</sub> (1 M), 50 µl MgSO<sub>4</sub> (1 M) und 100 µl Glucoselösung (20 %) zu 4,8 ml SOC(-)-Medium verwendet, um frisch transformierte Bakterien nach der Elektroporation zu resuspendieren.

<b>Luria-Bertani-Medium (+)</b>		<b>SOC-Medium (-)</b>	
Trypton (Gibco-BRL)	10 g	Trypton	20 g
Hefeextrakt (Gibco-BRL)	5 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g	NaCl	0,5 g
Glucose	1 g	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	pH 7,0	
pH 7,2 - 7,5			

Zur Selektion plasmidtragender Bakterien wurde dem LB-Medium kurz vor der Anzucht das Antibiotikum Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Die wässrige Stammlösung mit 50 mg/ml Ampicillin-Na (Sigma) wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Verfestigung zum LB-Agar wurden dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g Agar/l (Gibco-BRL) zugegeben. Das heiße Medium ließ man im Wasserbad auf circa 50 °C

abkühlen, bevor das gewünschte Antibiotikum zugegeben und das Medium in sterile Petrischalen gegossen werden konnten. Ampicillinendkonzentration: 50 µg/ml.

Um positive, mit pUC-Vektoren transformierte Klone selektionieren zu können, wurde das Phänomen der  $\alpha$ -Komplementierung der  $\beta$ -Galaktosidase ausgenutzt (Blau-Weiß-Selektion). Dazu wurde ein LB(-)-Agar (ohne Glucose) verwendet, dem nach dem Autoklavieren bei ungefähr 50 °C folgende Stoffe zugesetzt wurden:

2 ml/l X-Gal (2 %-ige 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid-Lösung in DMF, Roth)

500 µl/l IPTG (1 M wässrige Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid-Lösung, Roth)

1 ml/l Ampicillin-Na (50 mg/ml).

IPTG induziert die Produktion von  $\beta$ -Galaktosidase, die wiederum die Bildung eines blauen Indigofarbstoffs aus X-Gal katalysiert. Durch Einbau von Fremd-DNS in den pUC-Vektor kann das  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galaktosidase nicht mehr synthetisiert werden, die Bakterien, die rekombinante Plasmide enthalten, sind deshalb an ihrer weißen Farbe erkennbar.

### 2.1.3 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob in LB-Medium. Die Flüssigkulturen wurden in Glasröhrchen oder Erlenmeyerkolben angezogen und bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Zur kurzfristigen Aufbewahrung und um Einzelkolonien zu erhalten, wurden Bakteriensuspensionen auf Ampicillin-LB-Platten ausgestrichen, bei 37 °C inkubiert und bei 4 °C bis zu 8 Wochen gelagert. Zur längeren Aufbewahrung wurden logarithmisch wachsende Kulturen mit einem Volumen autoklavierten Glycerins (ICN) gemischt und bei -20 °C eingefroren.

### 2.1.4 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde durch photometrische Trübungsmessung bei 600 nm bestimmt. LB-Medium diente als Referenzlösung.

## 2.2 Verwendete Plasmide

Für diese Arbeit wurden Abkömmlinge des synthetisch hergestellten Plasmids pBR322 (Bolivar et al., 1977) verwendet.

**pUC18**

Das Plasmid pUC18 (Pharmacia) wurde zur Subklonierung und Sequenzierung von DNS-Fragmenten verwendet. Es enthält (wie auch pUC19) das Ampicillinresistenzgen ( $Amp^r$ ), den *E. coli*-Replikationsursprung, der für eine hohe Kopienzahl sorgt, und einen Teil des lacZ-Gens ( $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galaktosidase), so daß in dem Wirtstamm XL1-blue, der in seinem Genom eine Deletion im  $\beta$ -Galaktosidasegen aufweist, durch  $\alpha$ -Komplementierung funktionstüchtige  $\beta$ -Galaktosidase gebildet werden kann. Bei Einbau von Fremd-DNS innerhalb der multiplen Klonierungsstelle wird das  $\alpha$ -Peptid zerstört, wobei Blau-Weiß-Selektion in Anwesenheit eines chromogenen Substrats der  $\beta$ -Galaktosidase (X-Gal) ermöglicht wird.

**pBluescript II KS +/-**

Das Plasmid pBluescript (Stratagene) wurde ebenfalls zur Subklonierung und Sequenzierung von DNS-Fragmenten verwendet. Es enthält auch das Ampicillinresistenzgen ( $Amp^r$ ), den *E. coli* Replikationsursprung für eine hohe Kopienzahl und ermöglicht ebenfalls eine Blau-Weiß-Selektion (siehe pUC18). Die Restriktionsschnittstellen im Polylinker unterscheiden sich von denen in pUC18.

**pBSloxPneotkloxP**

Das Plasmid stammt von pBluescript ab und enthielt ein Neomycinresistenzgen und die Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus TypI. Der Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Fässler zur Verfügung gestellt und wurde für den Zusammenbau des Targeting Vektors verwendet.

**pBSloxP3**

Dieses Plasmid ist ebenfalls aus pBluescript hergestellt und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Robert Feil zur Verfügung gestellt. Mittels PCR (2.10.1) wurde die loxP Sequenz mit den gewünschten Schnittstellen amplifiziert, um sie in den Targeting Vektor einzusetzen. Die Primersequenzen sind im Anhang angegeben.

**2.3 Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren****2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine  $OD_{260}$  von 1

- 50 µg/ml doppelsträngiger DNS
- 40 µg/ml einzelsträngiger RNS
- 33 µg/ml einzelsträngigem Oligonukleotid.

Die Reinheit von DNS und RNS kann aus dem Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  abgeschätzt werden. Dieser Quotient soll über 1,7 liegen.

### **2.3.2 Präzipitation**

Nukleinsäuren wurden zur Aufkonzentrierung und Reinigung mit Ethanol gefällt (Sambrook et al., 1989). Dazu wurde der wässrigen DNS- bzw. RNS-Lösung 1/10 Volumen 5 M NaCl und 2,5 Volumen eiskalter Ethanol zugefügt. Sehr geringe Mengen an DNS wurden zusammen mit 5 µg tRNS durch Zugabe von einem ½ Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol quantitativ kopräzipitiert. Der Ansatz wurde 15 min bei -80 °C inkubiert, abzentrifugiert (12000 rpm, 15 min, 4 °C) und der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in wenig Wasser gelöst.

### **2.3.3 Phenol/Chloroform-Extraktion**

Durch Phenol/Chloroform-Extraktion werden Proteine (z.B. Enzyme) aus wässrigen Nukleinsäurelösungen entfernt. Die Nukleinsäurelösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, Roth) versetzt, 5 min lang kräftig geschüttelt und abzentrifugiert (12000 rpm, 5 min). Die wässrige Oberphase, in der sich die Nukleinsäuren befinden, wurde in ein neues Gefäß überführt und mit Chloroformextraktion von restlichen Phenolspuren befreit. Die Nukleinsäuren wurden mit Ethanol präzipitiert.

## **2.4 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden**

Die DNS-Oligonukleotide wurden mit einem „DNA Synthesizer 392A“ (Applied Biosystems) nach der Phosphoamidit-Methode hergestellt. In dieser automatisierten Festphasensynthese sind die Oligonukleotide kovalent an eine Glasmatrix gebunden und werden in 3'→5'-Richtung verlängert (Beaucage & Caruthers, 1981). Nach der Synthese wurde das Oligonukleotid durch alkalische Hydrolyse von der Trägermatrix gespalten und mittels Umkehr-Phasen-Chromatographie gereinigt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Das Trägermaterial der Synthesesäulen wurde mit konzentriertem Ammoniak versetzt und 15 h bei 55 °C inkubiert. Den Überstand verdünnte man mit Wasser und trug ihn auf eine OPC-Säule

(„Oligonucleotide Purification Cartridge“, Applied Biosystems), die mit Triethylammoniumacetat äquilibriert war, auf. Ein Waschschrift mit 3,2 % Ammoniak entfernte unvollständige Oligonukleotide aus vorzeitig abgebrochenen Synthesen. Die Gabe von 2 % Trifluoressigsäure spaltete die Tritylschutzgruppen des Oligonukleotids ab. Das Oligonukleotid wurde mit 20 % Acetonitril eluiert, in der SpeedVac getrocknet und in 500 µl Wasser gelöst. Die Ausbeute wurde photometrisch bestimmt und daraufhin eine Primerlösung mit einer Konzentration von 10 pmol/µl hergestellt.

Die Oligonukleotide wurden als Primer für die PCR oder zur Sequenzierung verwendet. Die Sequenzen und Bindungsstellen der einzelnen Primer sind im Anhang angegeben.

#### **2.4.1 Aneinanderlagerung und Phosphorylierung von Oligonukleotidsequenzen**

Oligonukleotide können mit gewünschter Sequenz z.B. mit benötigten Restriktionsschnittstellen hergestellt werden. Durch Aneinanderlagerung werden diese Oligonukleotide doppelsträngig gemacht und anschließend für Subklonierungen phosphoryliert.

Oligonukleotid 1 (2 µg) und Oligonukleotid 2 (2 µg) werden zusammenpipettiert. Der Reaktionsansatz wird mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 25 µl aufgefüllt und 5 min bei 75 °C inkubiert. Anschließend werden 1/10 Vol. Ligasepuffer (NEB) und 2 µl T<sub>4</sub>-Polynukleotidkinase (NEB) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wird 15 min bei 75 °C inaktiviert. Die Lösung lässt man anschließend in einem Becherglas langsam von 75 °C auf RT abkühlen. Die DNS wird mit Ethanol präzipitiert (2.3.2) und in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Die Konzentration der Lösung wurde photometrisch bestimmt (2.3.1). 300 ng wurden für die Ligation (2.7.4) in pUC18 eingesetzt.

### **2.5 Isolierung von P1 Plasmid-DNS**

#### **2.5.1 Kochschnelltest**

Bei dieser Schnellisolierung von Plasmid-DNS nach Holmes und Quigly (1981) werden die Bakterien durch Lysozym, Triton und Hitze aufgeschlossen.

Eine 7 ml LB-Bakterienkultur wurde durch Abzentrifugieren geerntet, das Bakterienpellet in STET-Puffer (8 % Saccharose, 5 % Triton-X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8,0) resuspendiert und in Anwesenheit von Lysozym (Roche) und RNase A kurz aufgekocht. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde die im Überstand befindliche Plasmid-DNS mit

Isopropanol gefällt. Die Ausbeute lag bei etwa 20 µg. 1/10 der Präparation wurde für eine Restriktionsanalyse (2.7.1) verwendet.

### 2.5.2 Alkalische Lyse mit Säulenchromatographie (Qiagen Kits)

Um größere Mengen an hochreiner Plasmid-DNS zu erhalten, wurde der „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) in Verbindung mit einer anschließenden chromatographischen Reinigung über eine Anionenaustauschersäule. Die Bakterien werden in NaOH/SDS lysiert, wobei Proteine und DNS-Moleküle denaturieren. RNase A verdaut die freigesetzten RNS-Moleküle. Durch anschließende Neutralisation mit Kaliumacetat renaturiert die relativ kleine Plasmid-DNS wieder und bleibt deshalb in Lösung, während das viel größere Bakterienchromosom denaturiert mit den übrigen Zelltrümmern, ausgefallenen Salzen und SDS abgetrennt werden kann. Die Bedingungen für den Auftrag auf die Säule und die Waschschriffe sind so gewählt, daß Proteine, Polysaccharide, RNS und andere Verunreinigungen quantitativ abgetrennt werden. Die eluierte Plasmid-DNS wurde gefällt, getrocknet, in 250 µl Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Mit Aliquots der DNS wurde die Konzentration photometrisch bestimmt und eine Restriktionsanalyse (2.7.1) durchgeführt.

### 2.5.3 Isolierung von P1 Plasmid-DNS

Die Isolierung der Plasmid-DNS beruht auf dem Prinzip der Alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Eine Vorkultur wird morgens in 7 ml LB-Medium, das 10 mg/ml Kanamycin (Kanamycin-Sulfat, Fa. Fluka) enthält, gestartet. Abends werden 100 ml Hauptkultur mit ungefähr 1 % der Vorkultur angeimpft. Die Zusammensetzung des Mediums der Hauptkultur entspricht dem LB-Medium (2.1.2), nur das 10 g statt 5 g NaCl pro Liter eingewogen werden. Die Hauptkultur wird ÜN bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterienkultur wird durch Abzentrifugieren (10 min; 3500 rpm) in 2 x 50 ml Röhrrchen (Falcon) geerntet. Der Überstand wird verworfen, die beiden Bakterienpellets werden jeweils in 0,9 ml TEG-Puffer (25 mM Tris pH 8,0, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Beide Bakteriensuspensionen werden in einem Corex-Röhrrchen vereinigt und mit 0,2 ml Lysozym (20 mg/ml) 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 4 ml einer frisch hergestellten alkalischen Lösung (0,2 N NaOH, 1% SDS) zugegeben. Das Röhrrchen wird leicht invertiert und 10 min auf Eis inkubiert. 3,2 ml einer 3 M Kaliumacetatlösung (pH 5,2) werden zugegeben. Die Lösungen werden durch leichtes Invertieren gemischt. Wieder folgt Inkubation auf Eis für 10 min Die Suspension wird mit 8000 rpm bei 4 °C 10 min im Rotor JS-13.1 (Beckmann) zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches Corex-Röhrrchen überführt und mit 25 µl RNase A (10 mg/ml) bei 37 °C 30 min inkubiert. Anschließend wird

die Lösung mit 1 Volumen Phenol/Chloroform ausgeschüttelt und 5 min mit 8000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wird erneut in ein Corex-Röhrchen überführt und mit 1 Volumen Isopropanol versetzt. Die DNS wird aus der Lösung durch Zentrifugieren (10.000 rpm, 4 °C, 30 min) pelletiert. Das Pellet wird mit eiskaltem 70 % Ethanol (5 ml) gewaschen und nochmal zentrifugiert (8000 rpm, 4 °C, 5 min). Anschließend wird das Pellet in der SpeeVac getrocknet und in 200 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die DNS-Lösung wird bei 4 °C gelagert.

## **2.6 Isolierung von genomischer DNS**

### **2.6.1 Isolierung von genomischer DNS aus Mausgewebe**

Um genomische DNS aus Mausgewebe zu isolieren, wurde der „Qiagen Genomic DNA Kit“ zur Hilfe genommen. 380 mg Mausleber wurden in tiefgefrorenem Zustand zerkleinert und in einem Lysepuffers, der u.a. Guanidiniumhydrochlorid, RNase A und Detergenzien enthielt, homogenisiert. Nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml) wurde das Homogenisat bei 50 °C inkubiert. Dabei wurden Zellen und Kerne lysiert, Proteine (wie Nukleasen und Histone) denaturiert und abgebaut. Nach etwa zwei Stunden war der Verdau abgeschlossen und die chromosomale DNS in genügendem Maße von gebundenen Proteinen befreit. Das Lysat wurde kurz gemischt und auf die äquilibrierte Chromatographiesäule (tip 500/G) aufgebracht. Zwei Waschschritte entfernten unerwünschte Verunreinigungen. Die DNS wurde mit auf 50 °C vorgewärmtem Puffer eluiert, mit Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (9000 rpm, 30 min, 4 °C, Rotor JS-13). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, in 400 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert und bei 4 °C gelagert. Die Ausbeute betrug ungefähr 0,5 mg.

### **2.6.2 Isolierung von genomischer DNS aus einem Teil des Mausschwanzes**

Ein kleiner Teil des Mausschwanzes wurde ÜN bei 55 °C in 750 µl Lysepuffer (100 mM Tris pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 mM NaCl, 1 mg ProteinaseK) verdaut. Am nächsten Tag wurde die Lösung 5 min zentrifugiert (12000 rpm), der Überstand wurde abgehoben. Die Lösung wurde nacheinander extrahiert mit 1 Vol. Phenol (Roth), 1 Vol. Phenol/ Chloroform und 1 Vol. Chloroform. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Lösung immer 5 min mit 12000 rpm zentrifugiert und die obere, wässrige Phase abgehoben. Zuletzt wurde die DNS mit 1 Vol. Isopropanol gefällt. Die DNS wurde mit 70% Ethanol gewaschen und im 37 °C Schrank getrocknet, bevor sie in ungefähr 200 µl H<sub>2</sub>O gelöst wurde. Die isolierte DNS wurde für Southern Hybridisierungen eingesetzt.

## **2.7 Enzymatische Modifikation von DNS**

### **2.7.1 Restriktionsenzyme**

Restriktionsendonukleasen bilden eine Klasse von bakteriellen Enzymen, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNS erkennen und spalten können. Die hier verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme spalten ihr DNS-Substrat innerhalb oder unmittelbar neben der meist palindromischen Erkennungssequenz. Bei der Spaltung entstehen entweder glatte Enden (blunt ends) oder einander komplementäre, 5'- bzw. 3'-überhängende (sticky ends). Die DNS-Enden besitzen immer eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe, was die spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden ermöglicht. Der Restriktionsansatz wurde bei optimaler Temperatur für 1,5 h (analytischer Ansatz) bzw. 3-8 h (präparativer Ansatz) inkubiert und danach gelelektrophoretisch untersucht.

Eine Einheit (1 U) Restriktionsendonukleaseaktivität entspricht der Menge an Enzym, die nötig ist, um 1 µg Test-DNS in einer Stunde unter optimalen Bedingungen vollständig zu schneiden.

### **2.7.2 Alkalische Phosphatase**

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = calf intestine phosphatase) spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen von DNS-Molekülen ab. Linearisierte Vektoren wurden dephosphoryliert, um einen intramolekularen Ringschluß während der Ligation zu verhindern und so die Klonierungseffizienz von Fremd-DNS zu erhöhen.

Das linearisierte Plasmid (etwa 5 pmol) wurde in 50 mM Tris pH 8,0 mit 1 U CIP (Roche) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms (10 min, 75 °C) konnte die Vektor-DNS isoliert werden.

### **2.7.3 Auffüllreaktion**

Um aus der PCR gewonnene DNS-Stücke klonieren zu können, wurden ihre Enden „glatt gemacht“, d. h. ihre Überhänge beseitigt und das 5'-Ende phosphoryliert. Die T4-DNS-Polymerase (NEB) katalysiert DNS-Aufbau in 5'→3'-Richtung und schneidet 3'-Überhänge ab. Die T4-Polynukleotidkinase (NEB) phosphoryliert ATP-abhängig das 5'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 0,1-1 µg eines DNS-Fragments wurden durch die beiden Enzyme aufgefüllt, phosphoryliert und konnten dann in das pUC18-Plasmid, das mit *SmaI* linearisiert



war, deshalb glatte Enden besaß und zudem dephosphoryliert vorlag (Pharmacia), ligiert werden.

#### 2.7.4 T4-DNS-Ligase

Die T4-DNS-Ligase (NEB) katalysiert ATP-abhängig die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende von doppelsträngiger DNS oder RNS. Als Substrat dienen sowohl überhängende als auch glatte Enden. Ligase, linearisierter Vektor und Fremd-DNS wurden in Ligasepuffer gemischt und für etwa 16 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend konnte das rekombinante Plasmid durch Transformation in *E. coli* (2.11.2) eingeschleust werden.

### 2.8 Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten

Nukleinsäuren sind negativ geladen und können deshalb im elektrischen Feld in einem Gel nach Masse aufgetrennt werden. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können die getrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht (302 nm) als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich diente ein DNS-Standard (1 kb Ladder, Gibco-BRL). Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren, wurden dem Auftragspuffer Farbmarker zugegeben. Bromphenolblau wandert etwa mit DNS-Fragmenten von 100-10 bp und markiert daher die Elektrophorese-Front. Xylencyanol wandert mit DNS-Fragmenten von circa 5 kb.

#### Lösungen:

##### 10x TBE:

Tris (USB)	0,9 M
Borsäure (Merck)	0,9 M
EDTA pH 8,0 (ICN)	20 mM

##### Elektrophoresepuffer:

1x TBE (1 Teil 10x TBE + 9 Teile H<sub>2</sub>O)

##### Auftragspuffer (6x dye):

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18 %
EDTA pH 8,0	0,12 mM
TBE	6x
Bromphenolblau (IBI)	0,15 %
Xylencyanol FF (Sigma)	0,15 %

##### Ethidiumbromidstammlösung:

10 mg/ml (Sigma), wässrig

### 2.8.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

DNS-Fragmente mit einer Größe von 50 - 1000 bp wurden durch vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Dafür wurden 5 %ige Polyacrylamidgele in 1x TBE als Laufpuffer (Sambrook et al., 1989) verwendet. Die Trennstrecke betrug 15 cm und die Dicke 0,75 mm (analytische Gele) bzw. 1,5 mm (präparative Gele).

#### **Zusammensetzung von 30 ml Polyacrylamidgel:**

Rothiphoresegel (Acrylamid / N,N'-Bisacrylamid = 29:1, 40%, Roth)	3,75 ml
10x TBE	3 ml
H <sub>2</sub> O	ad 30 ml
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin, Sigma)	35 µl
20 % APS (Ammoniumpersulfat, Sigma)	80 µl

Den DNS-Proben wurde vor dem Auftragen 1/6 Volumen Auftragspuffer zugegeben. Zum Einlaufen wurde eine Spannung von 110 V angelegt, zur Trennung schließlich für 1 h 270 V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5 min lang in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

### 2.8.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten im Bereich von 1 bis 12 kb wurde die horizontale Gelelektrophorese in Agarosegelen (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. 0,7 % (g/v) Agarose (Seakem LE, Biozym) wurden in 1x TBE im Mikrowellenherd aufgeschmolzen. Der Gellösung wurde vor dem Ausgießen in eine horizontale Kammer Ethidiumbromid zugegeben (finale Konzentration im Gel: 800 ng/ml). Die Elektrophorese erfolgte für 1-3 h bei konstanter Spannung von 100 V in einer Biorad-Elektrophoresekammer mit 1x TBE als Laufpuffer.

### 2.8.3 Field Inversion Gelectrophoresis (FIGE; Biorad)

Für die Restriktionskartierung der P1-Plasmidinserts wurde der FIGE-Mapper (Biorad) verwendet. Dieses System eignet sich zur Auftrennung größerer DNS Fragmente.

Die Entwicklung der „pulsed field electrophoresis“ erlaubt die Auftrennung von DNS Molekülen, die größer als 20 kb sind. Durch die pulsierende Veränderung des elektrischen Feldes zwischen räumlich getrennten Elektrodenpaaren können sich die großen DNS Fragmente re-orientieren und mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Poren in einem

Agarosegel wandern. Das FIGE Mapper System basiert auf einer „Field Inversion Gel Electrophoresis“ (FIGE). Die Umkehr des elektrischen Feldes (Polaritätsumkehr) verwendet hohe Spannungsgradienten und kurze Umschaltzeiten, die asymmetrisch sind. Die Dauer der Vorwärts-Zeit ist ungefähr dreimal so lang wie die Dauer der Rückwärts-Zeit. Dadurch können DNS Fragmente mit einer Größe von 100 bp bis 200 kb effektiv aufgetrennt werden.

**Durchführung:**

Die P1-Plasmid DNS wurde ÜN mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen gespalten (2.7.1). Die Restriktionsansätze wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Als Marker wurden der 1 kb-Ladder (Gibco-BRL) und der High Molecular Weight DNA Marker (HMW enthält DNS Fragmente von 8 bis 48 kb ; Gibco-BRL) verwendet.

Folgendes Programm wurde ausgewählt:

Fragmentauftrennung:	1 - 50 kb
Agarosegel:	1% ig
Puffer:	0,5X TBE
Temperatur:	RT
Umschaltzeit Modus; linear:	0,1 – 0,8 sec
Laufzeit:	16 h
Vorwärts Spannung:	180 V
Rückwärts Spannung:	120 V

**2.8.4 Elektroelution**

Um ein DNS-Fragment bestimmter Größe aus einem Gemisch isolieren zu können, wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt und die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Dieses Gelstück wurde mit 300 µl 1x TBE in einen Dialyseschlauch (Sigma) überführt und die DNS in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 140 mA auf Eis aus dem Gel eluiert. Nach etwa 1,5 h wurde die DNS durch Ethanol-fällung isoliert.

**2.9 Sequenzierung von Plasmid-DNS**

Die Sequenzanalyse von rekombinanter Plasmid-DNS erfolgte nach der von Sanger et al. (1977) entwickelten Didesoxy-Methode. Dabei synthetisiert eine DNS-Polymerase *in vitro* an einer einzelsträngigen Matrizen-DNS den komplementären Strang. In Anwesenheit von 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) kommt es zu Kettenabbrüchen, da das Fehlen der OH-Gruppe in 3'-Position eine Verlängerung verhindert. Bei sorgfältiger Wahl des

Verhältnisses zwischen dNTPs und ddNTPs, entsteht eine Mischung aus allen möglichen unterschiedlich langen DNS-Fragmenten. Die Fragmente wurden entweder durch den Einbau von  $^{35}\text{S}$ -dATP oder durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert und mit denaturierender PAGE oder mittels Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte entweder nach Autoradiographie oder Photodetektion.

### 2.9.1 Sequenzreaktion mit radioaktivmarkierten Nukleotiden ( $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -dATP)

#### **Denaturierung:**

Da für die Sequenzierung nach Sanger einzelsträngige DNS erforderlich ist, mußte die Plasmid-DNS denaturiert werden. Dazu wurden 8  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNS in 0,4 N NaOH inkubiert und gefällt. Das getrocknete DNS-Pellet konnte entweder sofort für die Sequenzreaktion eingesetzt oder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

#### **Auswahl der Primer:**

DNS-Polymerasen benötigen als Startpunkt für die Synthese einen kurzen Doppelstrangbereich. Aus diesem Grund wurden jeweils sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) mit einer Länge zwischen 17 bp und 25 bp synthetisiert, oder es wurden Universalprimer, die in unmittelbarer Nähe zur multiplen Klonierungsstelle der pUC oder pBluescript-Vektoren binden, verwendet.

#### **Sequenzierungsreaktion:**

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem „Sequenase® Version 2.0 Kit“ (USB) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Sequenase ist eine gentechnisch veränderte T7-DNS-Polymerase mit hoher Prozessivität und fehlender 3'-5'-Exonuklease-Aktivität.

Nach Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNS wurden die wachsenden DNS-Stränge mit  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -dATP markiert und mit jeweils einem der vier ddNTPs terminiert. Nach Abstoppen der Reaktion konnten die Proben sofort auf das Gel aufgetragen oder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

#### **Denaturierende PAGE und Autoradiographie:**

Die DNS-Fragmente wurden unter denaturierenden Bedingungen in vertikalen Polyacrylamid-Harnstoffgelen (0,4 mm Dicke, 20 cm Breite, 40 cm Höhe) aufgetrennt und anschließend durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

#### **50 ml Sequenziergellösung:**

Harnstoff	21 g
Rothphoresegellösung (29:1, 40%, Roth)	7,5 ml

10x TBE	5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml
TEMED	44 µl
20 % APS	100 µl

Das Gel ließ man etwa 30 min bei 25 W vorlaufen, um eine optimale Temperatur von ungefähr 50 °C zu erreichen. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Unmittelbar vor dem Auftragen wurden die vier Terminationsansätze für 3 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 W für 1,5-2 h und nach einem zweiten Auftrag noch einmal so lang. Sobald die Lauffront des letzten Auftrages die Unterkante des Gels erreicht hat, wurde das Gel auf ein Filterpapier (Schleicher & Schüll, GB 003) überführt und für 2 h unter Vakuum bei 80°C getrocknet.

### **Autoradiographie:**

Zur Autoradiographie wurde das trockene Gel in eine Filmkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm bedeckt. Nach 16-30 h wurde das Autoradiogramm entwickelt. Mit zwei Aufträgen konnten etwa 200-350 Basen der Sequenz gelesen werden.

### **Beseitigung von Kompressionen**

Gelegentlich wandern unterschiedlich lange DNS-Fragmente aufgrund sich ausbildender Sekundärstrukturen im Gel auf gleicher Höhe, es entstehen sogenannte Kompressionszonen. Diese Zonen können meist aufgelöst werden, indem man dGTP durch deaza-dGTP oder dITP im Reaktionsansatz ersetzt.

## **2.9.2 Automatische Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese mit fluoreszenzmarkierten Terminatoren**

Einige DNS-Fragmente wurden nicht radioaktiv, sondern mit Hilfe eines Sequenzierautomaten sequenziert.

Die unterschiedlich langen DNS-Fragmente wurden durch den Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen markiert und in der Kapillare des ABI Prism<sup>TM</sup> Sequence-Analyzer (Perkin Elmer) ihrer Größe nach aufgetrennt. Es konnten Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin in einem Ansatz sequenziert werden, weil jede der vier Basen mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert war. Der Laserdetektor des Sequence-Analyzers bestimmte die jeweilige fluoreszierende Wellenlänge. Aus den Rohdaten des Lasers errechnete ein Macintosh-Computer (Multiscan 100ES, Sony) die DNS-Sequenz.

Für die Sequenzreaktionen, um unterschiedlich lange, fluoreszierende DNS-Fragmente zu synthetisieren, wurde folgendes Standardprotokoll verwendet. Die einzusetzende DNS Menge variierte je nach Herkunft.

**DNS Menge:**

DNS aus Kochschnelltest	1 $\mu$ l
DNS aus Maxi-Präparation	0,5 $\mu$ g
DNS aus PCR	30 – 90 ng

**Reaktionsmix für Terminator Cycle Sequencing:**

Terminator Ready Reaction Mix (Perkin Elmer)	4 $\mu$ l
Primer [0,8 pmol/ $\mu$ l]	4 $\mu$ l
DNS (30 - 500 ng)	x $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l

Die vier verschiedenen ddNTPs, die bei einer jeweils anderen Wellenlänge fluoreszierten (ddGTP: 540nm, ddATP: 570nm, ddTTP: 600nm, ddCTP: 630nm) waren in dem Ready-Reaction Mix enthalten. Der Ansatz der Sequenzreaktion wurde kurz gemixt, mit 40 $\mu$ l Öl überschichtet und in dem Thermozykler (Omni Gene HB-TR 3) von Hybaid amplifiziert oder ohne Öl in dem Biometra-Gerät amplifiziert. Zunächst wurde die DNS für 2 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden 25 Zyklen durchgeführt, die ähnlich wie bei der PCR aus einer Denaturierungs-, einer Annealings- und einer Elongationsphase bestanden:

95 °C	30 sec	(Denaturierung)
50 °C	40 sec	(Primer Anlagerung)
60 °C	4 min	(Elongation)

Da nur ein Primer zugegeben wurde, fand bei dieser Sequenzreaktion nur eine lineare Vermehrung der DNS-Matrize statt und nicht wie bei der PCR eine exponentielle Amplifikation.

**Reinigung des Sequenzierungsproduktes:**

Das Produkt der Sequenzierungsreaktion wurde mittels einer Säule (CentiSep Colum, Perkin Elmer) von den überflüssigen fluoreszierenden Nukleotiden gereinigt. Die Säulen wurden mit 800  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, so dass das Säulenmaterial quellen konnte. Anschließend ließ man das Wasser aus der Säule ca. 5 min abtropfen. Um das überschüssige Wasser abzutrennen, wurde die Säule für 1,5 min bei 525 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Produkt der Sequenzreaktion auf die Säule pipettiert und wieder für 1,5 min bei 525 x g zentrifugiert. In einem Gefäß unter der Säule wurde die gereinigte DNS aufgefangen und anschließend für 15 – 30 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in 20 $\mu$ l Template Suppression Reagent (Perkin Elmer) resuspendiert, für 3 min bei 95°C denaturiert und in den Sequencer ABI Prism<sup>TM</sup> gestellt. Der Sequencer zog die Lösung automatisch in eine, mit Polymer (Perkin Elmer) gefüllte, Kapillare. Durch die

angelegte Spannung von 12,2 kV wanderten die DNS-Fragmente in 5'→3'-Richtung auf den Laserdetektor zu. Aus der Abfolge der von dem Laserdetektor bestimmten Farbsignale errechnete der Multiscan 100ES Computer die vorliegende Nukleotidsequenz.

## **2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist ein *In vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifikation von definierten Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Zwei Oligonukleotid-Primer sind erforderlich, die spezifisch an den kodierenden bzw. an den nicht-kodierenden Strang einer zumindest teilweise bekannten DNS-Sequenz binden. Die DNS-Matrize wird durch Hitzedenaturierung (94°C) zunächst aufgeschmolzen. Danach können die Primer, die in großem molaren Überschuss vorliegen, an ihre entsprechende Zielsequenz binden (Primer-Annealing, 45-60°C). Ausgehend von diesem kurzen doppelsträngigen Bereich wird der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'→3'-Richtung synthetisiert (Elongation, 72°C). Nach erneutem Aufschmelzen der DNS und Primer-Annealing arbeitet die hitzestabile DNS-Polymerase wieder weiter. Mit jedem Zyklus kommt es im Idealfall zu einer Verdoppelung der DNS und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierten DNS-Sequenz. Theoretisch entstehen bei n Zyklen  $2^{n-1}$  amplifizierte Moleküle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zu mehreren Zwecken durchgeführt:

- zum Nachweis bestimmter Transkripte (Exons) in der cDNA verschiedener Gewebe,
- zur Amplifikation von DNS-Fragmenten, die zur Herstellung von Gensonden eingesetzt wurden,
- zur Aufklärung der Intron/Exon-Organisation des  $\alpha_{1C}$  Gens,
- zur Genotypisierung genetisch veränderter Mäuse.

Als Template-DNS dienten Plasmid-DNS, cDNA und genomische DNS aus verschiedenen Geweben adulter oder embryonaler Mäuse. Die wichtigsten Primerpaare, mit denen DNS Fragmente des  $\alpha_{1C}$  Gens aus der Maus amplifiziert wurden, sind in Tabelle 2-2 angegeben.

### 2.10.1 Verschiedene PCR Protokolle

Die PCR wurde in einem Thermo Cycler (Omni Gene HB-TR 3) von Hybaid oder (UNO-Thermoblock; UNO II) von Biometra durchgeführt. Als thermostabile Polymerase wurde die *Taq* DNS-Polymerase von Roche verwendet. Als Ausgangs-DNS wurden entweder 10-20 ng Plasmid-DNS, 10 ng oligo(dT)-primed cDNA oder 100 - 250 ng genomische DNS eingesetzt. Es wurden verschiedene PCR Protokolle durchgeführt.

Zunächst wurde der Reaktionsansatz zusammenpipettiert. Sofern das PCR Gerät der Firma Hybaid verwendet wurde, wurde der Ansatz mit Öl überschichtet, um das Volumen des Reaktionsansatzes konstant zu halten. Bei Verwendung des Biometra Gerätes ist eine Überschichtung mit Öl nicht nötig, da das Gerät eine Deckelheizung besitzt. Dadurch wird die Kondensation des Reaktionsansatzes verhindert.

#### 10x PCR-Puffer (Roche):

Tris/HCl pH 8,3	100 mM
KCl	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM

#### Taq-Polymerase (Roche) (5 U/μl)

<b>dNTPs (Roth)</b>	1,25 mM
dGTP (100 mM)	10 μl
dATP (100 mM)	10 μl
dTTP (100 mM)	10 μl
dCTP (100 mM)	10 μl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 800 μl

#### Reaktionsansatz für Standard PCR:

Primer A (10 pmol/μl)	2,5 μl
Primer B (10 pmol/μl)	2,5 μl
dNTPs (1,25 nmol)	8 μl
10xPCR-Puffer	5 μl
DNS	10 – 250 ng
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/μl)	0,5 μl
H <sub>2</sub> O	ad 50 μl



Tabelle 2-1 Dauer und Temperatur der einzelnen Reaktionsschritte einer Polymerasekettenreaktion.

Phase	Initiale Denaturierung	Zyklus Nr. 1-40 (bzw. 1-30)	Verlängerung (Extension)
Denaturierung	94 °C, 1,5 min - 5 min	94 °C, 1 min	72 °C, 5 min
Primer-Anlagerung (Annealing)		45-65 °C, 1 min	
Polymerisation (Elongation)		72 °C, 30 sec - 2 min	

Für das Genotypisieren der Mäuse wurden ausschließlich die Biometra Geräte (UNO-Thermoblock, UNO II) verwendet. Aufgrund der großen Anzahl an Reaktionen, wurde das Reaktionsvolumen auf die Hälfte reduziert. Die Konzentrationen der einzelnen Lösungen und das PCR Protokoll blieben unverändert.

#### **Touch Down:**

Der Unterschied zur Standard-PCR liegt in der Annealingtemperatur. Der Reaktionsansatz wird zusammenpipettiert und bei 95 °C denaturiert. Anschließend laufen 11 Zyklen ab, bei denen sich die Annealingtemperatur pro Zyklus um 1 °C verringert. Nach den 11 Zyklen ist eine Annealingtemperatur von 55 °C erreicht, jetzt starten 29 Zyklen mit gleichbleibender Annealingtemperatur (55 °C). Mit dieser PCR Methode werden spezifische PCR Produkte angereichert, das Auftreten unspezifischer Produkte wird durch die anfangs höhere Annealingtemperatur verringert.

#### **Hot Start (für PCR von genomischer DNS):**

Der Reaktionsansatz wurde bei 94 °C für 5 min denaturiert. Bis zur Zugabe des Enzymmixes wurde der Ansatz auf 80 °C gehalten (→ hot start). Nach Zugabe des Enzymmixes begannen die Zyklen mit Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisation, wie in **Tabelle 2-1** angegeben. Die so erhaltenen PCR-Produkte hatten eine Größe zwischen 150 und 1500 bp.

#### **Enzymmix:**

Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
10x PCR-Puffer	0,5 µl
dNTPs (je 1,25 mM, Roth)	4,0 µl

#### **Reaktionsansatz:**

Primer A (10 pmol/µl)	2,5 µl
-----------------------	--------

Primer B (10 pmol/μl)	2,5 μl
dNTPs (1,25mM)	4 μl
10x PCR-Puffer	4,5 μl
DNS	10 – 250 ng
H <sub>2</sub> O	ad 45 μl

Tabelle 2-2 Primerpaare, die zur PCR-Amplifizierung von Abschnitten des  $\alpha_{1c}$  Gens verwendet wurden. Die Größen der gewonnenen DNS-Fragmente sind angegeben. Die genauen Sequenzen und Bindungsstellen der Primer sind im Anhang aufgeführt. Die Sequenzen basieren auf der von Ma veröffentlichten cDNA Sequenz (1992). Die verwendete DNS war unterschiedlich: P1-Plasmid, genomische DNS oder cDNA.

Primerpaar	amplifizierte Sequenz	Größe [bp]
VS3 / VS4	Exon 3	106 bp
VS1 / VS2	Exon 4	140 bp
CSIII / VS 4	Exons 2 und 3 (cDNA)	428 bp
VS2 / VS3	Exons 3 und 4 (cDNA)	246 bp
VS1 / VS5	Exons 4 und 5 (cDNA)	280 bp
VS7 / VS8	Exon 7	197 bp
VS15 / VS20	Exon12	161 bp
VS9 / VS10	Exon 13	226 bp
VS11 / VS12	Exon 14	208 bp
VS17 / VS16	Exon 15	121 bp
VS19 / VS18	Exon 16	115 bp
VS9 / VS13	Exons 13 bis 17 (cDNA)	791 bp
VS14 / VS8	Exons 6 und 7	355 bp
VS15 / VS10	Exons 12 und 13	387 bp
VS11 / VS16	Exons 14 und 15	329 bp
VS15/ VS10	Exons 12 bis 13 mit Intron (P1-Plasmid)	1,5 kb
VS11 / VS16	Exons 14 bis 15 mit Intron (P1-Plasmid)	1 kb
VS17 / VS18	Exons 15 bis 16 mit Intron (P1-Plasmid)	2 kb
VS19 / VS13	Exons 16 bis 17 mit Intron (P1-Plasmid)	0,9 kb
VI4 / VI10	Intronsequenz	415 bp

Tabelle 2-3 Primerpaare, die ebenfalls zur PCR-Amplifizierung eingesetzt wurden.

Primerpaar	amplifizierte Sequenz	Größe [bp]
VI9 / TK1	3'Ende des Tk-Gens und loxP Sequenz in Neo/Tk Kasette	263 bp
Neo1 / VI11	5' Bereich des Neo <sup>R</sup> -Gens und loxP Seite in Neo/Tk Kasette	200 bp

P11 / P12	loxP Sequenz aus Plasmid pBSloxP3	125 bp
-----------	--------------------------------------	--------

### 2.10.2 Long Template PCR

Zur Aufklärung der genomischen Organisation des  $\alpha_{1C}$  Gens wurden lange DNS-Fragmente, die komplette Introns enthielten, amplifiziert und analysiert. Für diese PCR, bei der genomische DNS der Maus als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde, wurde das „Expand™ Long Template PCR System“ von Roche zur Hilfe genommen. Mit diesem Kit, der die thermostabile *Taq* und *Pwo* DNS-Polymerase enthält, können DNS-Fragmente bis zu einer Größe von 27 kb aus genomischer DNS amplifiziert werden. Die Vorgehensweise entsprach der Standard-PCR.

#### Reaktionsansatz:

Primer A (10 pmol/ $\mu$ l)	2,5 $\mu$ l
Primer B (10 pmol/ $\mu$ l)	2,5 $\mu$ l
10x PCR-Puffer (1, 2, 3)	4,0 $\mu$ l
dNTPs (je 1,25 mM)	14,0 $\mu$ l
DNS (200 ng)	2,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 40,0 $\mu$ l

#### Enzymmix:

<i>Taq</i> + <i>Pwo</i> (3,5 U/ $\mu$ l)	0,75 $\mu$ l
10x PCR-Puffer (1, 2, 3)	1,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	8,25 $\mu$ l

Tabelle 2-4 Die einzelnen Reaktionsschritte einer Long Template Polymerasekettenreaktion.

Phase	Initiale Denaturierung	Zyklus Nr.1-10	Zyklus Nr.11-40	Verlängerung (Extension)
Denaturierung	94 °C, 2 min	93 °C, 0,5 min	93 °C, 0,5 min	
Primer-Anlagerung		57 °C, 1 min	57 °C, 1 min	
Polymerisation		68 °C, 4 min	68 °C, 4 min + 10 sec zusätzlich pro Zyklus	72 °C, 5 min

## 2.11 Transformation von Bakterien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kompetente Zellen mit verschiedenen Plasmiden transformiert.

### 2.11.1 Präparation von kompetenten Bakterienzellen

Als kompetente Zellen bezeichnet man bakterielle Zellen, die in der Lage sind, exogene DNS ins Zellinnere aufzunehmen. Hier wurden die *E. coli* Bakterien durch kurzfristige Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) empfänglich gemacht. Man beimpfte 100 ml LB(-)-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur ausgehend von einer frischen Einzelkolonie von *E. coli* XL1-blue. Sobald eine  $OD_{600}$  von 0,35 bis 0,38 erreicht war, wurde die Kultur abgekühlt und abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15 ml 1xTTS resuspendiert, aliquotiert (500  $\mu$ l), schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 1x TTS (Transformation and Storage Solution)

PEG (Polyethylenglykol) 3350	12,5 ml
1 M $MgCl_2$	2,5 ml
100 % DMSO	2,5 ml
LB-Medium	ad 50 ml

Um sogenannte elektrokompetente Zellen zu gewinnen, ließ man eine XL1-blue-Kultur bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 wachsen und zentrifugierte dann ab. Zur Minimierung der elektrischen Leitfähigkeit der Bakteriensuspension wurde das Zellpellet mehrmals mit Wasser und 10 % Glycerol gewaschen, schließlich in 10 % Glycerol resuspendiert, zu je 100  $\mu$ l aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

### 2.11.2 Transformation von *E. coli*

Die Einschleusung von Fremd-DNS in Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Bei geeignetem Selektionsdruck (Antibiotika) wird ein so in die Zelle eingeschleustes Plasmid stabil auf die Tochterzellen vererbt.

Die kompetenten Bakterienzellen wurden in Eiswasser aufgetaut, zu dem Ligationsansatz (2.7.4) dazu pipettiert und zur Aufnahme der DNS auf Eis gestellt. Nach einer Erholungsphase von 1 Stunde in LB-Medium bei 37 °C, wurde die Bakteriensuspension auf Ampicillin-Agarplatten (für Blau-Weiß-Selektion: X-Gal-Platten) ausplattiert und bei 37°C

inkubiert. Die erhaltenen Klone konnten mittels Kochschnelltest (2.5.1) auf Anwesenheit des rekombinanten Plasmids geprüft werden.

### **Elektroporation:**

Die Zellmembran von Bakterien wird außerdem durch Anlegen von Hochspannung für DNS-Moleküle durchlässig. Diese Art der Transformation ist umständlicher, aber effektiver als die oben beschriebene Methode und wurde bei schwierigen Klonierungen angewandt. Die elektrokompenten Zellen wurden mit etwa 10 ng der rekombinanten Plasmid-DNS (2.7.4) gemischt und in eine gekühlte Küvette pipettiert. Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser und Gene Controller von BioRad mit folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt: Spannung: 2,5 kV; Kapazität: 25  $\mu$ F; Widerstand: 200  $\Omega$ . Nach der Transformation wurden die Bakterien in SOC(+)-Medium (2.1.2) für 50 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde ein Aliquot zur Titerbestimmung ausplattiert und der Rest in 20 % Glycerol bei -80 °C eingefroren.

## **2.12 Herstellung <sup>32</sup>P-markierter DNS-Gensonden**

Um <sup>32</sup>P-markierte DNS-Gensonden zu erhalten, wurde der „Random primed Labeling Kit“ (Roche) verwendet. Das als Matrize eingesetzte DNS-Fragment stammte aus einer PCR oder war durch Restriktionsenzyme aus Plasmid-DNS geschnitten worden. Ein Gemisch aus allen möglichen Hexanukleotiden wurde als „random“-Primer genutzt (Feinberg & Vogelstein 1983), die an die Matrizen-DNS banden und an deren 3'-Ende die Synthese des komplementären Stranges durch das Klenow-Enzym begann. <sup>32</sup>P-markiertes dCTP wurde in den Strang eingebaut. Nach Abschluß der Reaktion mußten überschüssige, nicht eingebaute Desoxyribonukleosidtriphosphate durch Säulenchromatographie an einer Nick™ Column (Pharmacia) entfernt werden. Die gereinigte Probe wurde mit TE-Puffer von der Säule eluiert und ihre spezifische Aktivität mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

### **TE-Puffer**

1 M Tris pH 8,0	10 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	2 ml
H <sub>2</sub> O	1000 ml

## **2.13 Southern Hybridisierung**

Der Name dieser Methode leitet sich von seinem Erfinder Edwin Southern ab (Southern 1975). Hierbei werden DNS-Fragmente, die gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine

geeignete Trägermembran übertragen und dort immobilisiert. Bei dem Transfer der Nucleinsäuren von dem Gel auf die Membran bleibt das Trennmuster der Banden erhalten, d. h., die Membran ist eine Kopie des ursprünglichen Gels. Dieser Southern Blot wird mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Probe hybridisiert. Durch anschließende Autoradiographie können die Banden, die komplementär zur radioaktiven Probe waren, detektiert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Southern Analysen durchgeführt:

- Zur Restriktionskartierung und Aufklärung der genomischen Organisation in einem Teil des  $\alpha_{1C}$  Gens. Die verwendete DNS stammte aus P1-Plasmiden, die einen Teil des  $\alpha_{1C}$  Gens der Maus enthielten und aus Mausleber.
- Zum Screening rekombinanter ES Zellklone.

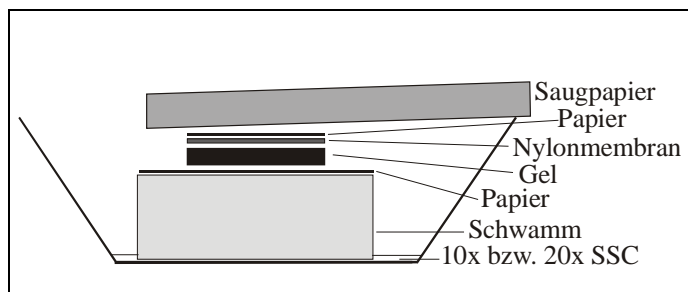


Abbildung 2-1 Aufbau eines Southern Blots

Nach Elektrophorese der mittels Restriktionsenzymen gespaltenen DNS wurde das Agarosegel (2.8.2) in 0,2 N Salzsäure geschwenkt. Dieser Schritt führte zur partiellen Depurinierung der DNS Fragmente, wodurch Strangbrüche entstanden. Diese Längenreduktion verbesserte den Transfer von langen Molekülen. Anschließend wurde das Gel für 30 min in 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl inkubiert, um die DNS zu denaturieren. Nach einem Neutralisationsschritt in 0,5 M Tris (pH 8,0), 3 M NaCl konnte mit dem Blottingverfahren begonnen werden. Hierbei wurde das Gel auf einen, mit 10x SSC getränkten, Schwamm gelegt und mit zugeschnittener Nylonmembran (Hybond<sup>TM</sup>-N, Amersham) bedeckt (siehe **Abbildung 2-1**). Ein Stapel mit Saugpapier sorgte für die Kapillarkräfte, die den SSC-Puffer durch das Gel nach oben saugten. Dabei wanderten die Nucleinsäure-Moleküle mit und blieben in der Nylonmembran hängen. Der Transferprozess wurde nach 15 - 18 Stunden abgebrochen, der Filter mit UV-Licht bestrahlt und bei 80 °C für 2 Stunden gebacken. Nach dieser Behandlung war die DNS kovalent an die Aminogruppen des Nylonfilters gebunden.

**Hybridisierung:**

Es wurden zwei Hybridisierungsverfahren angewendet: Hybridisierung im Hybridisierungsbeutel (Gibco-BRL) und Hybridisierung im Hybridisierungssofen (Mini Oven MKII; MWG-Biotech).

Die Membran mit der immobilisierten DNS wurde mitsamt 1 ml Churchpuffer pro 5 cm<sup>2</sup> Membran in einem Hybridisierungsbeutel (Gibco-BRL) eingeschweißt und im Wasserbad für 3 h bei 60 °C inkubiert. Hybridisiert wurde bei der gleichen Temperatur über Nacht in frischem Churchpuffer, dem die <sup>32</sup>P-markierte Gensonde mit einer Aktivität von 5x10<sup>6</sup> cpm/ml hinzugefügt wurde.

Die Hybridisierung der ES-Zell DNS erfolgte in Hybridisierungsrollen im Hybridisierungssofen. Die Vorteile dieses Verfahrens sind der Einsatz einer geringeren Menge Hybridisierungslösung und dementsprechend auch weniger Sonde. Die Membranen wurden ebenfalls 3 h bei 60 °C prähybridisiert und ÜN bei gleichbleibender Temperatur mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde unspezifisch gebundene und überschüssige Gensonde in folgenden Waschschrritten von der Membran entfernt:

- 15 min in 2x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei 60 °C,
- 30 min in 0,4x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei 65 °C,
- 40 min in 0,4x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei 68 °C.

Auf die Membran wurde ungefähr 4 h lang eine Phosphor Imager Platte aufgelegt, die anschließend an einem entsprechenden Gerät (FUJIFILM, BAS-1500) eingescannt und mit geeigneter Software (BAS Reader, TINA) verarbeitet wurde. Auf die Membran wurde zusätzlich ein Film (Hyperfilm, Amersham) aufgelegt und zwischen zwei signalverstärkenden Folien in einer lichtdichten Kassette 16 h bis 4 Tage bei -80 °C gelagert. Die DNS-Fragmente, die mit der Gensonde hybridisiert hatten, konnten anhand der Schwärzung auf dem eingescannten Bild oder des Films identifiziert werden.

**Churchpuffer:**

NaPhosphat-Puffer, pH 7,4	0,5 M
BSA (Sigma)	1 %
SDS	7 %
EDTA pH 8,0	1 mM
ssDNA (Sigma)	0,1 mg/ml
(= Lachssperm-DNS)	

**10 % SDS**

Natriumdodecylsulfat	50 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

**20x SSC**

NaCl	175,3 g
Na <sub>3</sub> Citrat*2 H <sub>2</sub> O	88,2 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
hat ≈ pH 7,0	

**NaPhosphat-Puffer, pH 7,4**

1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	387 ml
1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	113 ml

Tabelle 2-5 Primerpaare, die zur Gewinnung von Exonsonden für Southern Hybridisierungen verwendet wurden. Die genauen Sequenzen und Bindungsstellen der Oligonukleotide innerhalb des  $\alpha_1$ -Gens sind in Anhang nachzulesen.

Primerpaar	Gensonde	Größe [bp]
VS7 / VS8	Exon 7	197 bp
VS9 / VS10	Exon 13	226 bp
VS11 / VS12	Exon 14	208 bp
VS17 / VS16	Exon 15	121 bp
VS19 / VS18	Exon 16	115 bp
VS 14 / VS8	Exons 6 + 7	356 bp
VS15 / VS10	Exons 12 + 13	387 bp
VS11 / VS16	Exons 14 + 15	329 bp

Weitere Sonden, die für Southern Hybridisierungen eingesetzt wurden:

- Zusätzlich zu den Exonsonden wurde für die Restriktionskartierung ein Fragment des Introns 14 als Sonde verwendet, das mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III hergestellt wurde.
- Die 5' und die 3' Sonde, die zur Analyse der rekombinierten ES Zellklone nach dem Targeting verwendet wurden, wurden nach Restriktionsspaltung subkloniert. Die 5' Sonde (1,3 kb) wurde über die Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Cla*I in pBluescript subkloniert, die 3' Sonde (1,4 kb) wurde über *Eco*RI und *Hind*III in pUC18 subkloniert.

**2.14 Isolierung und Analyse von RNS aus eukaryotischen Zellen**

Bei Arbeiten mit RNS ist darauf zu achten, daß eine Kontamination der RNS-haltigen Lösung mit Ribonukleasen ausgeschlossen wird oder die Aktivität der anwesenden RNasen minimiert



wird. RNasen sind sehr stabile Proteine, die selbst Abkochen unbeschadet überstehen. Sie werden aber in Anwesenheit von z.B. Guanidiniumisothiocyanat und reduzierenden Agentien wie  $\beta$ -Mercaptoethanol inaktiviert (Chirgwin et al. 1979). Alle verwendeten Glaswaren, Pinzetten, Magnetrührstäbchen, etc. wurden zur RNase-Dekontamination für mindestens fünf Stunden bei 250 °C gebacken.

### **2.14.1 Isolierung von Gesamt- RNS**

Zur Isolierung von Gesamt-RNS aus verschiedenen Geweben wurde das TRIZOL LS Reagenz von Gibco-BRL verwendet. Das frisch präparierte oder bei -80 °C gelagerte Gewebe wurde zunächst in Guanidiniumisothiocyanat-haltiger Lösung homogenisiert. Nach Durchmischung mit Phenol und Chloroform wurde durch Zentrifugation eine Phasentrennung erzielt. Die ausschließlich in der wässrigen Phase verbleibende RNS wurde mit Isopropanol gefällt, mit 75 %igem Ethanol gewaschen, in RNase-freiem Wasser ( $H_2O_{DEPC}$ , siehe 2.20) gelöst und bei -80 °C aufbewahrt. Die Ausbeute betrug in etwa 0,5 bis 1,0  $\mu$ g Gesamt-RNS pro 1 mg Gewebe. Die auf diese Weise gewonnene Gesamt- RNS wurde zur Herstellung von cDNA verwendet.

### **2.14.2 Synthese von einzelsträngiger cDNA**

Um aus Boten-RNS komplementäre DNS zu erhalten, wurde die Superscript II Reverse Transkriptase von Gibco-BRL verwendet. Dabei handelt es sich um eine RNS-abhängige DNS-Polymerase. Nach Zugabe von oligo(dT)-Primern zur RNS-Lösung bildeten sich aus den poly(A)-Schwänzen der Boten-RNS-Moleküle und den Primern doppelsträngige Bereiche aus, an denen die Reverse Transkriptase in Anwesenheit von Desoxyribonukleosid-Triphosphaten mit der Synthese des ersten cDNA-Stranges beginnen konnte. Die Polymerase wurde nach Abschluß der Reaktion hitzeinaktiviert, und der RNS-Anteil aus dem gebildeten RNS/DNS-Hybrid durch Behandlung mit RNase H entfernt. Die so synthetisierte cDNA wurde für verschiedene PCR Ansätze eingesetzt.

## **2.15 Transiente Transfektion von COS Zellen mit $CaPO_4$ -Präzipitation**

Zur Überprüfung der Funktionalität der in den Targeting Vektor eingesetzten loxP Sequenzen, wurde der Targeting Vektor zusammen mit einem Cre-exprimierenden Plasmid in COS-7 Zellen (Kidney, African green monkey) transfiziert. Anschließend wurde aus den COS-Zellen die Plasmid-DNS isoliert und mittels PCR (2.10.1) analysiert.

**Lösungen:**

2 M CaCl<sub>2</sub>  
2 x HBS, pH 7,12:  
280 mM NaCl  
50 mM Hepes  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**Medium:**

378,0 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
22,0 ml	NaHCO <sub>3</sub>
9,0 ml	Glutamin
0,45 ml	Natriumpyruvat
50,0 ml	FBS
5,0 ml	Pen. / Strep.
44,0 ml	10 x DMEM

COS-7 Zellen wurden ungefähr 24 Stunden vor der Transfektion auf Petrischalen verteilt (ungefähr  $3 \times 10^5$  Zellen pro Petrischale). Für zwei Transfektionsansätze wurden in zwei 4,8 ml Kryoröhrchen (Nunc) je 480 µl 2 x HBS vorgelegt. In einem 1,8 ml Kryoröhrchen wurden für den Kontrollansatz 10 µg des Targeting Vektors und 10 µg Carrier-DNS (pUC18) zusammenpipettiert, für den zweiten Ansatz 10 µg des Targeting Vektors, 5 µg pUC18 und 5 µg eines Cre-exprimierenden Plasmids. Beide Ansätze wurden mit Wasser ad 420 µl aufgefüllt, anschließend wurden 60 µl CaCl<sub>2</sub> tröpfchenweise zu den DNS-Lösungen zugegeben. Beide Lösungen wurden dann ebenfalls tröpfchenweise zu dem vorgelegten HBS dazugegeben und zwischendurch vorsichtig gemischt. Die Lösungen wurden 15 min bei RT inkubiert, durch Vortexen gemischt und weitere 15 min bei RT inkubiert, bevor sie zu den COS-Zellen in die Petrischalen getropft wurden. Die Zellen wurden ÜN bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 17 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und in frischem Medium zwei weitere Tage bei 37 °C und 6% CO<sub>2</sub> inkubiert.

**Ernte der Zellen und Isolierung der Plasmid-DNS aus COS-Zellen:**

0,5 ml Trypsin/ EDTA (Gibco-BRL) wurden auf den Zellrasen pipettiert. Die Suspension wurde bei 37 °C inkubiert, in ein Eppendorf-Cap überführt und mit 3000 rpm 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 200 µl verworfen und das Pellet darin resuspendiert. 20 µl Quick Digest Puffer (50 mM Tris pH 8,0, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS, ProteinaseK 1 mg/ml) wurden in ein Cap vorgelegt und 5 µl der Zellsuspension dazugegeben. Die Lösung wurde zweimal 15 min bei 55°C inkubiert und zwischendurch durch

Vortexen gemischt. Zum Schluss wurden 180 µl H<sub>2</sub>O dazugegeben und die Lösung 5 min bei 95 °C gekocht. 1 µl der Lösung wurde für die PCR eingesetzt.

## **2.16 Zellkultur embryonaler Stammzellen**

Embryonale Fibroblasten (Feederzellen) sind für die Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES Zellen) notwendig. Die Feederzellen werden als einschichtiger Zellrasen ausgesät und bieten den ES Zellen die Möglichkeit auf ihnen zu wachsen, indem sie die ES Zellen mit wichtigen Nährstoffen versorgen und durch Abgabe bestimmter, bisher nicht aufgeklärter Stoffe eine Differenzierung der ES Zellen verhindern. D.h. die ES Zellen bleiben während der Kultivierung pluripotent. Für die später folgende Selektion rekombinanter ES Zellen mit Neomycin müssen die Feederzellen ein Neomycinresistenzgen besitzen, um den Selektionsschritt zu überleben und die ES Zellen weiter mit Nährstoffen versorgen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde folgendermaßen vorgegangen, um Neomycin-resistente Feederzellen herzustellen. Es wurde ein Männchen mit dem Genotyp CNG3 (-/-) (freundlicherweise von Herrn Prof. M. Biel zur Verfügung gestellt) mit einem C57Bl/6 Weibchen (WT) verpaart. Das CNG3 Gen des Männchens wurde durch Insertion eines Neomycinresistenzgens zerstört. Das Männchen war homozygot für diesen Gendefekt und demzufolge ebenfalls homozygot für die Neomycinresistenz. Eine Verpaarung mit einem WT Weibchen führte in jedem Fall zu heterozygoten Nachkommen bezüglich des Neomycinresistenzgens (neo<sup>R/+</sup>). Die Verpaarung erfolgte abends, am nächsten morgen wurden die Weibchen auf einen vaginalen Pfropf hin, bestehend aus männlicher Spermaflüssigkeit, untersucht (plug check). Im Falle eines sichtbaren Pfropfs wurde dieser Tag als Tag 0,5 der Schwangerschaft bzw. als Alter des Embryos bestimmt. 14 Tage später, d. h. Tag 14,5 *post coitum*, wurden die Embryos aus dem Uterus herauspräpariert.

### **2.16.1 Nährmedium**

#### ***Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM-Medium, High Glukose):***

Dulbecco's Modifiziertes Medium unterstützt das Wachstum einer Reihe von Säugerzellen. Es kann für das Wachstum undifferenzierter ES Zellen verwendet werden. Das verwendete DMEM (GibcoBRL) enthält Glutamax I<sup>TM</sup> (Glutamax<sup>TM</sup> Medien sind Standard-Kulturmedien, die L-Glutamin in einer stabilisierten Form als Dipeptid enthalten. Glutamax I<sup>TM</sup> ist das Dipeptid L-Alanyl-L-Glutamin), 4500 mg/L D-Glukose und Natriumpyruvat. Eine Lagerung bei +2 °C bis +8 °C wird empfohlen.

***Fötales Rinderserum (FBS)***

Für die Kultivierung embryonaler Stammzellen ist fötales Rinderserum notwendig. Es wurde von der Firma Gibco-BRL bezogen. Da ES Zellen gegenüber Chargenschwankungen des Serums empfindlich sein können, werden Chargen des Serums vor der Anwendung getestet, ob sie sich für die Kultivierung embryonaler Stammzellen eignen und dann in ausreichender Menge bei dem Anbieter reserviert.

Das Serum wird vor Gebrauch 20 min bei 56 °C erhitzt, anschließend unter der Sterilbank in sterile 50 ml-Röhrchen (Falcon) à 50 ml aliquotiert und bei –20 °C aufbewahrt.

***ESGRO<sup>TM</sup> (Maus Leukämie-inhibierender Faktor)***

ESGRO ist ein rekombinanter Leukämie-inhibierender Faktor (LIF) aus der Maus, der in *E. coli* hergestellt wird. Für die ES Zellkultur wurde LIF in der Konzentration 10<sup>7</sup> Einheiten/ml von der Firma Gibco-BRL gekauft und auf 0,5 x 10<sup>6</sup> Einheiten/ml verdünnt.

**Anfertigen von LIF stocks:**

10 ml DMEM+ 20% FBS wurden in ein 15 ml-Röhrchen (Falcon) vorgelegt. Mit einer gestopften Pasteurpipette wurde 1 ml LIF in das vorgelegte Medium überführt. Das Medium wurde sterilfiltriert (0,2 µm Filter/ Fa. Renner). Mit 10 ml ES Medium wurde das 15 ml-Röhrchen nachgespült und die Lösung wieder sterilfiltriert. Anschließend wurde jeweils 1 ml der LIF-haltigen Lösung (0,5 x 10<sup>6</sup> Einheiten/ml) in Kryoröhrchen aliquotiert, die bei 4 °C gelagert wurden.

***Mediumzusätze für die Selektion***

Zur Selektion rekombinanter ES Zellklone wurde während dem ersten Targeting G-418, eine Neomycin-analoge Substanz (Geneticin<sup>R</sup> / G-418 Sulfat) von Gibco-BRL, verwendet.

**Anfertigen einer G-418 Stammlösung:**

2 g G-418 wurden in 50 ml 1x PBS gelöst und in 15 ml-Röhrchen (Falcon) à 5 ml Aliquots sterilfiltriert (0,2 µm Filter). Die G-418 Stammlösungen [40 mg/ ml] wurden bei –20 °C aufbewahrt. Die finale Konzentration von G-418 im Medium betrug 400 µg/ ml.

Während dem zweiten Targeting wurde Ganciclovir (Cymeven / Ganciclovir-Natrium von Roche) zur Selektion richtig rekombinierter ES Zellklone nach der Cre-vermittelten Rekombination verwendet. Die finale Konzentration im Medium betrug 2 µM.

**Ganciclovir Stammlösung:**

500 mg (Ampulle) wurden in 9,8 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst (200 mM). Die Ganciclovirlösung wurde 1:10 verdünnt (20 mM) und in 50 µl Aliquots bei –20 °C aufbewahrt. In 500 ml Medium wurden je 50 µl Ganciclovirlösung zugegeben.

**2.16.2 Lösungen****1x PBS**

1 Teil 10X PBS (2.20) 9 Teile H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**1x Trypsin/EDTA (Gibco-BRL):**

1 Teil 10x Trypsin/EDTA, 9 Teile 1x PBS

**2.16.3 Präparation und Kultivierung embryonaler Fibroblasten (EF Zellen, Feederzellen)****Medium (EF Medium)**

DMEM mit 10% FBS:

450 ml DMEM

+ 50 ml hitzeinaktiviertes FBS

**Präparation embryonaler Fibroblasten:**

Das schwangere Weibchen wurde durch cervikale Dislokation getötet, in 70% Ethanol gebadet und die Bauchdecke aufgeschnitten. Der Uterus wurde herausgelöst und in eine mit 12 ml 1x PBS gefüllte Petrischale überführt. Die Embryos (9) wurden in eine neue, ebenfalls mit 1x PBS gefüllte Petrischale gegeben. Der Kopf der Embryos wurde entfernt, der Corpus wieder in eine neue Petrischale überführt. Aus dem Corpus wurden Herz, Leber und Lunge (dunkelrot gefärbte Organe) herausgenommen. Währenddessen wurde in ein 50 ml-Röhrchen (Falcon) 1 ml 1x Trypsin/EDTA pro Embryo vorgelegt (9 ml). Die 9 Embryos wurden mit einer Schere zerkleinert und in vorgelegtem Trypsin 5-10 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde mit immer kleineren Pipetten homogenisiert (25 ml Pipette → 10 ml Pipette → 5 ml Pipette), noch einmal 10 min bei 37 °C inkubiert und wieder mit Pipetten homogenisiert (10 ml Pipette → 5 ml Pipette → 2 ml Pipette). Das Volumen im 50 ml-Röhrchen wurde auf 25 ml mit EF Medium erhöht. Die Zellsuspension wurde noch einmal sehr intensiv (5-10 min) mit einer Pipette homogenisiert. Die Zelltrümmer ließ man absinken. Währenddessen wurden 20 Zellkulturflaschen (175cm<sup>2</sup>; Falcon) vorbereitet. Es wurden 19 ml EF-Medium in jede Zellkulturflasche vorgelegt und 1 ml Überstand der Zellsuspension dazugeben. Die Inkubation der Zellsuspension erfolgte bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>.

Nach ungefähr 3 Tagen Inkubation war die Zellkulturflasche konfluent bewachsen. Daraufhin wurde die Zellsuspension noch 2 weitere Tage inkubiert.

**Feederzellen passagieren und ernten:**

Das Medium der Zellkulturflasche (175 cm<sup>2</sup>) wurde abgesaugt. Der Zellrasen wurde mit 20 ml 1x PBS gewaschen. 4 ml 1x Trypsin/EDTA wurden dazugeben und 5-10 min bei 37 °C inkubiert, um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen. Mit 6 ml EF Medium wurde der Trypsinverdau gestoppt (das Medium enthält Inhibitoren, die Trypsin hemmen). Die Zellsuspension wurde mit einer 10 ml Pipette homogenisiert, die Zellen wurden dabei vereinzelt. 9 ml (90%) von dieser Zellsuspension wurden in 50 ml-Röhrchen (Falcon)

überführt. Der restliche 1 ml Zellsuspension (10%) wurde mit 19 ml EF Medium aufgefüllt und wieder bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Alle 20 Zellkulturflaschen wurden auf die beschriebene Art und Weise geerntet und passagiert. Die Zellsuspensionen aus 5 Zellkulturflaschen wurden jeweils in einem 50 ml-Röhrchen vereinigt. Die 4 Röhrchen mit Zellsuspension wurden 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Die Pellets wurden jeweils in 10 ml EF Medium resuspendiert und auf zwei 50 ml-Röhrchen verteilt. Das Volumen jedes Röhrchens wurde ad 40 ml mit EF Medium aufgefüllt.

#### **Bestrahlung der Feederzellen:**

Da die Feederzellen einen einschichtigen Zellrasen ausbilden sollen, wurden sie durch Bestrahlung mit energiereicher Strahlung (Röntgenstrahlung) teilungsunfähig gemacht. Der Metabolismus der Zellen wurde dadurch kaum beeinträchtigt. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte im Max Planck Institut für Biochemie. Die Zellsuspension ließ man vor der Bestrahlung einige Zeit stehen, die Zellen sanken ab. Das gebildete Pellet wurde mit 5000 Rad (entsprach zu der Zeit 4,41 min) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das Pellet durch vorsichtiges Schwenken wieder aufgelöst.

#### **Einfrieren der bestrahlten Feederzellen (= 1. Passage)**

Für diese Menge an Zellen wurden 60 Kryoröhrchen (Nunc) vorbereitet und beschriftet. Beide bestrahlten Zellsuspensionen wurden 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Jedes Pellet wurde in 15 ml EF Medium resuspendiert. Pro Röhrchen wurden noch einmal 15 ml EF Medium + 20% DMSO dazugeben, d.h. jedes Röhrchen enthielt 30 ml EF Medium + 10% DMSO. In jedes Kryoröhrchen wurde 1 ml Zellsuspension pipettiert und sofort auf Eis gestellt. Die Kryoröhrchen wurden bei -80 °C (für kurze Aufbewahrung) oder im Stickstofftank bei -196 °C (für längere Aufbewahrung) aufbewahrt.

Nach ungefähr 4 Tagen waren die 20 Zellkulturflaschen wieder konfluent bewachsen. Die Zellen wurden geerntet, bestrahlt, eingefroren und passagiert wie oben beschrieben.

Insgesamt wurden 3 Passagen Feederzellen auf diese Art und Weise hergestellt.

### **2.16.4 Erstes ES Zell Targeting**

#### **Nährmedium (ESL Medium)**

DMEM mit 20% FBS:

400 ml DMEM

100 ml FBS

1 ml LIF (0,5 x 10<sup>6</sup> Einheiten/ml)

3,5 µl β-Mercaptoethanol (Sigma)

### **Einfriermedium:**

ESL Medium mit 10% DMSO (Sigma)

### **Aussäen von Feederzellen:**

Bevor ES Zellen zur Kultivierung ausgesät wurden, wurden Feederzellen (im optimalen Fall) am Abend vorher ausgesät, damit sie einen weitgehend geschlossenen Zellrasen ausbildeten. Die Konzentrationen der eingefrorenen Feederzellen wurde durch Aussäen überprüft. **Tabelle 2-6** zeigt das Schema, nach welchem die Feederzellen während der beiden Targetingschritte ausgesät wurden.

Tabelle 2-6 Aussäen der Feederzellen in Zellkulturgefäße.

Zellkulturgefäß	Volumen	Kryoröhrchen
25 cm <sup>2</sup> Flasche (Falcon)	5 ml	0,25
75 cm <sup>2</sup> Flasche (Falcon)	15 ml	0,75
175 cm <sup>2</sup> Flasche (Falcon)	25 ml	1,5
Petrischale Ø10 cm/ 55cm <sup>2</sup>	10 ml	0,5
6-Loch Platte (Costar)	3 ml/ Loch	0,5
24-Loch Platte (Costar)	1 ml/ Loch	0,7

### **Auftauen und Aussäen der Feederzellen:**

1 Kryoröhrchen Feederzellen (1. Passage) wurde im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Der Inhalt wurde mit einer gestopften Pasteurpipette in 5 ml ES Zell Medium (DMEM + 20% FBS) überführt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Das Pellet wurde in 4 ml ES Zell Medium resuspendiert. 1 ml der Zellsuspension wurde in eine 25 cm<sup>2</sup> Flasche (Falcon), in die vorher 4 ml ES Medium vorgelegt wurden, pipettiert und 3 ml der Zellsuspension wurden in eine 75 cm<sup>2</sup> Flasche pipettiert, in die vorher 12 ml ES Medium vorgelegt wurden. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Wurden mehrere Kryoröhrchen Feederzellen benötigt, wurde entsprechend mehr EF Medium zum Waschen nach dem Auftauen und anschließend zum Aussäen verwendet.

### **Aussäen der ES Zellen:**

5 ml ESL Medium wurden in ein 15 ml Röhrchen (Falcon) vorgelegt. Ein Kryoröhrchen mit ES Zellen (ES/R1 10.Passage) wurde im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Mit einer gestopften Pasteurpipette wurde die ES Zellsuspension in vorgelegtes ESL Medium pipettiert. Die Zellen wurden 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, bevor das Pellet in 4 ml ESL Medium resuspendiert

wurde. Das Medium der abends vorher in einer 25 cm<sup>2</sup> Flasche ausgesäten Feederzellen wurde abgesaugt und die ES Zell Suspension in die Zellkulturflasche auf den Feederzellrasen pipettiert.

### **Mediumwechsel:**

Das Medium der ES Zellen sollte während dem ES Zell Targeting täglich gewechselt werden, um eine Ansammlung von Stoffwechselprodukten zu vermeiden. Das „alte“ Medium wurde abgesaugt und mit frischem ESL Medium ersetzt.

### **Passagieren dicht gewachsener Zellen:**

Das Passagieren der ES Zellen muss rechtzeitig erfolgen, bevor sie zu dicht wachsen und evtl. differenzieren. Die Zellen werden 1:3 aufgeteilt, d.h. sie werden z.B. von einer 25 cm<sup>2</sup> Flasche geerntet und in einer 75 cm<sup>2</sup> Flasche wieder ausgesät.

Das Medium der Zellen wurde abgesaugt, die Zellen wurden mit 5 ml 1x PBS gewaschen. 1 ml 1x Trypsin/EDTA wurde auf die Zellen pipettiert. Die Flasche wurde 5 min bei 37 °C inkubiert. Der Trypsinverdau wurde anschließend mit 4 ml ESL-Medium abgestoppt. Die Zellen wurden mit einer Pipette gut resuspendiert. Das Medium einer mit Feederzellen vorbereiteten 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurde abgesaugt. 10 ml ESL-Medium wurden vorgelegt und 5 ml ES Zellsuspension wurden dazu pipettiert (11.Passage).

### **Elektroporation:**

Am Abend vor der Elektroporation wurden Feederzellen in 14 Petrischalen ausgesät. Dazu wurden 7 Kryoröhrchen Feederzellen der 1. Passage aufgetaut und in Petrischalen ausgesät. Am nächsten Morgen wurde das Medium der Petrischalen noch einmal gewechselt. Abends wurden die ES Zellen elektroporiert.

Die ES Zellen wurden aus der 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche geerntet, d.h. das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml 1x Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Nachdem die Zellen gut resuspendiert wurden, wurde der Trypsinverdau mit 7 ml ESL Medium abgestoppt. Die Zellen wurden wieder gut resuspendiert und die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Nachdem die Zellen 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert wurden, wurde das Pellet in 10 ml 1x PBS gut resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Gesamtzellzahl betrug  $1 \times 10^7$  Zellen. Die Zellsuspension wurde ein letztes Mal zentrifugiert (5 min, 1000 rpm). Das Pellet wurde in 1,7 ml PBS resuspendiert. 60 µg des mit *NotI* linearisierten, in 0,3 ml 1x PBS gelösten Targeting Vektors wurden der Zellsuspension zugegeben. Die Suspension wurde gemischt, auf zwei Elektroporationsküvetten aufgeteilt und unter zwei verschiedenen Elektroporationsbedingungen (**Tabelle 2-7**) in einem „Gene Pulser“ der Firma Biorad elektroporiert.



Tabelle 2-7 Elektroporationsbedingungen.

Ansatz	I	II
Spannung	0,8 kV	0,23 kV
Kapazität	3 $\mu$ F	500 $\mu$ F
Zeitkonstante	0,1 ms	4,8 ms

Vor der Elektroporation wurde für beide Bedingungen die Zeitkonstante überprüft, indem die Küvetten mit 1 ml 1x PBS gefüllt wurden und das Gerät gestartet wurde.

Nach der Elektroporation standen die Zellsuspensionen in der Küvette 5 min bei Raumtemperatur, bevor sie in 14 ml ESL Medium, das in 15 ml-Röhrchen vorgelegt wurde, überführt wurden. Die Suspensionen wurden gemischt, jeweils 2 ml Zellsuspension wurden in 8 ml, in Petrischalen vorgelegtes, ESL Medium pipettiert. Pro Elektroporationsansatz wurden 7 Petrischalen angelegt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **Selektion mit G-418:**

24 h nach der Elektroporation wurde mit der Neomycinselektion begonnen. Zur Selektion wurde G-418 mit einer finalen Konzentration von 400  $\mu$ g/ ml dem Nährmedium zugesetzt. Eine Petrischale pro Elektroporationsansatz diente jeweils als Kontrolle und wurde weiterhin mit normalem ESL Medium inkubiert. Das Medium wurde bei allen Petrischalen täglich gewechselt.

#### **Isolieren G-418 resistenter ES Zellklone:**

8 bzw. 10 Tage nach der Elektroporation wurden Neomycin-resistente ES Zellklone isoliert. In einer 96-Lochplatte wurde in 24 Löcher jeweils 1 Tropfen 1x Trypsin/ EDTA vorgelegt, anschließend wurde die Platte bei 37 °C vorgewärmt. Die ES Zellklone wurden unter der Sterilbank mit einer 20  $\mu$ l-Eppendorf Pipette vom Boden der Petrischale vorsichtig abgelöst und in die Trypsinlösung der 96-Loch Platte überführt. Der ES Zellklon wurde durch mehrmaliges auf- und abpipettieren in einzelne Zellen überführt. Nachdem 24 Klone isoliert worden sind, wurde die 96-Lochplatte 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dadurch aus dem Zellverband heraus gelöst und vereinzelt. Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe von 2 Tropfen ESL/ G-418 Medium inhibiert. Die Zellsuspension wurde mit einer 200  $\mu$ l-Eppendorf Pipette gut resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension eines ES Zellklons in ein Loch einer 24-Loch Platte überführt. Abends vorher wurden Feederzellen in die 24-Lochplatten ausgesät und das Medium einmal gewechselt.

#### **Aufteilen und Einfrieren:**

4 Tage nach dem Isolieren waren die ES Zellklone ausreichend dicht gewachsen, um sie aufzuteilen und einzufrieren. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 2 ml 1x PBS gewaschen, bevor sie durch Zusatz von 2 Tropfen 1x Trypsin/ EDTA vom Boden abgelöst

wurden. Der Trypsinverdau wurde nach 5 min Inkubation bei 37 °C durch Zugabe von 900 µl ESL Medium+ 10% DMSO gestoppt. Die Zellen wurden mit einer 1000 µl- Eppendorf Pipette gut resuspendiert. 600 µl der Zellsuspension wurden in ein Kryoröhrchen überführt, das bei – 80 °C eingefroren wurde. Die restlichen 300 µl wurden auf der Platte gelassen und mit 1 ml ESL/ G-418 Medium aufgefüllt.

### **DNS Isolierung:**

Nachdem die Zellen sich ausreichend vermehrt hatten, wurde die DNS daraus isoliert. Das Medium wurde vorsichtig aus den 24-Lochplatten abgesaugt. In jedes Loch wurden 500 µl Lysepuffer (Tris pH 8,5 100mM, EDTA 5 mM, 0,2% SDS, NaCl 200 mM, ProteinaseK 1 mg/ml) pipettiert. Die Platten wurden ÜN (maximal 4 bis 5 Tage) bei 37 °C inkubiert. 500 µl Isopropanol wurden der Zellsuspension zugegeben. Die Platten wurden ÜN im Kühlraum auf einem Schüttler (Unitwist; Uniequip) geschwenkt. Am nächsten Tag war pro Loch eine DNS Flocke sichtbar, die mit einer Pasteurpipette aufgewickelt und in ein Eppendorf-Cap überführt wurde. Nach dem Trocknen der DNS-Flocke im 37 °C-Brutschrank, wurde die DNS in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und bei 55 °C inkubiert. Die DNS wurde bei 4 °C gelagert.

#### **2.16.4.1 Analyse der ES Zellklone mittels Southern Hybridisierung:**

##### **Restriktionsansatz**

DNS (ca. 15 µg)	20 µl
10x Puffer B	3 µl
10x BSA	3 µl
<i>Bam</i> HI <sub>konz.</sub> (NEB)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 30 µl

Der Ansatz wurde ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Southern Blot und Southern Hybridisierung wurden wie unter (2.13) beschrieben durchgeführt. Die Membranen wurden mit der 5', der 3' und der Neomycin Sonde hybridisiert.

#### **2.16.5 Zweites ES Zell Targeting**

Ein aus dem ersten ES Zell Targeting positiv hervorgegangener ES Zellklon wurde aufgetaut und in einem Loch einer 6-Lochplatte in ESL Medium kultiviert. In die 6-Loch Platte wurden wiederum vor dem Aussäen des ES Zell Klons Feederzellen ausgesät. Der Klon wurde mehrere Tage inkubiert und mehrmals aufgeteilt, bis eine 75 cm<sup>2</sup> Flasche für die

Elektroporation ausreichend bewachsen war. Vor der Elektroporation wurden 10 Petrischalen vorbereitet und Feederzellen darin ausgesät. Insgesamt wurden wieder  $1 \times 10^7$  Zellen mit zwei verschiedenen Cre-exprimierenden Plasmiden elektroporiert. Die Elektroporationsbedingungen sind in **Tabelle 2-8** angegeben.

Tabelle 2-8 Elektroporationsbedingungen für das zweite ES Zell Targeting.

Ansatz	Kontrolle/ PBS	PIC Cre	pBK CMV Cre
Spannung	0,23 kV	0,23 kV	0,23 kV
Kapazität	500 $\mu$ F	500 $\mu$ F	500 $\mu$ F
Zeitkonstante	5,0 ms	5,2 ms	5,5 ms

Die ES Zellen wurden geerntet (2.16.4, Elektroporation) und in 2 ml 1x PBS resuspendiert. Zu je 1 ml Zellsuspension wurden 6  $\mu$ g eines Cre-exprimierenden Plasmids zugegeben. Nach der Elektroporation wurden pro Elektroporationsansatz 5 Petrischalen mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen ausplattiert (3.4.2).

48 h nach der Elektroporation wurde mit der Ganciclovir Selektion [2  $\mu$ M im Medium] begonnen. 10 bzw. 11 Tage nach der Elektroporation wurden Ganciclovir resistente ES Zellklone, wie unter 2.16.4 beschrieben, isoliert und in 24-Lochplatten kultiviert. Weitere 4 Tage später wurden die ES Zellklone eingefroren (2/3) bzw. zur DNS Isolierung 4 weitere Tage inkubiert. Nach der DNS Isolierung wurde die DNS, wie unter 2.16.4.1 beschrieben, mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI gespalten. Southern Blot und Southern Hybridisierungen (2.13) wurden mit der 5' und der 3' Sonde durchgeführt.

## **2.17 Erzeugung genetisch veränderter Mäuse**

### **2.17.1 Haltung und Zucht der Mäuse**

Alle Mäuse wurden nach vorgeschriebenen, konventionellen Richtlinien ordnungsgemäß in einem Tierstall gehalten. Die beiden für die Injektion benötigten Mausstämme C57/BL 6 und CD-1 wurden von Charles River (Niederlassung Sulzfeld) bezogen.

### **2.17.2 Injektion genetisch modifizierter ES Zellen in Blastozysten**

Die in dieser Arbeit verwendeten ES Zellen stammten aus dem Mausstamm SV 129 (agouti). Das Fell dieser Mäuse ist „agouti-farben (gelb)“. Diese SV 129 ES Zellen („gelb“) wurden in die Blastozysten „schwarzer“ Mäuse injiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür der

Mausstamm C57BL/6 verwendet. In **Abbildung 2-2** ist die Vorgehensweise der Herstellung genetisch modifizierter Mäuse dargestellt. Die Blastozysten wurden am Tag 3,5 *post coitum* aus den Weibchen isoliert. Die C57BL/6 Weibchen wurden deshalb mit C57BL/6 Männchen verpaart. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf einen sichtbaren vaginalen Pfropf (plug) hin untersucht. War dieser Pfropf vorhanden, befand sich das Weibchen im Falle einer Befruchtung am Tag 0,5 der Schwangerschaft. 3 Tage später wurden aus diesen positiven Weibchen die Blastozysten isoliert. Die genetisch modifizierten, „gelben“ ES Zellen wurden jetzt in diese Blastozysten injiziert. Die Blastozysteninjektion wurde von Frau Susanne Kühbandner durchgeführt (Hogan et al., 1994: Manipulating of Mouse Embryos). Anschließend wurden diese Blastozysten in scheinchwangere Weibchen, die als Leihmütter (foster) fungierten, eingesetzt. Als Leihmütter wurde der Mausstamm CD-1 verwendet. Da auch die Leihmütter vor der Reimplantation der Blastozysten im richtigen Schwangerschaftsstadium sein mussten, wurden sie mit vasektomierten FVB Männchen verpaart. Am nächsten morgen wurden auch diese Weibchen dem „plug check“ unterzogen. „Plug-positiven“ Weibchen wurden ungefähr 2,5 Tage später die Blastozysten eingesetzt. Befanden sich unter den Nachkommen chimäre Tiere, deren Fellfarbe gelb und schwarz gemischt war, so war die Injektion der modifizierten ES Zellen und die Reimplantation der Blastozysten erfolgreich. Um herauszufinden, ob die genetisch modifizierten Zellen keimbahngängig waren, wurden die Chimären (founder) mit C57BL/6 Mäusen gekreuzt. Gelbe Nachkommen aus dieser Verpaarung bestätigten die Keimbahngängigkeit der SV 129 ES Zellen.

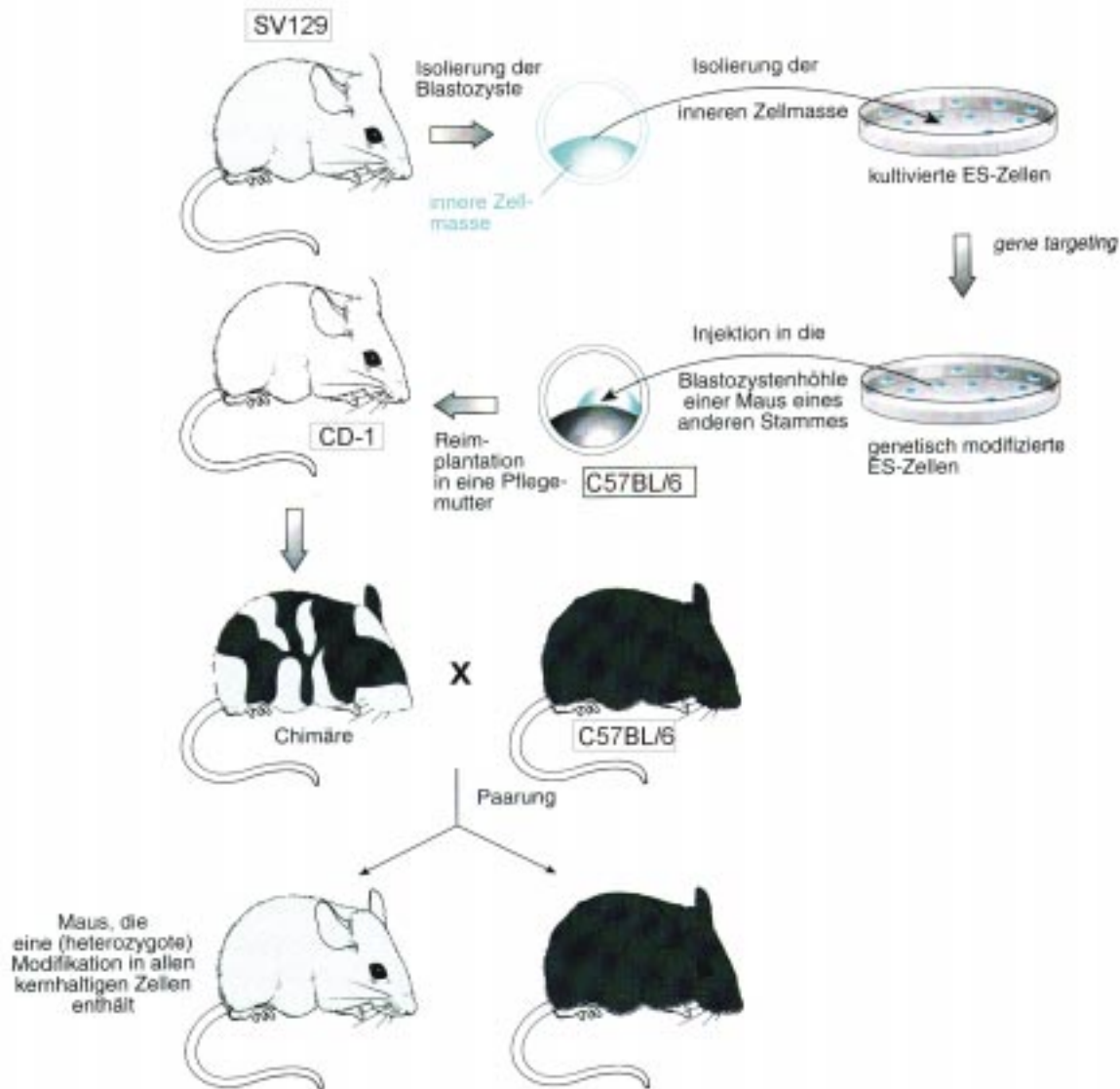


Abbildung 2-2 Herstellung genetisch modifizierter Mäuse. (Molekulare Humangenetik, Akademischer Spektrum Verlag (1996), modifiziert).

### 2.17.3 Genotypisierung der „agouti“ Nachkommen mittels PCR

Die genetisch modifizierten ES Zellen waren heterozygot bezüglich der eingeführten Mutation, d.h. die gelben Nachkommen waren entweder (+/+) oder (+/m), wobei m für Mutation und + für Wildtyp steht. Die Nachkommen wurden deshalb mittels PCR genotypisiert. Die PCR wurde, wie unter 2.10.1 beschrieben, durchgeführt. Mausgewebe wurde zusammen mit PCR Puffer, Proteinase K (20µg, Böhlinger) und H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ÜN bei 55°C verdaut. 2 µl dieser Lösung wurden für die PCR eingesetzt. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei genotypisch unterschiedliche ES Zellklone (+/-) und (+/+<sup>flox</sup>) injiziert wurden,

wurden für die Genotypisierung der Nachkommen zwei verschiedene PCR Strategien ausgewählt. Die Strategien sind zusammen mit den Ergebnissen unter 3.6 dargestellt.

#### 2.17.4 Genotypisierung der Mäuse mittels Southern Hybridisierung

Zusätzlich zur PCR wurden die Mäuse mittels Southern Hybridisierung genotypisiert. Dazu wurden 20 µl der aus Mausschwanz isolierten DNS (2.6.2) eingesetzt. Die DNS wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI gespalten.

##### **Restriktionsansatz**

DNS (ca. 15 µg)	20 µl
10x Puffer B	3 µl
10x BSA	3 µl
<i>Bam</i> HI <sub>konz.</sub>	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 30 µl

Der Ansatz wurde ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Southern Blot und Southern Hybridisierung wurden wie unter 2.13 beschrieben durchgeführt. Die Membran wurde mit der 5' und der 3' Sonde hybridisiert.

#### 2.18 Charakterisierung der (-/-) Embryos

##### 2.18.1 Anfertigung von Embryoschnitten

##### **Präparation der Embryos am Tag 14,5 p.c.**

Für die Isolierung der Embryos am Tag 14,5 p.c. wurden zunächst zwei heterozygote (+/-) Mäuse verpaart. Die Embryos, die zur Anfertigung embryonaler Gewebeschnitte verwendet wurden, wurden 14 Tage nach dem Erscheinen eines vaginalen Pfropfes aus dem Uterus des schwangeren Weibchens präpariert. Das Weibchen wurde mittels cervikaler Dislokation getötet, der Uterus herauspräpariert und in 1x PBS Puffer gelegt. Die Embryos wurden aus dem Uterus herausgenommen und in frischen 1x PBS Puffer gelegt. Ein Stück des embryonalen Schwanzes wurde abgeschnitten und ÜN mit ProteinaseK (2.17.3) zur Gewinnung der DNS verdaut. Mit der aus dem Schwanz gewonnenen DNS konnten die Mäuse mittels PCR (2.17.3) genotypisiert werden.

**Einbetten der Embryos in Paraffin** (Kaufmann, 1998: Atlas of Mouse Development):

- Fixierung der Embryos in Bouin's fluid (75 ml Pikrinsäure, 5 ml Eisessig, 25 ml 40% Formaldehyd) für 4 – 6 h
- Lagerung der Embryos in 70% Ethanol bei RT. Die Dauer ist variabel (z.B. 2 Tage). Die Ethanollösung sollte mehrmals gewechselt werden, da Ethanol teilweise die charakteristische gelbe Pikrinsäurefärbung aus den Embryos entfernt.
- Dehydrierung:
  - 80% Ethanol 30 min
  - 90% Ethanol 30 min
  - 96% Ethanol 30 min
  - 100% Ethanol 30 min
  - 100% Ethanol/Xylol (1:1) 15 min
  - Xylol ca. 5 min
- Einbetten der Embryos in Paraplast (Sigma) bei 60 °C:
  - Paraplast I (Sigma) 1 h
  - Paraplast II (Sigma) 1 h
  - Paraplast III (Sigma) 1 h

Anschließend wurden die Embryos in dafür vorgesehene Metallgefäße gelegt, die auf 60 °C vorgewärmt wurden und in flüssigem Paraplast eingebettet. Bei RT verfestigte sich das Paraffin innerhalb 20 min. Die eingebetteten Embryos wurden bei 4 °C gelagert.

**Schneiden der in Paraffin eingebetteten Embryos:**

In einem Schneidegerät (HM 335E) der Firma Microm wurden bei RT 10 µm dicke Scheiben von den Embryos angefertigt und auf Silan-beschichtete Objektträger (3-Aminopropyltriethoxy-Silan; ICN) aufgelegt. Die Schnitte wurden mit einem, in 70 % Ethanol getränkten, Tuch auf den Objektträgern festgedrückt und zur Fixierung ÜN bei 42°C im Ofen gebacken.

**2.18.1.1 Histologische Färbungen**

Um die Morphologie der Embryos untersuchen zu können, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin / Eosin (HE) gefärbt. Hier färbten sich die Kerne blauviolett und das Zytoplasma rosa. Nach der Färbung wurden die Gewebeschnitte mit DePeX-Harz (Serva) und Deckgläschen bedeckt und standen für die Mikroskopie und Photographie zur Verfügung.

**HE-Färbung:**

- OT für 1 min in die Hämatoxylinlösung
- 2x 2 min in H<sub>2</sub>O
- 5 sec in 0,1 % Ammoniaklösung (frisch!)
- 5 min in H<sub>2</sub>O
- für 1 min in die Eosinlösung
- 8x in 95 % Ethanol tauchen
- 8x in 100 % Ethanol tauchen
- 2 min in 100 % Ethanol
- 2x 2 min in Xylol

**Hämatoxylin-Lösung** nach Harris (Sigma):

Hämatoxylin            7,5 g/l

**Eosin-Lösung:**

Eosin Y                    6,0 g  
Phloxine B                1,5 g  
70 % Ethanol            ad 250 ml

**2.18.1.2 Mikroskopie und Photographie**

Die angefärbten Embryoschnitte wurden mit einem Zeiss Axioskop im Hellfeld untersucht und mit einer Contax 167 MT-Kamera aufgenommen. Als Farbfilm wurde der KODAK EPY64T Film verwendet.

**2.19 Elektrophysiologische Untersuchungen**

Aus (+/+), (+/-) und (-/-) Embryos wurden die Herzen isoliert und aus den Herzzellen Primärkulturen angelegt, die elektrophysiologisch charakterisiert wurden.

**2.19.1 Isolierung kardialer Myozyten aus Embryos am Tag 12,5 p.c.**

Die Embryos wurden am Tag 12,5 der Schwangerschaft aus den schwangeren Mäusen isoliert. Das schwangere Weibchen wurde mittels cervikaler Dislokation getötet und der Uterus in PBS Puffer überführt (Davies et al., 1995). Die Embryos wurden aus dem Uterus isoliert und in ADS Puffer (116 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,5 mM Glucose, 5 mM



KCl, 0,8 MgSO<sub>4</sub>; pH 7.35) gelegt. Die Herzen wurden aus den Embryos herauspräpariert, Atrium und Ventrikel jeweils getrennt in Eppendorf Gefäße mit 0,5 ml ADS Puffer gewaschen. Nach kurzem Zentrifugieren wurde der Überstand entfernt und mit frischem ADS Puffer, der 0,5 mg/ ml Kollagenase Typ II-S (Sigma) und 1,0 mg/ ml Pancreatin (Gibco-BRL) enthielt, ersetzt. Die Suspension wurde 15 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Der Verdau wurde durch Zufügen von 0,5 ml DMEM (Gibco-BRL), versetzt mit 10% fötalem Rinderserum und 10 ml Penicillin/ Streptomycin, abgestoppt. Das Gewebe wurde schonend aufgelöst, nicht verdaute Partikel setzten sich nach 2 bis 3 Minuten ab. 0,7 ml des Überstandes wurden auf Deckglässchen aus Plastik (Thermanox; Fluka) ausplattiert und in Petrischalen, die 2,5 ml DMEM enthielten, kultiviert.

### **2.19.2 Versuchsdurchführung**

Alle elektrophysiologischen Untersuchungen führte Frau Dr. Welling durch. Die Messung der Ströme erfolgte im „Ganz-Zell“ (whole cell) Modus mit der Patch-Clamp-Methode (Hamill et al., 1981).

Die kultivierten Kardiomyozyten wurden 18 bis 48 Stunden nach der Kultivierung „gepatcht“. Die Messungen wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt. Gemessen wurde in einer Kammer unter mikroskopischer Beobachtung. Die Zellen wurden kontinuierlich mit Hilfe eines schnellen Lösungsaustauschers mit Bad- oder Testlösung gespült. Die Ableitung erfolgte mit Hilfe einer Glasmikroelektrode (Patchpipette), die mit einem Verstärker (EPC-9) gekoppelt war. Die Daten wurden mit 1 oder 3 kHz gefiltert. Leckströme und kapazitative Ströme wurden mit Hilfe der Software unter Kontrollbedingungen kompensiert.

Die Patchpipette wurde auf die Zelloberfläche gebracht. Die Annäherung erfolgte unter leichtem Überdruck, der bei Berührung in einen Sog umgewandelt wurde. Der unter der Öffnung befindliche Membranausschnitt wurde dadurch in die Pipette hineingesaugt, was zu einer engen Verbindung zwischen Patchpipette und Membran führte. Dadurch erhöhte sich der Pipettenwiderstand bis in den Gigaohmbereich (Gigaseal). Nach Bildung des Gigaseals konnte die Membran durch kurzen, heftigen Sog zerstört werden. Dadurch stand die Pipette in direktem Kontakt mit dem intrazellulären Raum. Die an der Membran herrschende Spannung konnte kontrolliert werden und der Strom, der durch die Kanäle auf der Membranoberfläche floss, konnte gemessen werden.

**Datenanalyse:**

Alle Daten wurden mit einem EPC-9 Programm auf einem Macintosh Computer unter Kontrolle der Pulse Software (HEKA electronics) erstellt und auf Festplatte gespeichert. Die Daten wurden mit einem IBM kompatiblen Computer analysiert. Graphen und statistische Auswertungen der Daten erfolgten mit Hilfe der Origin Software (Microcal).

Die Patch Pipetten wurden feuer-polierd und hatten einen Widerstand von 2-3,5 M $\Omega$  mit intrazellulärer Lösung (60 mM CsCl, 50 mM Asparaginsäure, 68 mM CsOH, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K-ATP, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 11 mM EGTA; pH 7,4). Die „Whole-Cell“ Konfiguration wurde in Ba-Tyrode mit folgender Zusammensetzung gebildet (in mM): 130 NaCl, 4,8 KCl, 5 BaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 Glucose, 5 HEPES; pH 7,4. Zur Isolierung der Ba<sup>2+</sup> Ströme enthielt die Badlösung (in mM): 130 N-methyl-D-glucamine (NMDG, Na Ersatz), 4,8 CsCl, 5 BaCl<sub>2</sub>, 5 Glucose, 5 HEPES; pH 7,4 (NMDG-Tyrode). Die Herzzellen wurden in Ba-Tyrode „gepatched“, da sie stark kontrahierten und nach Berührung mit der Patch Pipette hyperkontrahierten und starben. Nach Ausbildung der „Ganz-Zell“ Konfiguration wurde der Na<sup>+</sup> Strom und die Kapazität der Herzzellen bestimmt. Die Kapazität steht in direkter Relation zur Zelloberfläche. Die ermittelten Ströme wurden daher auf ihre kapazitiven Werte normalisiert. Es wurden nur Zellen mit Na<sup>+</sup> Strom analysiert, um sicher zu gehen, dass es sich bei den Zellen um Kardiomyozyten handelte.

Die Chemikalien wurden aus den folgenden Stammlösungen auf die angegebenen Konzentrationen täglich frisch verdünnt.

Bay K 8644 (Bayer): 10 mM in Ethanol; final 1  $\mu$ M in NMDG-Tyrode

Nisoldipin (Bayer): 20 mM in Ethanol; final 200 nM in NMDG-Tyrode

TTX (Tetrodotoxin-citrat) (Tocris): 1 mM in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>; final 10  $\mu$ M in NMDG-Tyrode

**Meßprotokoll zur Charakterisierung der Ba<sup>2+</sup>-Ströme:****Strom-Spannungs Kurven**

5 mM Barium wurde als Ladungsträger verwendet, da die Stromamplitude größer ist und die Inaktivierung langsamer erfolgt. Das Haltepotential war jeweils –80 mV. Zur Messung der Strom - Spannungsbeziehung wurde die Zellmembran für 100 msec auf die Testpotentiale von –60 bis 30 mV, in 10 mV Schritten, geklemmt. Die Pulsfrequenz betrug dabei 1 Hz.

**Pulsprotokoll**

Das Haltepotential war jeweils –80 mV. Zur Messung des Strom-Zeitverlaufs wurde die Zellmembran für 40 msec auf 0 mV geklemmt. Die Pulsfrequenz betrug dabei 0,1 Hz.

## 2.20 Lösungen

### **H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>**

Diethylpyrocarbonat (DEPC) 1,0 g

H<sub>2</sub>O ad 1000 ml

über Nacht rühren lassen, danach durch Autoklavieren Reste von DEPC entfernen.

### **10x PBS**

NaCl 80 g

KCl 2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (wasserfrei) 6,2 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g

H<sub>2</sub>O ad 1000 ml

hat ≈ pH 7,4

### **1 M TRIS**

Tris-Base 121 g

H<sub>2</sub>O ad 1000 ml

pH mit HCl<sub>conc</sub> auf 8,0 bzw. 7,5 einstellen

### **0,5 M EDTA, pH 8,0**

Na<sub>2</sub>EDTA\*2 H<sub>2</sub>O 186,1 g

H<sub>2</sub>O ad 1000 ml

mit 5 M NaOH auf pH 8,0 einstellen

### **3 M Natriumacetat, pH 5,2**

Natriumacetat\*3 H<sub>2</sub>O 40,8 g

H<sub>2</sub>O ad 100 ml

mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen

## 3 Ergebnisse

Im Verlauf dieser Arbeit wurden genetische Modifikationen schrittweise in das Genom von Mäusen eingeführt. Um einen geeigneten „Targeting Vektor“ konstruieren zu können, der die gewünschten Mutationen im  $\alpha_{1C}$  Gen trägt, die von ausreichend großen homologen Bereichen flankiert werden, wurde zunächst eine Restriktionskarte im Bereich des  $\alpha_{1C}$  Gens angefertigt.

### 3.1 Restriktionskartierung der P1-Phagen

Die Exons 14 und 15 der  $\alpha_{1C}$  Untereinheit wurden ausgewählt, um sie mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems zu deletieren. Diese beiden Exons codieren für Transmembransegmente der zweiten Domäne der  $\alpha_{1C}$  Untereinheit und sind an der Porenbildung beteiligt. Eine Deletion der Exons führt in jedem Fall zum Verlust der Kanalpore in der zweiten Domäne und zusätzlich zu einer Verschiebung des Leserahmens, was in einen vorzeitigen Translationsstop resultiert. Um eine Deletion über Cre/loxP zu ermöglichen, mussten die beiden Exons von zwei, in derselben Orientierung vorliegenden, loxP Sequenzen flankiert werden. Die Insertion beider loxP Sequenzen erfolgte innerhalb der Introns 5' und 3' terminal der beiden Ziel-Exons, um das Exon/ Intron Spleißen nicht zu beeinflussen. Eine genaue Kenntnis der genomischen Exon/ Intron Organisation war deshalb im Bereich dieser und benachbarter Exons notwendig. Bei der Firma *Genome Systems* wurden daraufhin P1-Phagen bestellt, die einen Teil der zweiten Domäne des  $\alpha_{1C}$  Gens enthielten. Das Screening der P1-Phagen Bibliothek erfolgte über Exon-Sonden. Es wurden jeweils die Exons 7, 13 und 14 mittels PCR amplifiziert. Ein geeignetes Protokoll zur Amplifizierung dieser Exons aus genomischer DNS wurde ausgearbeitet und der Firma zusammen mit den Primern zugesandt. Eine P1-Phagen Bibliothek wurde mit diesen Exon-Sonden durchsucht. *Genome Systems* fand drei verschiedene P1-Phagen mit unterschiedlich großen Inserts des  $\alpha_{1C}$  Gens. Die DNS wurde aus den Phagen - wie unter (2.5.3) beschrieben - isoliert. Zunächst wurde mittels PCR das Vorhandensein verschiedener Exons auf den Inserts der Phagen überprüft. Alle drei Phagen enthielten mindestens die Exons 7 bis einschließlich 18 auf ihren Inserts.

#### 3.1.1 „Field Inversion“ Gelelektrophorese

Eine Restriktionskartierung der P1-Phageninserts wurde folgendermaßen durchgeführt. Die aus den Phagen isolierte DNS wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten. Zur Auftrennung großer DNS-Fragmente wurde die sogenannte FIGE (Field Inversion Gelelectrophoresis, 2.8.3) zur Hilfe genommen. Die Detektion der DNS-Fragmente erfolgte nach Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht. Die Addition der unterschiedlich großen

DNS-Fragmente ergab folgende Insertgrößen der drei Phagen. Die Größe des Inserts des P1-Phagen 1 betrug ungefähr 99 kb, die des P1-Phagen 2 ungefähr 85-89 kb und die des P1-Phagen 3 ungefähr 93-95 kb.

Das Gel wurde mittels Southern Blot geblottet, die DNS Fragmente wanderten dabei über Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran. Die Nylonmembranen wurden anschließend mit verschiedenen Exon-Sonden hybridisiert (2.13). Dadurch konnte die Lokalisation der Exons eindeutig bestimmten Restriktionsfragmenten zugeordnet werden. Die Fragmente mit nun bekannter Größe wurden in pUC18 oder pBluescript Vektoren subkloniert und weiter mittels Restriktionsenzymen kartiert.

### 3.1.2 Long Template PCR

Zur Aufklärung der Exon/ Intron Struktur in der Region der Exons 14 und 15 wurde die Long Template PCR von der Firma *Roche* zur Hilfe genommen (2.10.2). Es wurden Intron-überspannende PCR Ansätze durchgeführt. Die verwendeten Primerpaare und die verschiedenen PCR Ansätze mit den dazugehörigen Introngrößen sind in **Tabelle 3-1** aufgeführt.

Tabelle 3-1 Primerpaare, mit den dazugehörigen amplifizierten Sequenzen und ihrer Größe.

Primerpaar	Amplifizierte Sequenz	Ungefähre Gesamtgröße	Ungefähre Introngröße
VS 15 + VS 10	Exons 12 bis 13	1,5 kb	1,11 kb
VS 11 + VS 16	Exons 14 bis 15	1 kb	671 bp
VS 17 + VS 18	Exons 15 bis 16	2 kb	1,76 kb
VS 19 + VS 13	Exons 16 bis 17	0,9 kb	0,66 kb

Das Intron 14 ließ sich mit der Long Template PCR nicht amplifizieren. Die Ergebnisse der Southern Hybridisierungen zeigten allerdings, dass das Intron eine Größe von ungefähr 8 bis 10 kb haben muß.

### 3.1.3 Restriktionskarte

Aus den Ergebnissen der Restriktionskartierungen konnte für die Umgebung der Exons 13 bis 18 folgende Restriktionskarte erstellt werden.

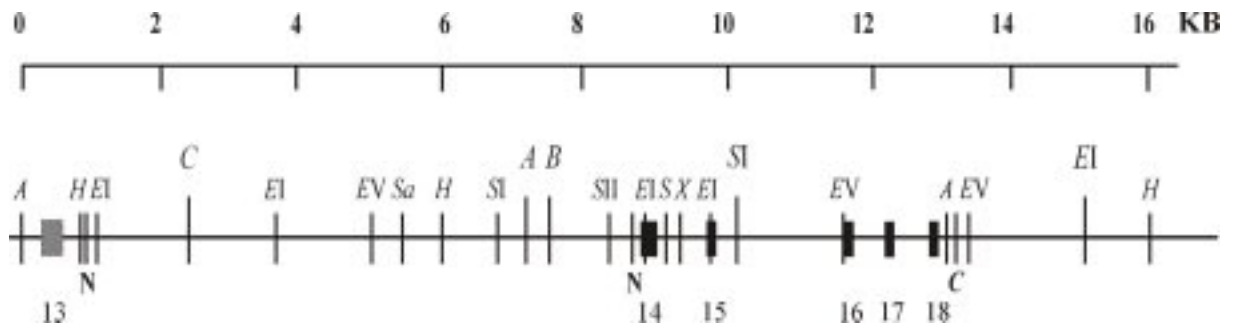


Abbildung 3-1 Restriktionskarte des  $\alpha_{1c}$  Gens in der Umgebung der Exons 13 bis 18. Folgende Restriktionsschnittstellen wurden eingezeichnet: *Acc65I* (A), *BamHI* (B), *ClaI* (C), *EcoRI* (E I), *EcoRV* (EV), *HindIII* (H), *NheI* (N), *SalI* (Sa), *SstI* (S I), *SstII* (S II), *XbaI* (X). In der vorliegenden Arbeit wurden für die Restriktionsenzyme immer die gleichen Abkürzungen verwendet.

### 3.2 Konstruktion des Targeting Vektors

Anhand der erstellten Restriktionskarte wurden geeignete Restriktionsschnittstellen für den Zusammenbau des Vektors und den Einbau der gewünschten Mutationen ausgewählt.

#### 3.2.1 Wesentliche Merkmale des Targeting Vektors

Die Einführung der Mutationen in das Genom embryonaler Stammzellen erfolgte über homologe Rekombination. Ein Targeting Vektor, mit den gewünschten Mutationen, wurde mittels Elektroporation in die embryonalen Stammzellen eingeschleust. Über homologe Rekombination wurde die Mutation in das Genom der Zellen integriert. Um die Deletion der Exons 14 und 15 über die Cre Rekombinase zu ermöglichen, mußten die beiden Exons innerhalb des Vektors von zwei loxP Sequenzen flankiert werden, die in derselben Orientierung eingesetzt wurden. Da die Effizienz der homologen Rekombination in eukaryotischen Zellen sehr niedrig ist, wurde dem Targeting Vektor zusätzlich ein Selektionsmarker eingesetzt, über den rekombinante ES Zellklone selektiert werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Selektionsmarker verwendet, der ein Neomycinresistenzgen und eine Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus Typ I enthielt. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Fässler zur Verfügung gestellt. Um mögliche Auswirkungen der aktiven Expression dieser Selektionsgene auf den Phänotyp der mutierten Maus zu vermeiden, wurde das Markergen ebenfalls von zwei gleichgerichteten loxP Sequenzen flankiert („gefloxt“). Dadurch war es möglich, den Marker mit Hilfe der Cre Rekombinase später wieder aus dem Genom der ES Zellen zu entfernen (Torres und Kühn, 1997). Der gefloxt Selektionsmarker wurde über die Restriktionsschnittstellen *Acc65I* und *BamHI* in das Intron 5' terminal von Exon 14 eingesetzt (siehe **Abbildung 3-1**). Ein kleiner Bereich des Introns, 150 bp, wurde dabei durch den 5 kb großen Selektionsmarker ersetzt. Die dritte einzelne loxP Sequenz wurde über eine *SstI* Restriktionsschnittstelle in das Intron 3'

terminal von Exon 15 eingesetzt (siehe **Abbildung 3-1**). Die Orientierung dieser einzelnen dritten loxP Seite entsprach dabei den beiden loxP Seiten des Selektionsmarkers.

Die homologen Vektorarme hatten auf der 5' gelegenen Seite eine Größe von ungefähr 5 kb und auf der 3' gelegenen Seite eine Größe von ungefähr 4 kb.

Der Vektor wurde im pUC18 Plasmid zusammengebaut. Zuerst wurde ein Adapter mit geeigneten Restriktionsschnittstellen in den pUC18 Vektor kloniert. Dazu wurden folgende Oligonukleotide bei der Firma MWG bestellt.

Oligonukleotid 1:

5' – AGC TGC GGC CGC TCG AGA TCG ATT GGT ACC TGG ATC CGA ATT CCT CGA GT – 3'

Oligonukleotid 2:

5' – AAT TAC TCG AGG AAT TCG GAT CCA GGT ACC AAT CGA TCT CGA GCG GCC GC – 3'

Die beiden Oligonukleotide wurden wie unter 2.4.1 beschrieben als Adapter verwendet, phosphoryliert und in pUC18 kloniert. Alle weiteren Vektorbestandteile konnten so nacheinander über die im Adapter enthaltenen Restriktionsschnittstellen in pUC18 eingebaut werden.

### 3.2.2 Gensonden zum Nachweis der Mutation im Genom der ES Zellen

Zur eindeutigen Identifizierung, ob die Mutationen an der richtigen Stelle im Genom der ES Zellen integriert wurden, wurden sowohl für den 5' Bereich als auch für den 3' Bereich Gensonden ausgewählt, die für Southern Hybridisierungen verwendet wurden. Die Gensonden waren intronale Sequenzen, die sich außerhalb des Targeting Vektors befanden. Die 5' Sonde hatte eine Größe von 1,3 kb und wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI*/*ClaI* in pUC18 subkloniert. Die 3' Sonde hatte eine Größe von 1,4 kb, und wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI*/*HindIII* ebenfalls in pUC18 subkloniert. Zum Nachweis, dass der Selektionsmarker ebenfalls nur einmal an der richtigen Stelle integriert worden ist, wurde für die Southern Hybridisierung eine spezifische Sonde, die innerhalb des Neomycinresistenzgens liegt, ausgewählt.

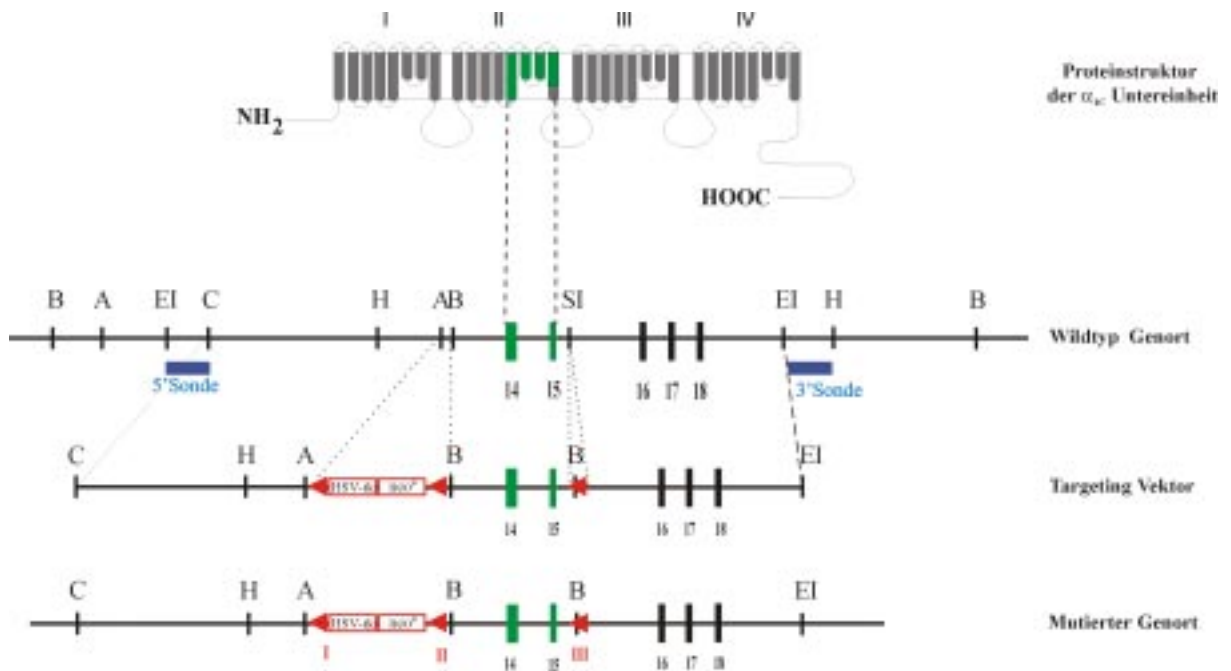


Abbildung 3-2 Aufbau des Targeting Vektors und mutierter Genort nach erfolgter homologer Rekombination. Rote Pfeile: loxP Sequenzen, die den Selektionsmarker (Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus Typ I und Neomycinresistenzgen) und die Exons 14 und 15 (grüne Rechtecke) flankieren; blaue Rechtecke: Gensonden zum Nachweis der Mutation.

### 3.3 Transiente Transfektion in COS Zellen

Die Funktionalität der drei eingesetzten loxP Sequenzen wurde vor dem Beginn des ES Zell Targetings *in vitro* überprüft. Dazu wurden COS-7 Zellen transient transfiziert. In einem Kontrollansatz wurde der Targeting Vektor (10 µg) zusammen mit pUC18 (10 µg) transfiziert. In einem zweiten Ansatz wurde der Targeting Vektor (10 µg) zusammen mit einem Cre-exprimierenden Plasmid (5 µg) und pUC18 (5 µg) transfiziert. Nach Inkubation der COS Zellen über Nacht bei 37°C wurde die DNS wie unter 2.15 beschrieben, isoliert. Die nach der Cre-vermittelten Rekombination stattgefundenen Ereignisse wurden mittels PCR (2.10.1) analysiert. In **Tabelle 3-2** sind die verwendeten Primerpaare und je nach Rekombinationsereignis die erwarteten Bandengrößen angegeben. In den Spuren 1, 3 und 5 sind die PCR Ansätze der COS-7 Zellen aufgetragen, die mit einem Cre-exprimierenden Plasmid transfiziert wurden. Die Spuren 2, 4 und 6 entsprechen den PCR Kontrollansätzen der COS-7 Zellen, die nicht mit einem Cre-exprimierenden Plasmid transfiziert worden sind.

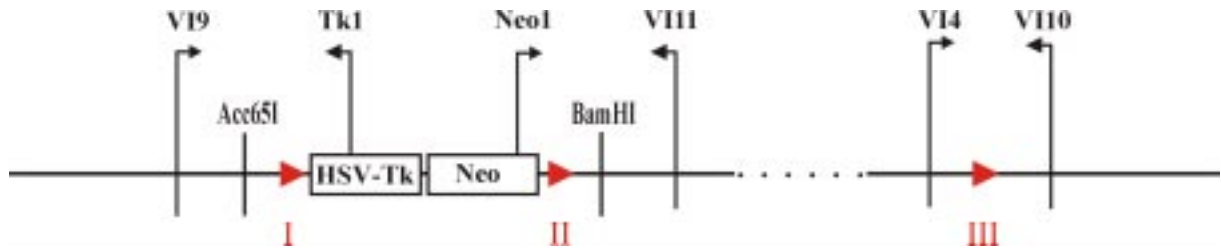


Tabelle 3-2 Primerpaare, die eingesetzt wurden um das jeweils stattgefundenere Rekombinationsereignis zu detektieren. Die erwarteten PCR Bandengrößen sind ebenfalls angegeben.

Spur	Rekombinationsereignis	Primerpaar	Größe des PCR Produkts
1	II + III	NeoI + VI10	215 bp
3	I + II	VI9+ VI11	375 bp
5	I + III	VI9 + VI10	390 bp

Die zugrundeliegende PCR Strategie ist in **Abbildung 3-3 A** dargestellt. Ein Aliquot jedes PCR Ansatzes wurde auf einem PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden konnten nach Ethidiumbromidfärbung unter UV Licht detektiert werden (siehe **Abbildung 3-3 B**).

A)



B)

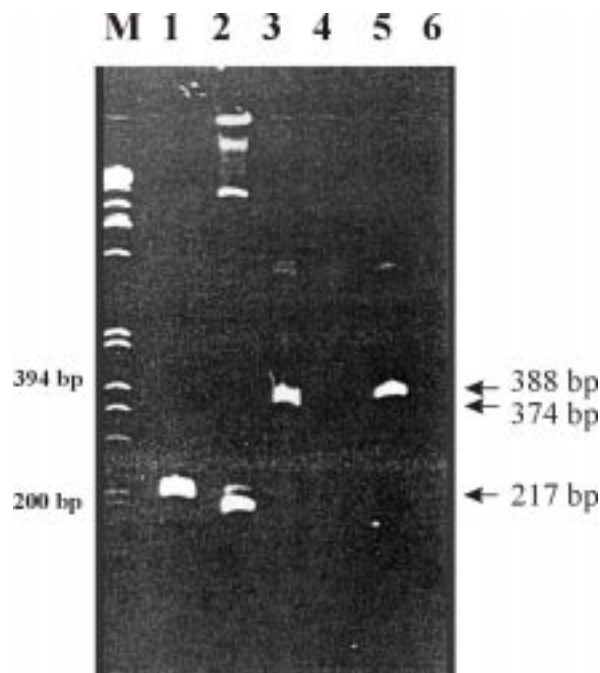


Abbildung 3-3 A) PCR Strategie und die verwendeten Primer zur Detektion der unterschiedlichen Ereignisse nach der Cre-vermittelten Rekombination. Das Primerpaar VI9/VII0 detektiert das Rekombinationsereignis zwischen loxP I und III, das Primerpaar VI9/VII1 detektiert das Ereignis zwischen loxP I und II und das Primerpaar Neo/VII0 detektiert das Ereignis zwischen loxP II und III. B) Amplifizierte PCR-Banden, die auf einem PAGE elektrophoretisch aufgetrennt wurden. M ist der kb-Marker (Gibco-BRL). In den Spuren 1, 3 und 5 sind Aliquots der unterschiedlichen PCR Ansätze der Zellen aufgetragen, die mit einer Cre-exprimierenden Plasmid transfiziert wurden: Spur 1 (Neo/VII0), Spur 3 (VI9/VII1), Spur 5 (VI9/VII0). In den Spuren 2, 4 und 6 sind die jeweiligen Kontrollansätze der Zellen aufgetragen, die nicht mit einem Cre-exprimierenden Plasmid transfiziert wurden: Spur 2 (Neo/VII0), Spur 4 (VI9/VII1) und Spur 6 (VI9/VII0).

Da drei loxP Seiten in den Targeting Vektor eingesetzt worden sind, sind auch drei Rekombinationsereignisse möglich. Wie aus **Abbildung 3-3** hervorgeht konnten alle drei Ereignisse mittels PCR nachgewiesen werden. Die Echtheit der Banden wurde durch Restriktionsverdau der eluierten DNS Fragmente überprüft. Das Primerpaar VI9 + VII1 bildet nur dann ein PCR Produkt, wenn eine Rekombination zwischen loxP I und loxP II

stattgefunden hat. Die sichtbare Bande (Spur 3 auf dem PAGE) entsprach der erwarteten Größe von 374 bp. Bei diesem Rekombinationsereignis wurde nur der Selektionsmarker deletiert. Das Primerpaar Neo1 und VII0 liefert nur ein PCR Produkt im Falle einer Rekombination zwischen loxP II und loxP III. Die Bandengröße von 217 bp entsprach ebenfalls der erwarteten Größe (Spur 1). Dieses Rekombinationsereignis entfernte nur die loxP-flankierten Exons, aber nicht den Selektionsmarker. Der Kontrollansatz zeigte zwar auch eine Bande (Spur 2), die aber deutlich kleiner war als das erwartete Produkt. Der Grund dafür ist wahrscheinlich eine unspezifische Bindung der Primer. Das dritte Primerpaar VI9 und VII0 kann nur ein PCR Produkt amplifizieren, wenn der Selektionsmarker zusammen mit den Exons deletiert wurde, wenn also eine Rekombination zwischen den loxP Seiten I und III stattgefunden hat. Das entstandene Produkt mit einer Größe von 388 bp entsprach auch hier der erwarteten Größe (Spur 5). Die Funktionalität der drei eingesetzten loxP Seiten in den Targeting Vektor konnte mit diesem Versuch bestätigt werden.

### **3.4 ES Zell Targeting**

Den Schritt bei dem der Targeting Vektor zunächst durch Elektroporation in die ES Zellen gelangt und dann die auf dem Vektor befindlichen Mutationen zielgerichtet über homologe Rekombination in das ES Zellgenom integriert werden, bezeichnet man als „*gene targeting*“ in ES Zellen. Für den Verlauf eines erfolgreichen ES Zell Targetings müssen optimale Voraussetzungen gewährleistet sein. Embryonale Stammzellen sind pluripotent, d.h. sie sind noch nicht differenziert. Dieser undifferenzierte Zustand muß für spätere Keimbahngängigkeit unbedingt erhalten bleiben. Das wird einerseits durch den Zusatz eines Leukämie-inhibierenden Faktors (LIF) ins Nährmedium (2.16.1) erreicht und andererseits durch einen Zellrasen aus sogenannten Feederzellen auf denen die ES Zellen wachsen können. Feederzellen geben bisher noch nicht eindeutig identifizierte Stoffe ins Medium ab, die die Differenzierung der ES Zellen verhindern. Als Feederzellen wurden embryonale Fibroblasten verwendet, die aus Embryos am Tag 14,5 *post coitum* hergestellt worden sind. Die Präparation und Kultivierung der Feederzellen ist unter 2.16.3 beschrieben.

#### **3.4.1 Erstes Targeting**

Für das ES Zell Targeting wurden ES Zellen der 10. Passage (Linie R1) verwendet. Die ES Zellen wurden vom *Samuel Lunefeld Research Institute* bezogen und zunächst in geeignetem Nährmedium und auf einem dichten Zellrasen aus Feederzellen kultiviert. Nach zweimaligem Passagieren war eine ausreichende Menge ES Zellen vorhanden, um das Targeting zu starten. Die Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Elektroporation in der 12. Passage. Es wurden  $1 \times 10^7$  ES Zellen geerntet und unter zwei verschiedenen Elektroporationsbedingungen elektroporiert (2.16.4). Der Targeting Vektor wurde vor der Elektroporation mit *NotI* linearisiert und unter der Sterilbank mit Ethanol präzipitiert (2.3.2). Pro

Elektroporationsansatz wurden 30 µg linearisierter Vektor transfiziert. 24 Stunden nach der Elektroporation wurde mit der Selektion begonnen. Dem Nährmedium wurde ab jetzt Neomycin zugegeben (finale Konzentration G418 im Medium: 400 µg/ml). 4 Tage nach der Elektroporation trat die Selektion ein. 8 Tage nach der Elektroporation wurden die ersten Neomycin-resistenten ES Zellklone isoliert und einzeln in 24-Lochplatten unter Selektionsdruck kultiviert. Weitere positive Klone wurden am 9. und am 11. Tag nach der Elektroporation isoliert und ebenfalls in 24-Lochplatten unter Selektionsdruck kultiviert. Insgesamt wurden ungefähr 300 positive (Neomycin-resistente) ES Zellklone isoliert. Ungefähr 4 Tage nach der Isolierung hatten sich die ersten Klone ausreichend vermehrt, um sie aufzuteilen. Beim Teilen wurden ca. 90% des Zellklons in einem Kryoröhrchen (Nunc) bei -80°C eingefroren, die restlichen 10% des Zellklons wurden so lange weiter kultiviert bis wiederum eine ausreichende Menge an Zellen vorhanden war, aus denen dann die DNS isoliert wurde. Die DNS der Zellklone wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI gespalten und die Fragmente über 0,6 %ige Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt (2.16.4).

### **3.4.1.1 Analyse der ES Zellklone mittels Southern Hybridisierung**

Die Gele wurden mittels Southern Blot geblottet, wodurch die DNS Fragmente auf eine Nylonmembran transferiert wurden. Die Durchführung ist unter 2.13 beschrieben.

#### **3.4.1.1.1 Southern Hybridisierung mit der 5' Sonde**

Die Nylonmembranen wurden zunächst mit der 5' Sonde hybridisiert. Folgendes Bandenmuster wurde nach einem erfolgreichen Targeting erwartet. Im Wildtyp detektiert die 5' Sonde ein 9 kb großes Fragment. Nach Integration des 5 kb großen Selektionsmarkers an der vorhergesagten Stelle vergrößert sich die Bande auf 14 kb. Das bedeutet positive ES Zellklone sollten nach der Southern Hybridisierung zwei Banden zeigen, eine bei 9 kb für das Wildtyp Allel und eine bei 14 kb für das mutierte Allel.

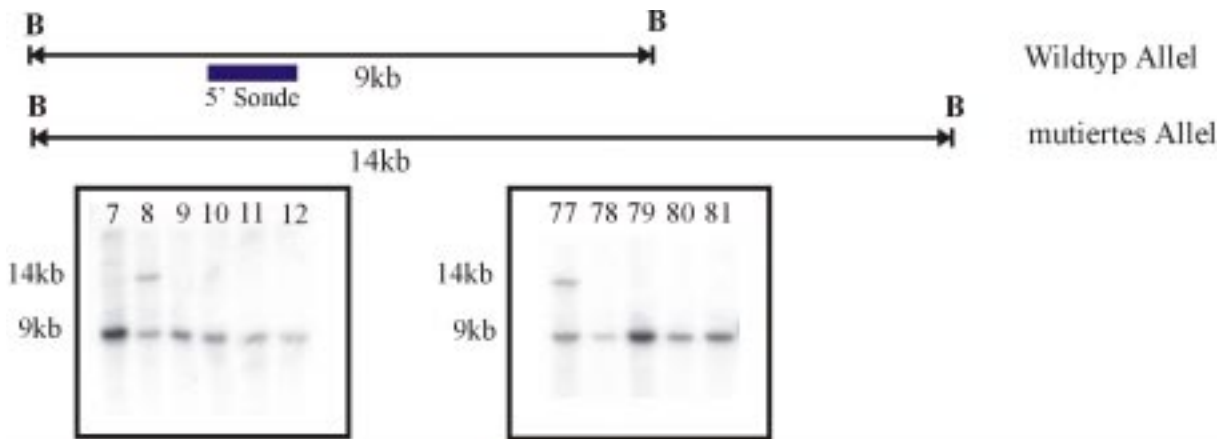


Abbildung 3-4 Beispiele der Southern Hybridisierungen mit der 5' Sonde. Die Bande bei 9 kb entspricht dem Wildtyp, die Bande bei 14 kb dem mutierten Allel, nach Integration des Selektionsmarkers. Die angegebenen Nummern entsprechen den jeweiligen ES Zellklonen.

Wie beispielhaft in Abbildung 3-4 dargestellt, gingen folgende Ereignisse aus der Southern Hybridisierung mit der 5' Sonde hervor. Insgesamt war bei 256 Klonen die DNS Isolierung und die anschließende Southern Hybridisierung erfolgreich. Fünf Klone (8, 77, 94, 175 und 284) hatten den Selektionsmarker an der richtigen Stelle im ES Zellgenom integriert.

#### 3.4.1.1.2 Southern Hybridisierung mit der 3' Sonde

Zur Überprüfung, ob zusammen mit dem Selektionsmarker auch die einzelne loxP Seite an der richtigen Stelle in das Genom integriert wurde, war eine weitere Southern Hybridisierung notwendig. In diesem Fall wurde mit der 3' Sonde hybridisiert. Die Vorgehensweise war genauso wie unter 3.4.1.1.1 beschrieben. Das erwartete Bandenmuster sollte folgendermaßen aussehen. Das Wildtyp Allel entspricht einer Bande von 11 kb, die sich bei richtiger Integration im mutierten Allel auf 8 kb verkleinert. Der Grund dafür ist eine zusätzlich eingesetzte *Bam*HI Schnittstelle vor die loxP Seite. Die Ergebnisse der Southern Hybridisierung sind in **Abbildung 3-5** dargestellt.

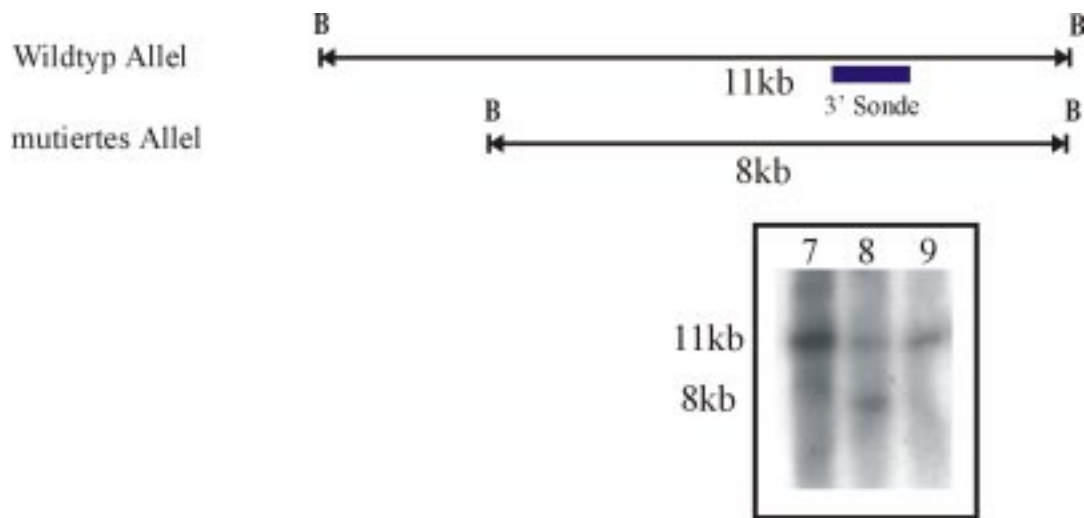


Abbildung 3-5 Ergebnisse der Southern Hybridisierungen mit der 3' Sonde als Beispiel für die ES Zelleklone 7, 8 und 9. Die 11 kb Bande entspricht dem Wildtyp, die 8 kb Bande dem mutierten Allel, nach der Integration der einzelnen loxP Sequenz an der vorhergesehenen Stelle in Genom der ES Zellen.

Die Ergebnisse der Southern Hybridisierung mit der 3' Sonde zeigten, dass insgesamt zwei der fünf Klone, Klon 8 und Klon 94 zusätzlich zum Selektionsmarker die einzelne loxP Seite 3' terminal von Exon 15 integriert haben.

#### 3.4.1.1.3 Southern Hybridisierung mit der neo Sonde

In einer letzten Southern Hybridisierung wurde bestätigt, dass der Selektionsmarker nur einmal im Genom der ES Zellen integriert worden ist. Dazu wurde die DNS der fünf positiven Klone (8, 77, 94, 175 und 284) wiederum mit *Bam*HI geschnitten, über ein 0,6 %iges Agarosegel aufgetrennt und mit der neo Sonde hybridisiert. Die neo Sonde (634 bp) wurde aus dem codierenden Bereich des Neomycinresistenzgens mittels Restriktionsverdau mit *Pst*I hergestellt. Die Ergebnisse dazu sind in **Abbildung 3-6** dargestellt.

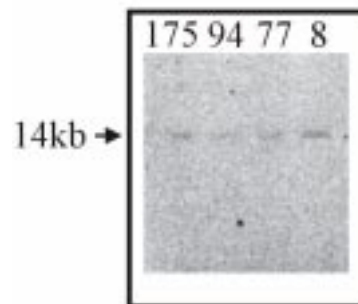


Abbildung 3-6 Ergebnisse der Southern Hybridisierung der Klone 8, 77, 95 und 175 mit der neo Sonde. Eine Bande mit einer Größe von 14 kb wird detektiert, wenn der Selektionsmarker nur an der vorhergesagten Stelle integriert worden ist.

Alle fünf Klone zeigten nur eine Bande bei 14 kb, die der Größe der mutierten Bande entsprach. Demzufolge wurde in allen fünf Klonen der Selektionsmarker nur einmal an der vorgesehenen Stelle im Genom integriert.

### 3.4.2 Zweites Targeting

In einem zweiten ES Zell Targeting wurde die Cre-vermittelte Rekombination durchgeführt. Ziel dieser ortsspezifischen Rekombination war einerseits die Entfernung des Selektionsmarkers, um einen heterozygot „gefloxten“  $\alpha_{1C}$  Genort zu erhalten und andererseits die Entfernung des Selektionsmarkers zusammen mit den Exons 14 und 15 und der dazwischenliegenden DNS, um Zellklone mit einem heterozygot zerstörten  $\alpha_{1C}$  Gen zu erhalten. Der aus dem ersten Targeting positiv hervorgegangene Klon 8 wurde wieder in geeignetem Nährmedium auf einem Zellrasen aus Feederzellen ausgesät. Als eine ausreichende Zellzahl erreicht worden war, wurden die ES-Zellen, die sich mittlerweile in der 18. Passage befanden, mit zwei verschiedenen Cre-exprimierenden Plasmiden elektroporiert.  $0,5 \times 10^7$  Zellen wurden mit dem Plasmid pIC Cre elektroporiert und  $0,5 \times 10^7$  Zellen wurden mit dem Plasmid pBK CMV Cre elektroporiert (beschrieben unter 2.16.5). Die beiden Plasmide unterschieden sich in dem Promoter, der die Expression der Cre Rekombinase reguliert. Die Plasmide wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Robert Feil zur Verfügung gestellt. Nach der Elektroporation wurden von jedem der beiden Ansätze unterschiedliche Zellzahlen auf Petrischalen ausplattiert. Folgende Verdünnungen wurden ausgewählt:  $1 \times 10^6$  Zellen,  $0,5 \times 10^6$  Zellen,  $0,5 \times 10^6$  Zellen  $0,3 \times 10^6$  Zellen,  $0,1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale. Ungefähr 48 Stunden nach der Elektroporation wurde mit der Selektion begonnen. Dem Nährmedium wurde Ganciclovir (finale Konzentration  $0,2 \mu\text{M}$ ) zugegeben und die Zellen damit inkubiert. Ganciclovir ist für die Zellen toxisch, die die Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus Typ I in ihrem Genom integriert haben. Das bedeutet es sterben alle

Zellen ab, die nicht mit einem Cre-exprimierenden Plasmid transfiziert worden waren oder bei denen die Cre-vermittelte Rekombination zwischen den loxP Seiten II und III stattfand, was zur Deletion der Exons 14 und 15, aber nicht zur Deletion des Selektionsmarkers führte. Die Entwicklung der Zellen auf einer Kontrollplatte, die weiterhin Medium ohne Ganciclovir enthielten, wurde parallel beobachtet. 4 Tage nach der Elektroporation trat die Selektion ein. Am 10. und 11. Tag nach der Elektroporation entwickelten sich Ganciclovir-resistente Zellklone, die isoliert wurden und einzeln in 24-Lochplatten weiter unter Selektionsdruck inkubiert wurden. Insgesamt wurde 166 Ganciclovir-resistente Klone isoliert, die 4 Tage später aufgeteilt werden konnten. Sobald die Klone nach dem Aufteilen bis zu einer ausreichenden Zellzahl herangewachsen waren, wurde die DNS isoliert, mit *Bam*HI gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert.

### 3.4.2.1 Analyse der ES Zellklone mittels Southern Hybridisierung

Zur Aufklärung, bei welchen ES Zellklonen welches Cre-vermittelte Rekombinationsereignis tatsächlich stattgefunden hat, wurden die ES Zellen nach dem Targeting wiederum mittels Southern Hybridisierung analysiert. Aufgrund der Ganciclovir-Selektion konnten nur Klone zwei verschiedener Rekombinationsereignisse überlebt haben (vgl. 3.4.2). Entweder wurde nur der Selektionsmarker deletiert oder der Selektionsmarker zusammen mit den Exons.

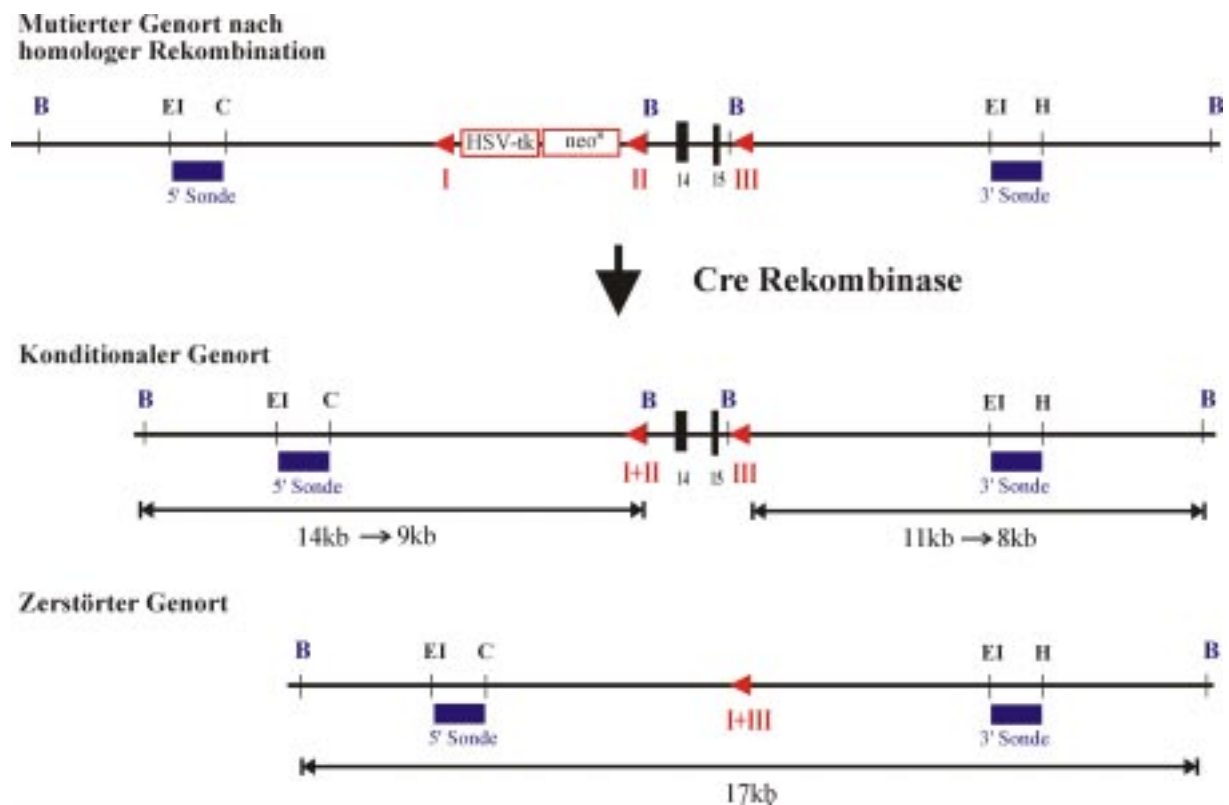


Abbildung 3-7 Strategie der Southern Hybridisierung und die Bandengrößen, die je nach Rekombinationsereignis nach erfolgter Hybridisierung mit der 5' und der 3' Sonde erwartet werden. Blaue Rechtecke: 5' und 3' Sonden; rote Pfeile: loxP Sequenzen.



### 3.4.2.1.1 Southern Hybridisierung mit der 5' Sonde

Die Nylonmembranen wurden zunächst wieder mit der 5' Sonde hybridisiert. Der Ausgangsklon Klon 8, zeigte nach dem ersten Targeting zwei Banden nach der Hybridisierung mit der 5' Sonde, aufgrund der Integration des 5 kb großen Selektionsmarkers. Ist dieser Marker im zweiten Targeting nun deletiert worden, dann tritt nur noch eine Bande bei 9 kb auf. Ist der Marker allerdings zusammen mit den Exons entfernt worden, so tritt zusätzlich zur 9 kb Wildtyp Bande eine 17 kb Bande auf, da gleichzeitig mit den Exons zwei *Bam*HI Schnittstellen entfernt worden sind. Die **Abbildung 3-8** zeigt Beispiele für verschieden rekombinierte ES Zellklone.

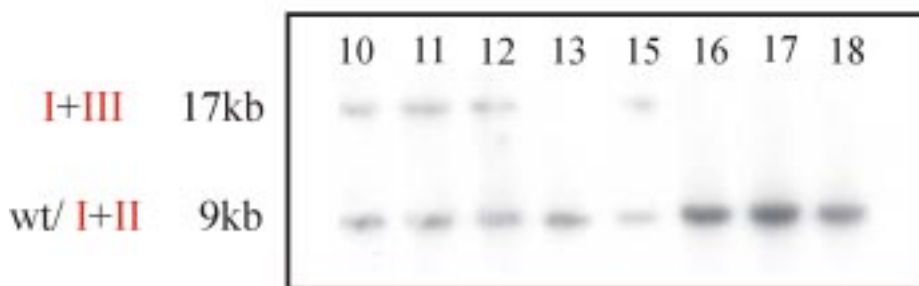


Abbildung 3-8 Die Ergebnisse der Southern Hybridisierungen mit der 5' Sonde sind als Beispiel für die Klone 10 bis 18 dargestellt. Die 9 kb Bande entspricht dem Wildtyp und der mutierten Bande, falls die Cre-vermittelte Rekombination zwischen loxP I und II stattgefunden hat. Die 17 kb Bande wird detektiert, wenn die Rekombination zwischen loxP I und III stattgefunden hat.

Die Klone 13, 16, 17 und 18 zeigten nur eine Bande bei 9 kb, d.h. es wurde nur der Selektionsmarker entfernt. Die Klone 10, 11, 12 und 15 dagegen, zeigten eine Doppelbande, eine Bande bei 9 kb für das Wildtyp Allel und eine Bande bei 17 kb, für das mutierte Allel. Bei diesen Klonen wurde offensichtlich der Selektionsmarker zusammen mit den Exons deletiert.

### 3.4.2.1.2 Southern Hybridisierung mit der 3' Sonde

Die Hybridisierung mit der 3' Sonde bestätigte die Ergebnisse aus 3.4.1.1.1 und sind in **Abbildung 3-9** dargestellt. Klone, die nur den Selektionsmarker deletiert haben, also nur noch zwei einzelne loxP Seiten, eine 5' terminal von Exon 14 und eine 3' terminal von Exon 15 im Genom integriert haben, zeigten nach der Hybridisierung mit der 3' Sonde im Vergleich zum ersten Targeting (3.4.1.1.2), keine Veränderung im Bandenmuster, da die dritte, einzelne loxP Seite an diesem Rekombinationsereignis nicht beteiligt war. Die Wildtyp Bande liegt bei 11 kb und die mutierte Bande bei 8 kb. Klone, bei denen allerdings zusätzlich die Exons 14 und

15 herausgeschnitten wurden, zeigten ebenfalls wie die Hybridisierung mit der 5' Sonde (3.4.2.1.1) die 17 kb Bande für das mutierte Allel und die Wildtyp Bande bei 11 kb.

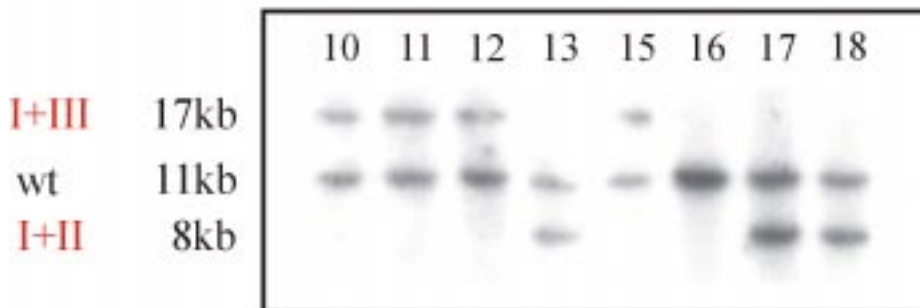


Abbildung 3-9 Ergebnisse der Southern Hybridisierung mit der 3' Sonde. Die 11 kb Bande entspricht der Wildtyp Bande, die 17 kb Bande entspricht der mutierten Bande nach Cre-vermittelter Rekombination zwischen loxP I und III (vgl. Abbildung 3-8) und die 8 kb Bande entspricht der mutierten Bande nach Rekombination zwischen loxP I und II (vgl. Abbildung 3-5).

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der Southern Hybridisierungen aller Klone, dass nach dem zweiten Targeting bei ungefähr 60% der ES Zellklone eine Rekombination zwischen den äußeren beiden loxP Seiten stattgefunden hat. Diese ES Zellklone waren demnach heterozygot (+/-), sie haben ein Wildtyp Allel und ein Allel mit einem zerstörten  $\alpha_{1C}$  Gen. Bei ungefähr 40% der Zellen hat die Rekombination zwischen der ersten und der zweiten loxP Seite stattgefunden. Diese Zellen sind deshalb heterozygot „gefloxt“, d.h. sie haben ein Wildtyp Allel und ein Allel, dessen  $\alpha_{1C}$  Gen zwei gleichgerichtete loxP Seiten enthält, die die Exons 14 und 15 flankieren.

### 3.4.2.1.3 Southern Hybridisierung mit der **EcoRI** Sonde

In einer letzten Southern Hybridisierung wurden die heterozygot „gefloxt“ (+/+<sup>flox</sup>) ES Zellklone mit einer weiteren Sonde (*EcoRI* Sonde) hybridisiert. Das Bandenmuster zeigte für diese Klone nach der Southern Hybridisierung mit der 5' Sonde eine Bande bei 9 kb, die sowohl dem Wildtyp, als auch dem rekombinierten Allel entspricht. Der Genotyp (+/+<sup>flox</sup>) wurde deshalb vor der Injektion noch einmal mit einer zusätzlichen Sonde überprüft. Die verwendete Sonde wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *Acc65I* hergestellt (siehe **Abbildung 3-1**) und liegt 5' terminal von Exon 14. Die DNS der ES Zellklone wurde statt mit *BamHI* mit *EcoRI* gespalten. Ansonsten verlief die Durchführung wie unter 3.4.2.1.1 beschrieben. Die Lokalisation der Sonde innerhalb des Genoms ist in Abbildung 3-10 dargestellt.

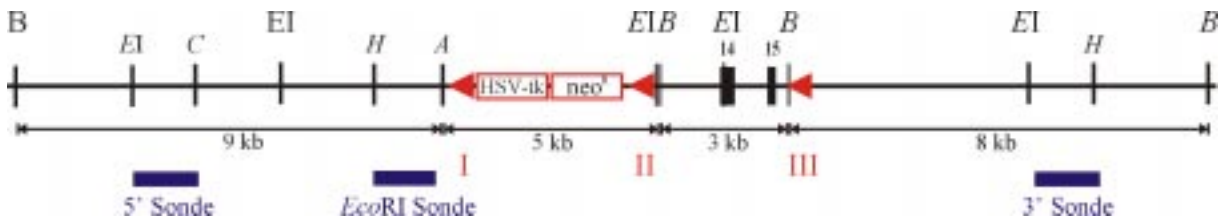


Abbildung 3-10 Lokalisation der für Southern Hybridisierungen verwendeten Sonden: 5' Sonde, *EcoRI* Sonde und 3' Sonde.

Die mit der *EcoRI* Sonde erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 3-11 gezeigt.

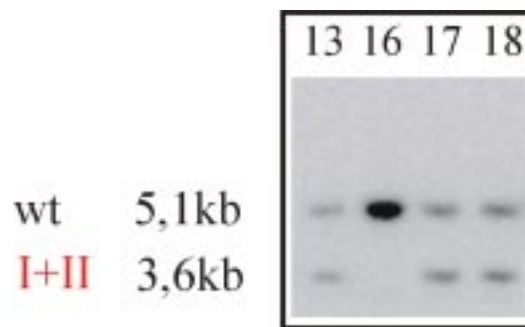


Abbildung 3-11 Ergebnisse der Southern Hybridisierung der konditionalen Klone 13, 16, 17 und 18 mit der *EcoRI* Sonde. Die 5,1 kb Bande entspricht der Wildtyp Bande, die 3,6 kb Bande entspricht der mutierten Bande nach Cre-vermittelter Rekombination zwischen loxP I und II.

Die *EcoRI* Sonde detektiert eine WT Bande bei 5,1 kb. Nach der Deletion des Selektionsmarkers blieb zusammen mit der loxP Seite eine zusätzlich *EcoRI* Schnittstelle im Genom erhalten, so dass die mutierte Bande, die mit der *EcoRI* Sonde detektiert wird, eine Größe von 3,6 kb hat. Die Klone 13, 17 und 18 waren also heterozygot „gefloxt“.

### 3.5 Injektion positiver ES Zellklone in Blastozysten

Nach dem zweiten Targeting wurden folgende ES Zellklone, die nach den Southern Hybridisierungen mit der 5' Sonde, der 3' Sonde und der *EcoRI* Sonde eindeutig einen heterozygot „geflochten“  $\alpha_{1C}$  Genotyp (+/+<sup>flox</sup>) zeigten für die Injektion in Blastozysten vorbereitet, d.h. aufgetaut und wieder kultiviert (2.16): Klon #105 (Genotyp +/+<sup>flox</sup>) und Klon #132 (Genotyp +/+<sup>flox</sup>). Klon #77 zeigte nach den Southern Hybridisierungen mit der 5' und der 3' Sonde eindeutig den heterozygot zerstörten  $\alpha_{1C}$  Genotyp (+/-) und wurde ebenfalls für die Injektion in Blastozysten vorbereitet.

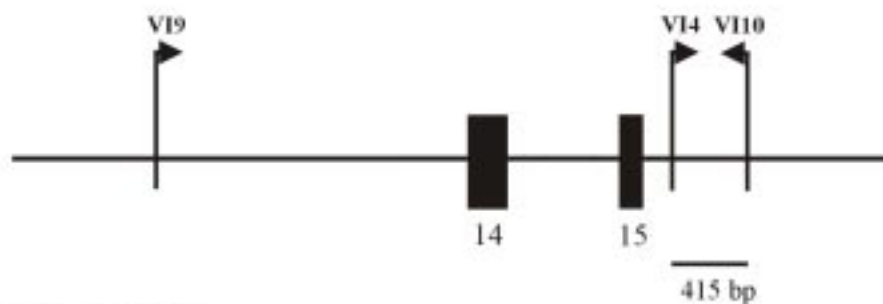
Die Mikroinjektion der genetisch modifizierten ES Zellen in die Blastozysten wurde von Frau Susanne Kühbandner 2.17.2 durchgeführt. Es wurden bei 19 Leihmüttern Blastozysten mit genetisch modifizierten ES Zellen reimplantiert. Welcher Mausstamm dabei für welchen Schritt verwendet wurde, ist unter 2.17.2 beschrieben. Ein Schema zum gesamten Ablauf ist in **Abbildung 2-2** dargestellt. Daraus gingen zahlreiche chimäre Mäuse hervor. Männchen, die 80 bis 90 % chimär waren, d.h. der Anteil an gelbem Fell entsprechend hoch war, wurden mit C57BL/6 Weibchen rückgekreuzt.

### 3.6 Genotypisierung „agouti-farbener“ Nachkommen

Das Auftreten „gelber“ Nachkommen aus der Rückkreuzung mit „schwarzen“ Weibchen bestätigte die Keimbahngängigkeit der modifizierten ES Zellen (SV129). Da die ES Zellen nach dem Targeting genotypisch heterozygot bezüglich der eingeführten Mutation waren, wurden die Nachkommen mittels PCR genotypisiert. Unter den „gelben“ Nachkommen konnten sowohl WT, als auch heterozygot mutierte Mäuse sein. Zur PCR Analyse wurde aus Mausgewebe die DNS isoliert (2.17.3).

#### 3.6.1 Genotypisierung der $\alpha_{1C}$ (+/+<sup>flox</sup>) Mäuse

Wildtyp Allel



„gefloxtes“ Allel

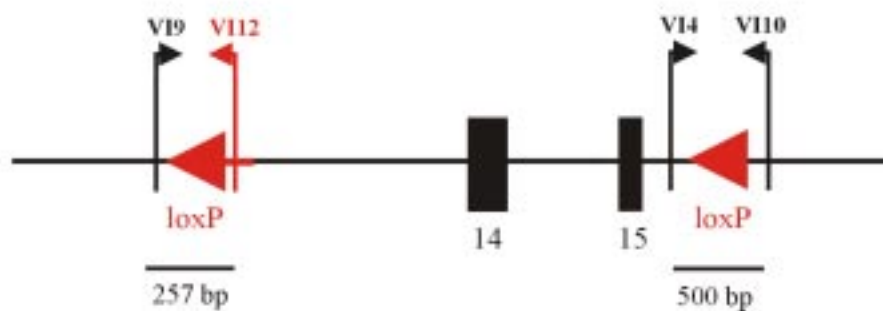


Abbildung 3-12 PCR Strategie mit der die „gefloxten“ Nachkommen aus der Rückkreuzung chimärer Männchen mit C57BL/6 Weibchen genotypisiert wurden. Das Primerpaar V19/V112 amplifiziert die 5'

terminale loxP Sequenz (257 bp), das Primerpaar VI9/VI12 amplifiziert sowohl die Wildtypsequenz (415 bp) als auch die 3' terminale loxP Sequenz (500 bp).

Wie aus der in **Abbildung 3-12** gezeigten PCR Strategie hervorgeht, amplifiziert das Primerpaar VI9/VI12 nur das „gefloxte“ Allel, da der Primer VI12 nicht im WT bindet. Das Primerpaar VI4/VI10 bildet im „gefloxten“ Fall eine Doppelbande, 415 bp für das WT Allel und 500 bp für die loxP Seite. Die Ergebnisse der PCR sind in **Abbildung 3-13** dargestellt.

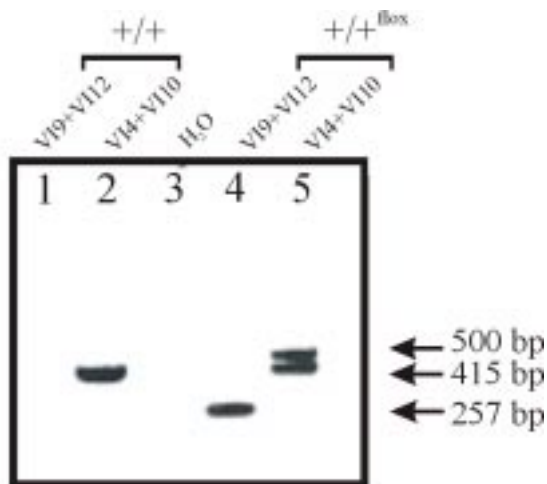


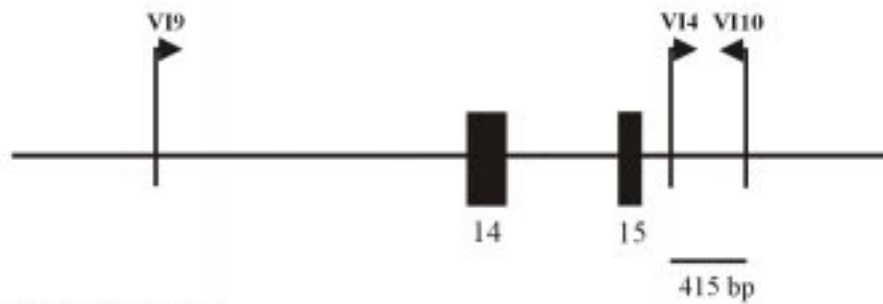
Abbildung 3-13 Ergebnisse der PCR mit den Primerpaaren VI9/VI12 und VI4/VI10.

Innerhalb eines Wurfs traten wie erwartet  $+/+$  und  $+/+^{\text{lox}}$  Mäuse auf.

### 3.6.2 Genotypisierung der $\alpha_{1C}$ (+/-) Mäuse

Die heterozygoten (+/-) Mäuse wurden ebenfalls mittels PCR analysiert (2.17.3). Wie in **Abbildung 3-14** gezeigt wurde, wurde zur Amplifizierung des WT Allels ebenfalls das Primerpaar VI4/VI10 eingesetzt. Das amplifizierte PCR Produkt hatte die erwartete Größe von 415 bp. Die einzelne loxP Seite, die nach der Cre-vermittelten Deletion der Exons 14 und 15 auf dem mutierten Allel noch vorhanden war, wurde mit dem Primerpaar VI9/VI10 amplifiziert. Die Bande hatte eine Größe von 390 bp. Die Ergebnisse dieser PCR sind in **Abbildung 3-15** gezeigt.

Wildtyp Allel



"knock out Allel"

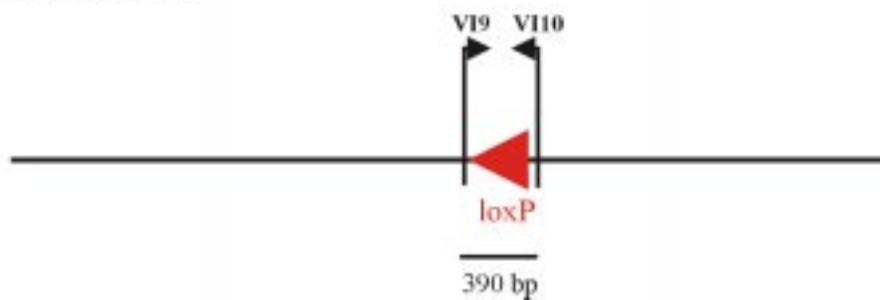


Abbildung 3-14 PCR Strategie zur Genotypisierung der  $\alpha_{1c}$  (+/-) Mäuse. Das Primärpaar V14/V19 amplifiziert die Wildtypsequenz (415 bp), das Primärpaar V19/V110 amplifiziert die loxP Sequenz (390 bp), die nach Cre-vermitteltem Deletion des Selektionsmarkers und der Exons zurückbleibt.

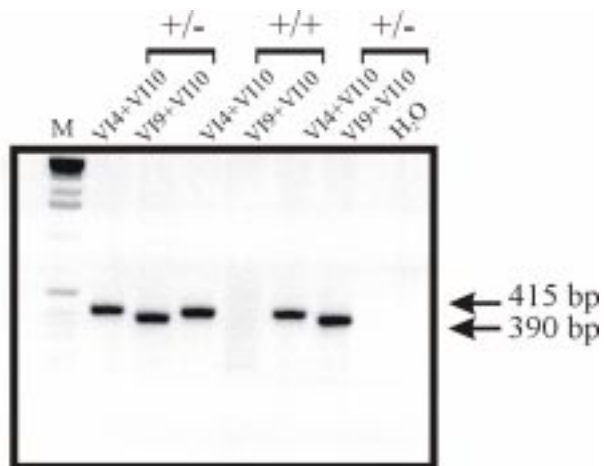


Abbildung 3-15 PCR Produkte der Primärpaare V14/V110 und V19/V110.

Mäuse, die heterozygot (+/-) bezüglich des  $\alpha_{1c}$  Gens waren, waren phänotypisch nicht von den (+/+) Mäusen zu unterscheiden. In Größe, Entwicklung und Verhalten waren (+/+) und (+/-) Mäuse gleich. Beide Mauslinien waren fertil.

### 3.7 Analyse der „geflochten“ und (+/-) Mäuse

#### 3.7.1 Weitere Verpaarungen der $\alpha_{1C}$ (+/+<sup>flox</sup>) Mäuse

Die heterozygoten +/+<sup>flox</sup> Mäuse waren lebensfähig und fertil. Sie wurden weiter verpaart, um zu bestätigen, dass der Einsatz der loxP Seiten keinerlei Einfluß auf den Phänotyp der Mäuse hat. Die Ergebnisse der Genotypisierung eines Wurfs aus einer Verpaarung mit (+/+<sup>flox</sup>) Mäusen sind in **Abbildung 3-16** gezeigt.

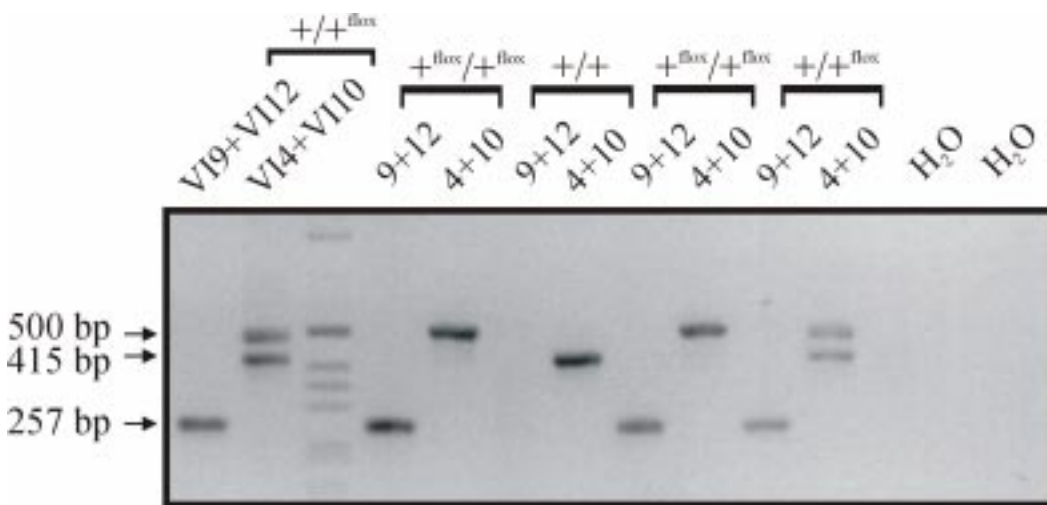


Abbildung 3-16 PCR der Nachkommen nach Verpaarung zweier (+/+<sup>flox</sup>) Mäuse.

Die PCR Analysen der Nachkommen zeigten, dass auch homozygot „geflochte“ (+<sup>flox</sup> /+<sup>flox</sup>) Mäuse lebensfähig, und phänotypisch nicht von den Wildtyp Mäusen unterscheidbar waren. Zusätzlich wurden die +/+<sup>flox</sup> Mäuse mit +/- Mäusen verpaart. Die **Abbildung 3-17** zeigt Southern Hybridisierungen, mit denen unterschiedliche Genotypen detektiert wurden.

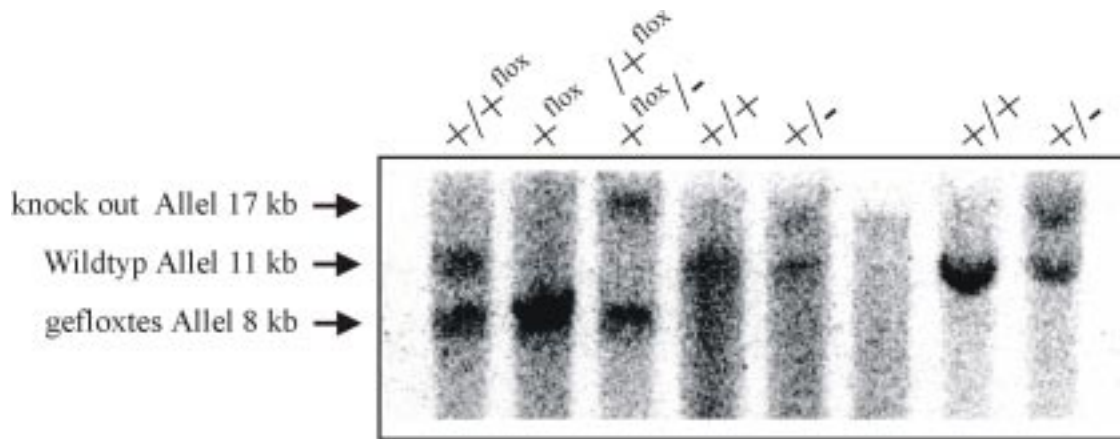


Abbildung 3-17 Southern Hybridisierungen mit der 3' Sonde. Die Nachkommen aus  $(+ / +^{flox})$ , Verpaarungen untereinander und  $(+ / +^{flox})$  mit  $(+ / -)$  wurden genotypisiert. Die 17 kb Bande entspricht der knock out Bande, nach Cre-vermittelter Deletion (vgl. Abbildung 3-9); die 11 kb Bande dem Wildtyp und die 8 kb Bande dem utierten Bande (vgl. Abbildung 3-5). Die Genotypen  $(+ / +^{flox})$ ,  $(+^{flox} / +^{flox})$ ,  $(+^{flox} / -)$ ,  $(+ / +)$  und  $(+ / -)$  wurden detektiert.

Auch heterozygote  $(+^{flox} / -)$  Mäuse, bei denen ein Allel des  $\alpha_{1C}$  Gens zerstört und das andere „gefloxt“ wurde, sind normal lebensfähig und fertil. Folglich beeinflusste die Insertion der loxP Seiten die Entwicklung der Mäuse nicht.

### 3.7.2 RNS Analysen der $\alpha_{1C}$ $(+^{flox} / +^{flox})$ Mäuse

Zur Bestätigung, dass das Exon/ Intron Spleißen durch den Einsatz der loxP Sequenzen nicht beeinflusst worden ist, wurde aus homozygot „geflochten“  $(+^{flox} / +^{flox})$  Mäusen RNS isoliert (2.14.1). Aus der RNS wurde wie unter 2.14.2 beschrieben, cDNA hergestellt, mit der unterschiedliche PCRs durchgeführt wurden. Amplifiziert wurden in einem Ansatz die Exons 14 und 15 und in einem anderen Ansatz die Exons 15 und 16. Die **Abbildung 3-18** zeigt die PCR Produkte.



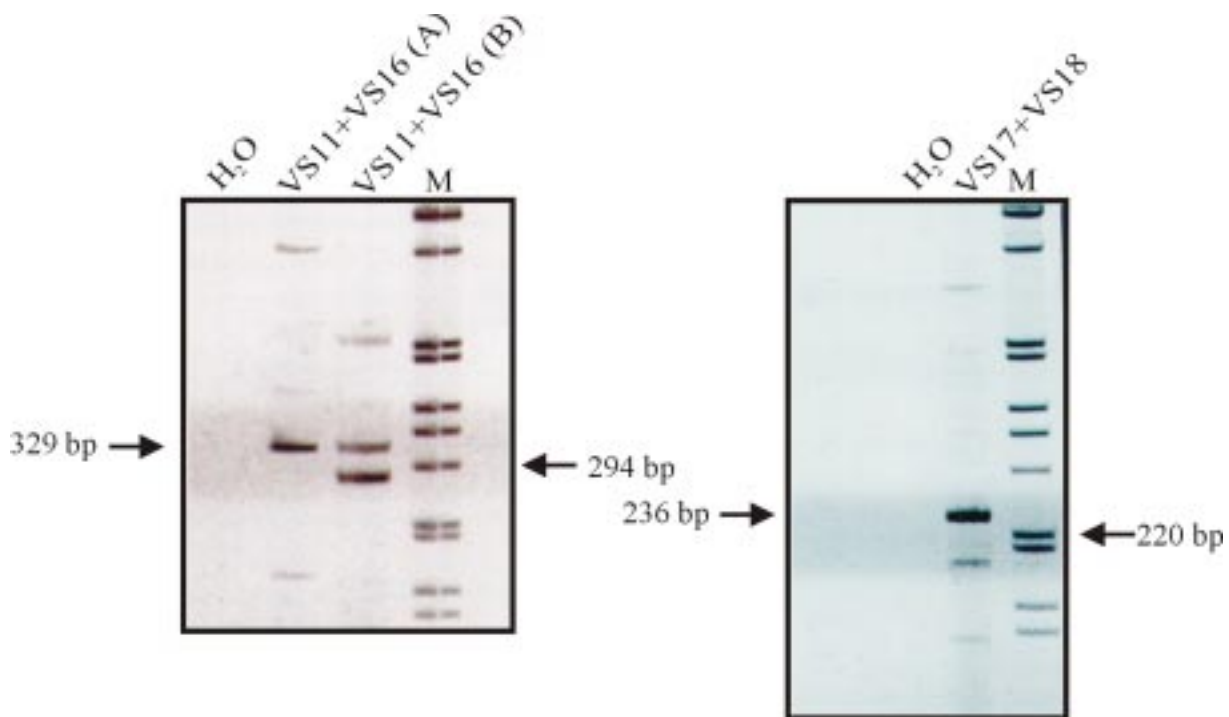


Abbildung 3-18 Ergebnisse der PCR mit den Primernpaaren VS11/VS16 und VS17/VS18. M entspricht in beiden Abbildungen dem DNS-Marker (Gibco-BRL) und H<sub>2</sub>O dem Wasserwert. VS11/VS16 (A) amplifizierte die Exons 14 und 15 (329 bp) von einer oligo-dT geprinten cDNA. VS11/VS16 (B) amplifizierte die Exons 14 und 15 (329 bp) von einer VS13-geprinten cDNA. Der Primer VS13 bindet an das 3' Ende von Exon 17 (siehe Anhang). Das Primernpaar VS17/VS18 amplifizierte die Exons 15 und 16 (236 bp) von einer oligo-dT geprinten cDNA.

Die Primer VS11 und VS16 amplifizierten ein PCR Produkt mit einer Größe von 329 bp, was den Exons 14 und 15 entsprach. Die Primer VS17 und VS18 amplifizierten ein PCR Produkt mit einer Größe von 227 bp, was den Exons 15 und 16 entsprach. Mit geeigneten Restriktionsenzymen wurden die PCR Banden geschnitten und der Restriktionsansatz zur Detektion der verschiedenen Fragmentgrößen auf ein PAGE aufgetragen. Das Auftreten der erwarteten Restriktionsfragmente bestätigte, dass die amplifizierten PCR Banden den Exons entsprachen. Die zusätzlich aufgetretenen Banden resultierten aus unspezifischer Primerbindung.

Zusammenfassend wurde also festgestellt, dass die Insertion der beiden loxP Seiten innerhalb der Introns an der richtigen Stelle im Genom der Mäuse, nämlich 5' terminal von Exon 14 und 3' terminal von Exon 15, stattfand und dass die Integration das Exon/ Intron Spleißen nicht beeinflusste. Die homozygot „gefloxten“ Mäuse sind lebensfähig, fertil und phänotypisch nicht vom Wildtyp unterscheidbar. Diese Mauslinie steht jetzt zur Verfügung, für weitere Verpaarungen mit Cre-exprimierenden Mäusen, um dadurch die  $\alpha_{1C}$  Untereinheit konditional, d.h. gewebespezifisch und/ oder zeitlich kontrolliert zu inaktivieren.

### 3.7.3 Weitere Verpaarungen der (+/-) Mäuse

Zahlreiche Verpaarungen von (+/-) Mäusen miteinander führten zu keinen lebensfähigen (-/-) Nachkommen. Von 112 Nachkommen waren 80 (+/-), 42 (+/+) und 0 (-/-).

Aus diesem Ergebnis kann folglich geschlossen werden, dass der  $\alpha_{1C}$  L-Typ Kalziumkanal für die Entwicklung lebensfähiger Mäuse absolut notwendig ist.

### 3.8 Charakterisierung der $\alpha_{1C}$ (-/-) Embryos

Die  $\alpha_{1C}$  Untereinheit wurde vor Beginn und auch noch während dieser hier vorgestellten Arbeit von Frau Dr. Seisenberger auf konventionellem Weg zerstört, was ebenfalls zu einem letalen Phänotyp führte. Weitere Analysen der Embryos zeigten, dass die (-/-) Embryos am Tag 14,5 p.c. starben und bis zu diesem Zeitpunkt das Herz bei allen (+/+), (+/-) und (-/-) Embryos schlug. Diese und weitere Resultate waren sehr überraschend. Deshalb sollten die bis dahin bekannten Ergebnisse aus dem konventionellen knock out (k. o.) Ansatz mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten (+/-) Mäuse bestätigt werden. Der Unterschied der beiden Geninaktivierungen lag darin, dass bei der konventionellen Geninaktivierung ein Neomycinresistenzgen in das 3. Exon, welches das erste Transmembransegment der  $\alpha_{1C}$  Untereinheit codiert, eingesetzt worden ist. Dadurch wurde die Genstruktur des  $\alpha_{1C}$  Gens zerstört. Bei der in der vorliegenden Arbeit erzeugten Maus sind die Exons 14 und 15 mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems deletiert worden, wodurch der Kalziumkanal ebenfalls zerstört wurde (Seisenberger et al., 2000).

Zahlreiche Verpaarungen von heterozygoten (+/-) Mäusen, denen auf einem Allel die Exons 14 und 15 fehlten, führten, wie unter 3.7.3 gezeigt, auch in diesem Fall zu keinen lebensfähigen (-/-) Mäusen, was mit dem ersten Ansatz der klassischen Geninaktivierung übereinstimmte. Um den schon aus dem ersten k. o. Ansatz bekannten Zeitpunkt, wann die (-/-) Embryos während der Schwangerschaft starben, nämlich am Tag 14 p.c., zu bestätigen, wurden Embryos am Tag 12,5 und 14,5 p.c. aus dem Uterus isoliert und mittels PCR genotypisiert. Am Tag 12,5 p.c. lebten alle Embryos, sie waren in Form, Größe und Entwicklungsstand zu diesem Zeitpunkt voneinander nicht unterscheidbar. Bei allen schlug das Herz mit ähnlicher Frequenz. Am Tag 14,5 p.c. dagegen waren die (-/-) Embryos bereits verstorben.

#### 3.8.1 Färbungen von Embryoschnitten von (+/-) und (-/-) Embryos

Zur weiteren Analyse der Embryos wurden am Tag 14,5 p.c. Embryos aus der Mutter isoliert und in Paraffin eingebettet (2.18.1). Die PCR Analyse der Embryos bestätigte, dass was auf den ersten Blick vermutet wurde. Eines der Embryos war (+/-), normal in Größe und Form, das zweite Embryo war (-/-), morphologisch nicht mehr einwandfrei, kleiner und weitgehend

blutleer. Von beiden Embryos wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden gefärbt, mikroskopiert und anschließend fotografiert. In **Abbildung 3-19** sind die Ergebnisse dargestellt.

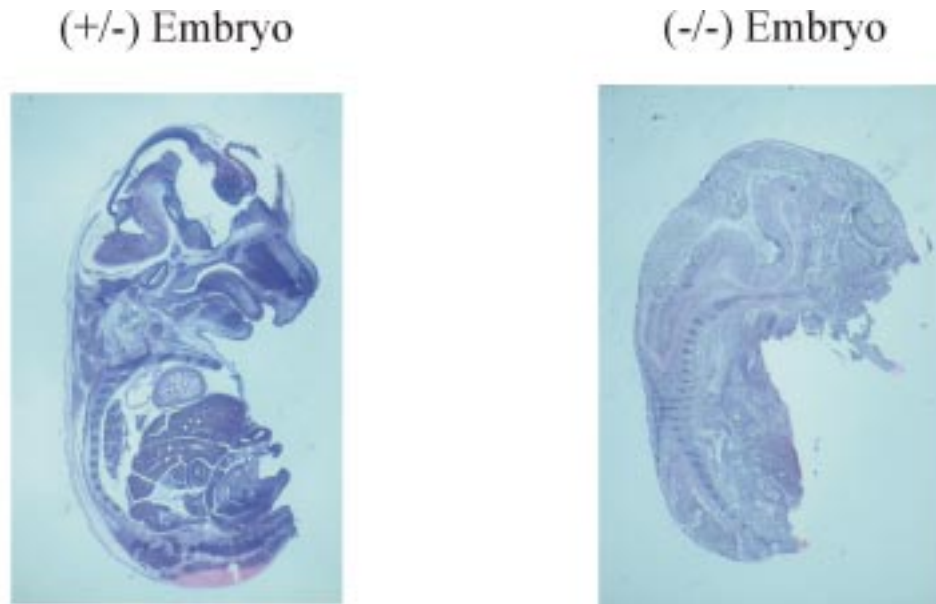


Abbildung 3-19 Hämatoxylin / Eosin gefärbte Paraffinschnitte eines (+/-) und eines (-/-) Embryos, die am Tag 14,5 p.c. isoliert wurden.

Die **Abbildung 3-19** zeigt deutlich, dass die (-/-) Embryos am Tag 14,5 p.c. bereits tot sind. Die Organe sind zu diesem Zeitpunkt schon nicht mehr klar zu identifizieren, d.h. die toten (-/-) Embryos beginnen sich langsam aufzulösen und werden dann im Uterus resorbiert.

### 3.8.2 Southern Hybridisierung der Embryos isoliert am Tag 12,5 p.c.

Für weitere Untersuchungen wurden die Embryos schon am Tag 12,5 p.c. isoliert, da zu diesem Zeitpunkt alle Embryos noch lebten. Die Embryos wurden zunächst mit PCR genotypisiert, die Ergebnisse der PCR wurden anschließend mit Southern Hybridisierung bestätigt.

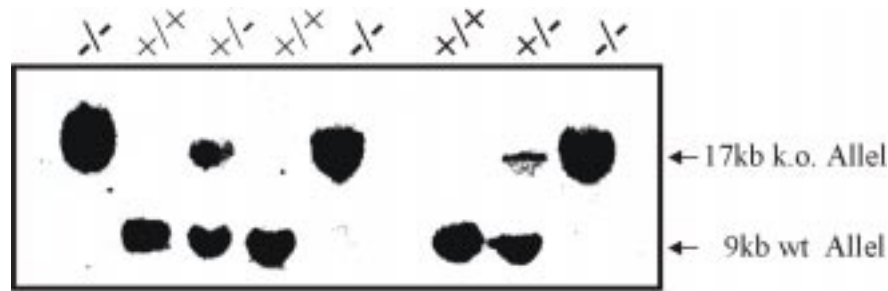


Abbildung 3-20 Southern Hybridisierung mit der 5' Sonde von (+/+), (+/-) und (-/-) Embryos. Die 9 kb Bande entspricht dem Wildtyp, die 17 kb Bande dem knock out Allel (vgl. Abbildung 3-8).

### 3.8.3 RT-PCR

Zum Nachweis, ob die Exons 14 und 15 deletiert worden sind, wurden verschiedenen PCR Ansätze durchgeführt. Aus den am Tag 12,5 p.c. isolierten Embryos wurde zunächst die RNS isoliert (2.14.1), daraus cDNA hergestellt (2.14.2) und mit dieser PCR durchgeführt. Die **Tabelle 3-3** zeigt die eingesetzten Primerpaare mit den erwarteten PCR Produkten und Produktgrößen.

Primerpaar	PCR Produkt	Größe
VS 7 / VS 8	Exon 7	197 bp
VS11 / VS16	Exons 14 und 15	329 bp
VS19 / VS 13	Exons 16 und 17	236 bp
VS15 / VS18	Exons 12 bis 16	831 bp (WT) / 502 bp k.o.
VS 9 / VS 18	Exons 13 bis 16	670 bp (WT) / 341 bp k.o.

Tabelle 3-3 Primerpaare, die für die RT-PCR verwendet wurden mit den PCR Produkten und den erwarteten Bandengrößen.

Mit den Primerpaaren VS11/16 und VS19/13 wurde jeweils eine PCR mit (+/+), (+/-) und (-/-) Embryos durchgeführt. Die **Abbildung 3-21** zeigt die Ergebnisse der PCR Ansätze.

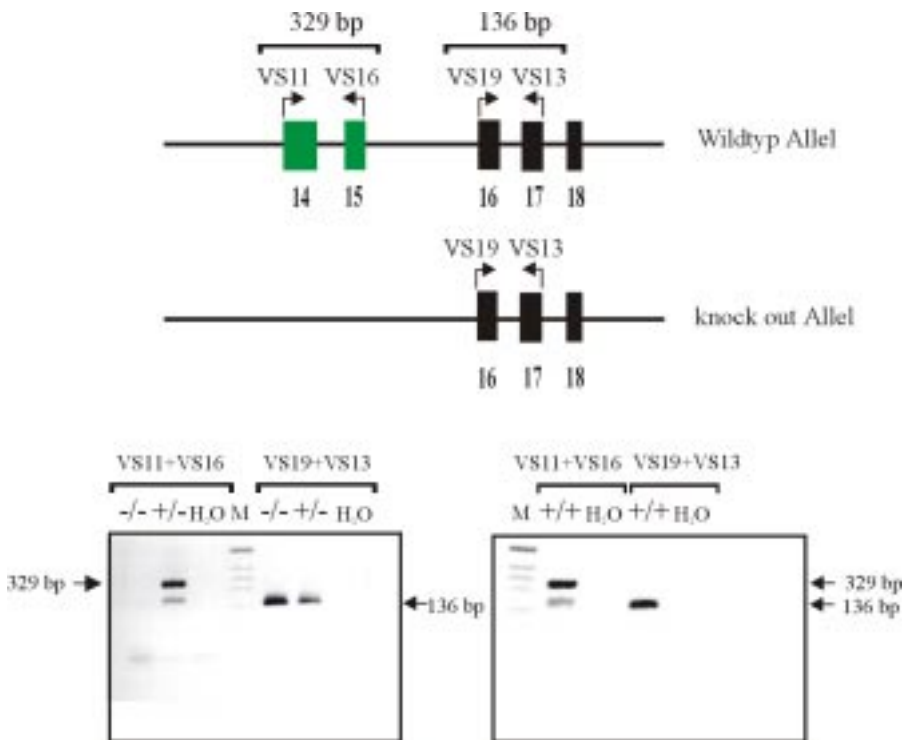


Abbildung 3-21 oben: PCR Strategie auf DNS Ebene dargestellt. Die Bilder darunter zeigen die Ergebnisse der RT-PCR. Zwei verschiedenen Primerpaare VS11/VS16 und VS19/VS13 wurden eingesetzt, um die Exons 14 und 15 (329 bp) und die Exons 16 und 17 (136 bp) zu amplifizieren. cDNAs, isoliert aus (+/+), (+/-) und (-/-) Mäusen, wurden für die RT-PCR eingesetzt. In beiden Abbildungen entspricht M dem DNS-Marker und H<sub>2</sub>O dem Wasserwert.

Das Primerpaar VS19/VS13 amplifizierte in allen drei genotypisch unterschiedlichen Embryos die Exons 16 und 17, d.h. 3' terminal der kritischen Exons 14 und 15 ist die RNS normal vorhanden. Das Primerpaar VS11 und VS16 dagegen amplifizierte die Exons 14 und 15 nur in den (+/+) und (+/-) Embryos. Die Banden wurden aus dem Gel eluiert (2.8.3) und durch Sequenzierung (2.9.2) verifiziert. Die Ergebnisse aus der PCR zeigten deutlich, dass bei den (-/-) Embryos die Exons 14 und 15 tatsächlich deletiert wurden, die nachfolgenden Exons allerdings in allen drei Genotypen normal vorhanden waren.

Mit der cDNA, hergestellt aus (-/-) Embryos, wurden noch weitere PCRs durchgeführt. Die **Abbildung 3-22** zeigt die Ergebnisse der PCR Ansätze mit den Primerpaaren VS15/VS18, VS9/VS19 und VS7/VS8.

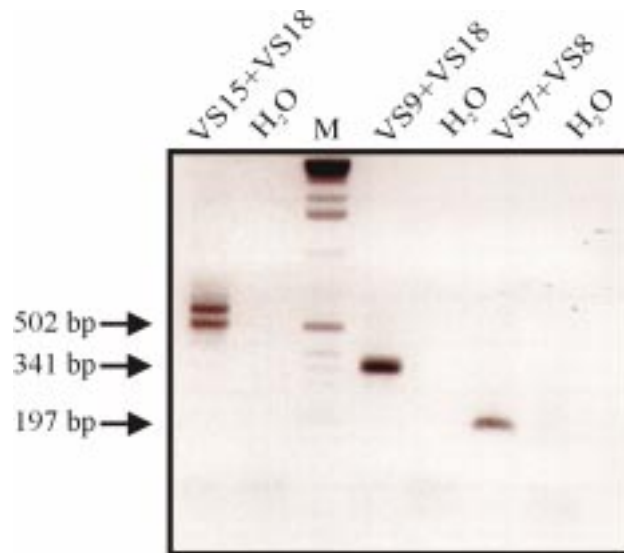


Abbildung 3-22 Ergebnisse weiterer PCR Ansätze. Das Primerpaar VS15/VS18 amplifiziert die Exons 12 bis 16. Ohne die Exons 14 und 15 hat die Bande eine Größe von 502 bp. Das Primerpaar VS9/VS18 amplifiziert die Exons 13 bis 16. In (-/-) Embryo beträgt die Bandengröße 341 bp. Das Primerpaar VS7/VS8 amplifiziert das Exon 7 mit 197 bp. M entspricht dem DNS Marker, H<sub>2</sub>O dem Wasserwert.

Die amplifizierten PCR Banden wurden ebenfalls aus dem Gel eluiert und mittels Sequenzierung verifiziert. Das Primerpaar VS7/VS8 amplifizierte Exon 7, wodurch bestätigt werden konnte, dass die RNS 5' terminal der Exons 14 und 15 normal ist. Das Primerpaar VS15/VS18 amplifizierte die Exons 12 bis 16. Die Größe des PCR Produktes, 502 bp, und die Sequenz zeigten deutlich, dass in diesem Ansatz die Exons 14 und 15 fehlten. Bei der zusätzlichen etwas größeren Bande handelte es sich vermutlich um eine unspezifische Primerbindung. Die WT Bande kann es nicht sein, weil diese eine Größe von 831 bp haben müsste. Die PCR mit dem Primerpaar VS9/18 bestätigte die Deletion der Exons 14 und 15. Amplifiziert wurden in diesem Fall die Exons 13 bis 16. Die Größe von 341 bp und die Sequenz zeigten auch hier, dass die Exons 14 und 15 fehlten. Zusätzlich zeigte die Sequenz, dass an das Exon 13 ein 15 bp großer Teil des Introns 16 gespleißt wurde. Die unmittelbar nachfolgende RNS (bis Exon 17) dagegen, war nicht modifiziert.

#### 3.8.4 Sequenzvergleich der RT PCR von Exon 13 bis Exon 16 eines (-/-) Embryos mit der $\alpha_{1C}$ Wildtyp Sequenz in diesem Bereich

Die Sequenz des PCR Produktes aus dem Primerpaar VS9/VS18 wurde in dem Computerprogramm HUSAR mit der Wildtyp Sequenz in diesem Bereich verglichen. Der Sequenzvergleich (siehe 6.2) zeigte deutlich, dass die 15 bp große Insertion des Introns eine Verschiebung des Leserahmens verursacht.

Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass die beiden Exons 14 und 15 deletiert worden sind, und dass durch die Insertion einer Intronsequenz eine Leserahmenverschiebung verursacht wurde, die zu einem vorzeitigen Translationsstop führte. Die Beweise bestätigen alle, dass das  $\alpha_{1C}$  Gen zerstört worden ist und keine funktionelle  $\alpha_{1C}$  Untereinheit mehr gebildet werden kann, da ein wichtiger Bereich der Porenregion fehlt.

### **3.8.5 Elektrophysiologische Charakterisierung kardialer Myozyten**

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung embryonaler Herzzellen wurde aus Embryos am Tag 12,5 p.c. das Herz isoliert (siehe 2.19.1). Der Zeitpunkt Tag 12,5 p.c. wurde deshalb ausgewählt, weil die Herzen schon ausreichend groß entwickelt waren und alle Embryos noch lebten. Jedes Embryo wurde mittels PCR genotypisiert (2.17.3). Atrium und Ventrikel der isolierten Herzen wurden mittels Pinzetten getrennt, Einzelzellen isoliert und Primärkulturen angelegt (2.19.1). Die Atrien wurden elektrophysiologisch analysiert.

Die Herzschlagfrequenz der Herzen wurde unmittelbar nach dem Isolieren bestimmt und für jeden Genotyp wurden die Mittelwerte gebildet. Die Werte unterschieden sich innerhalb der drei Genotypen nicht signifikant. Einen Tag nach der Kultivierung der Ventrikelzellen wurden nochmals die Kontraktionen der Zellen ermittelt. In Kultur zeigte sich ebenfalls kein deutlicher Unterschied. In **Abbildung 3-23** sind für jeden Genotyp die Mittelwerte der Kontraktionen in einem Balkendiagramm dargestellt.

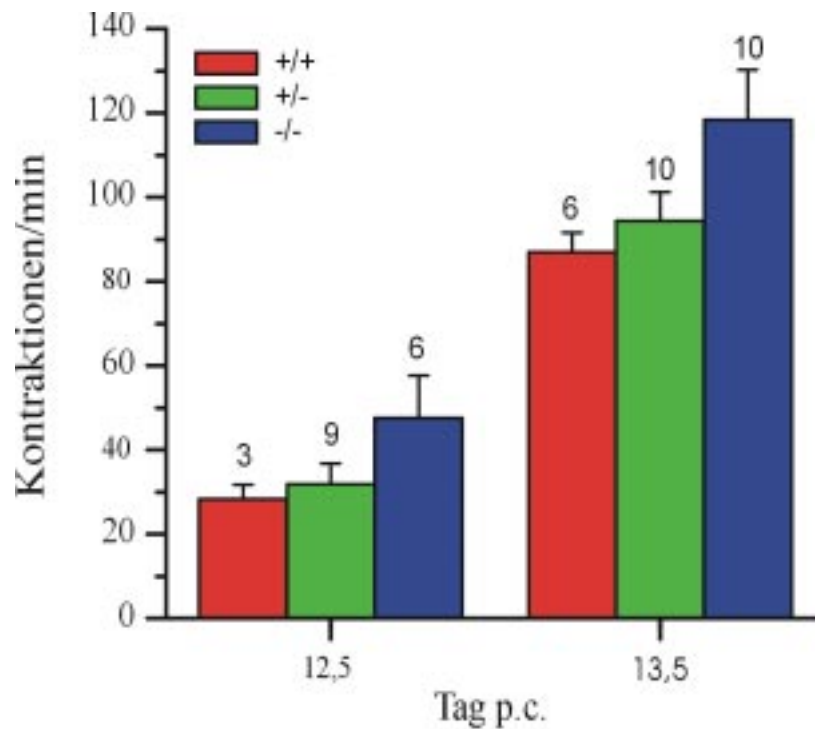


Abbildung 3-23 Mittelwerte  $\pm$  SEM der Herzschlagfrequenzen unmittelbar nach der Isolierung am Tag 12,5 p.c. und Mittelwerte  $\pm$  SEM der Kontraktionen der Zellen in Kultur einen Tag nach Beginn der Kultivierung. Die einzelnen Mittelwerte sind in Anhang angegeben. Die Zahlen über den Balken geben die Anzahl der embryonalen Herzen bzw. der ausgezählten Herzzellen an.

### 3.8.5.1 Strom-Spannungskurven

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der Herzzellen wurden Strom-Spannungskurven gemessen. Für alle untersuchten Zellen wurden zunächst die Na-Ströme (140 mM Na) ermittelt, um sicherzustellen, dass es sich um Kardiomyozyten handelte und die Zellen sich untereinander nicht unterschieden. Die aus den Messungen gemittelten und auf die Kapazitäten normalisierten Werte für  $I_{Ba}$  und  $I_{Na}$  sind in **Tabelle 3-4** aufgeführt. Die Strom-Spannungskurven sind in **Abbildung 3-24** angegeben.

Tabelle 3-4 Mittelwerte  $\pm$  SEM der gemessenen Barium- und Natriumströme als Stromdichten (pA/pF) und die Kapazität (pF) der gemessenen Zellen (n).

	+/+ (n = 4)	+/- (n = 3)	-/- (n = 8)
$I_{Ba}$ (pA/pF)	$-53 \pm 6$	$-30 \pm 7$	$-12 \pm 2, 2$
Kapazität [pF]	$35 \pm 9$	$56 \pm 11$	$40 \pm 9$
$I_{Na}$ (pA/pF)	$-282 \pm 29$	$-204 \pm 40$	$-195 \pm 21$



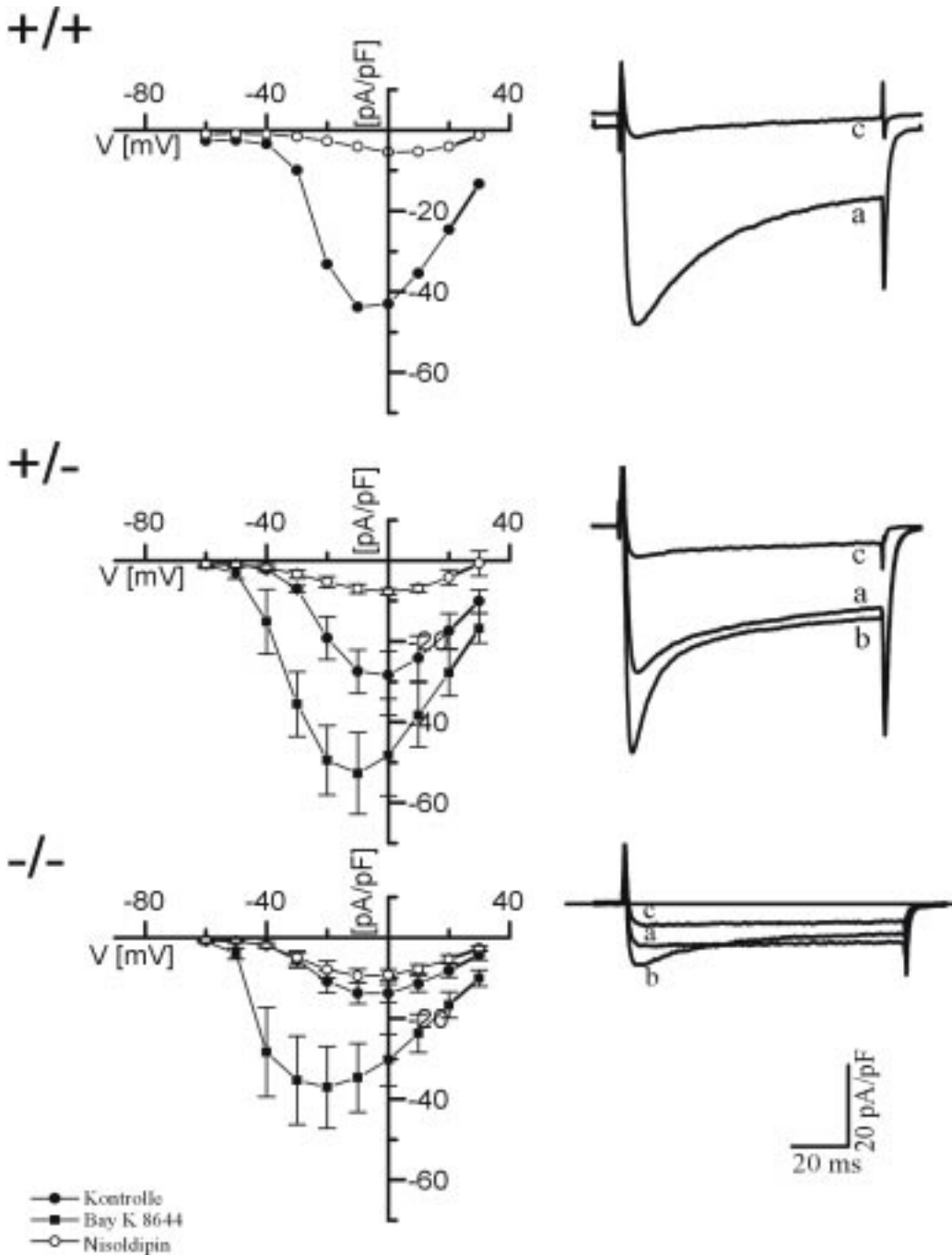


Abbildung 3-24 Links: Strom-Spannungsbeziehung von (+/+), (+/-) und (-/-) Zellen. Die Zellen wurden ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV für eine Dauer von 100 ms und mit einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz auf die angegebenen Potentiale depolarisiert: (●) Kontrollströme, (○) Ströme in Anwesenheit von 200 nM Nisoldipin, (■) Ströme in Anwesenheit von 1  $\mu$ M BayK 8644. Rechts: Einzelstromregistrierungen der Depolarisierungen ausgehend von -80 mV auf 0 mV: a) Kontrollstrom, b) Aktivierung durch BayK 8644, c) Inhibition durch Nisoldipin.

Die (+/+) und (+/-) Zellen zeigten einen typischen L-Typ Strom, der bei -30 mV aktiviert und sein Maximum bei 0/-10 mV hatte. Dieser Strom war DHP sensitiv. Er wurde durch 1  $\mu$ M BayK 8644 stimuliert und durch 200nM Nisoldipin gehemmt. Die Stromdichte der (+/-) Zellen war niedriger. Überraschenderweise zeigten die (-/-) Zellen auch einen L-Typ

ähnlichen Strom, der mit BayK 8644 stimulierbar und mit Nisoldipin inhibierbar war, obwohl das  $\alpha_{1C}$  Gen in den (-/-) Zellen durch das *gene targeting* zerstört worden ist. Allerdings betrug die Stromdichte hier nur 23% der (+/+) Zellen. Die Einzelstromregistrierungen im rechten Teil des Bildes zeigen nochmal einen typischen L-Typ Strom mit einer schnellen Aktivierung und einer langsamen Inkaktivierung.

### 3.8.5.2 *Block mit Nisoldipin*

DHPs sind die selektivsten und effizientesten Blocker der L-Typ Kalziumkanäle. Kürzliche Berichte (Welling et al., 1997) zeigten, dass die unterschiedliche Sensitivität kardialer und vaskulärer L-Typ Kalziumkanäle gegenüber dem DHP Nisoldipin zumindest teilweise durch gewebespezifische Expression alternativ gespleißter IS6 Segmente des  $\alpha_{1C}$  Gens verursacht wird. Deshalb wurde angenommen, dass der ungewöhnliche L-Typ Bariumstrom, der in  $\alpha_{1C}$  knock out Zellen gefunden wurde, ebenso eine unterschiedliche Sensitivität haben könnte. Die Unterschiede in der Sensitivität waren besonders auffällig bei nicht depolarisiertem Haltepotential (-80 mV). Deshalb wurde der Kanalblock durch Superfusion der (+/+), (+/-) oder (-/-) Zellen mit 200 nM Nisoldipin bei einem Haltepotential von -80 mV, einer Depolarisierung auf 0 mV und einer Stimulationsfrequenz von 0,1 Hz untersucht. Der Verlauf der Stromkurven ist in **Abbildung 3-25** gezeigt.

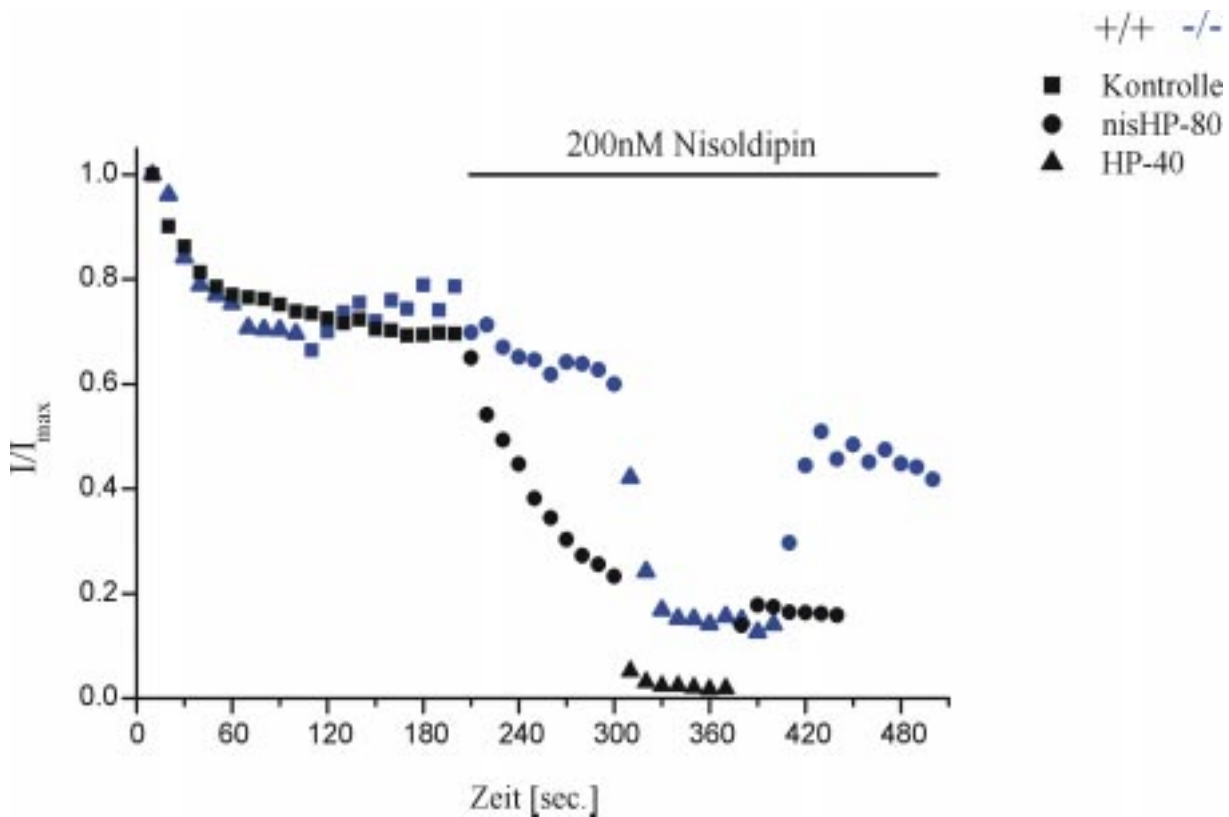


Abbildung 3-25 Spannungsabhängige Hemmung des Bariumstromes mit Nisoldipin (200 nM) gemessen in (+/+) und (-/-) Zellen. Zeitverlauf repetitiver Depolarisierungen ausgehend von einem Haltepotential von  $-80$  mV auf  $0$  mV (■/●) und von  $-40$  mV auf  $0$  mV (▲). Der Balken entspricht der Dauer der Nisoldipinapplikation. Schwarze Symbole entsprechen den Wildtypzellen, blaue Symbole den (-/-) Zellen.

Nisoldipin reduzierte den Bariumstrom der Wildtypzellen ausgehend von einem HP von  $-80$  mV auf 20% des unbehandelten Zelle. In (+/-) Zellen wurde der Strom genauso stark gehemmt (Daten nicht gezeigt). Die (-/-) Herzellen waren weniger sensitiv, mit einer Reduktion des  $I_{Ba}$  auf 80% des Stromes vor der Nisoldipinzugabe. Eine Veränderung des Haltepotentials von  $-80$  mV auf  $-40$  mV reduzierte  $I_{Ba}$  in Wildtypzellen und heterozygoten Zellen (Daten nicht gezeigt) auf  $0$  pA (spannungsabhängige Hemmung). Das stimmt überein mit der Theorie, dass DHPs hauptsächlich an Kanäle im inaktivierten Zustand binden. In homozygoten (-/-) Zellen dagegen reichte diese Konzentration Nisoldipin (200 nM) nicht aus, um den Strom vollständig auf  $0$  pA zu reduzieren. Der Bariumstrom wurde bei einem HP von  $-40$  mV um 80% reduziert, ein Reststrom, ungefähr 20% des unbehandelten Stroms, blieben erhalten. Die spannungsabhängige Hemmung war in allen Zellen reversibel. Sobald das HP von  $-40$  mV wieder auf  $-80$  mV gesetzt wurde, konnten in Anwesenheit von Nisoldipin nahezu gleiche Stromdichten detektiert werden wie vor der Veränderung des Haltepotentials.

In **Abbildung 3-26** sind die Mittelwerte der Nisoldipin-Hemmung dargestellt.

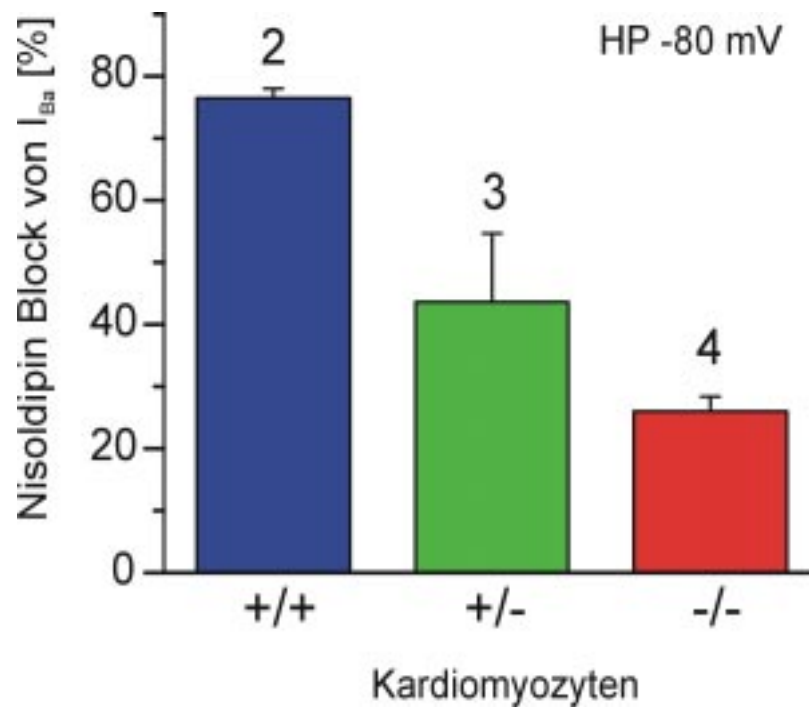


Abbildung 3-26 Prozentuale Hemmung  $\pm$  SEM des Bariumstroms durch (200nM) Nisoldipin bezogen auf den Kontrollstrom ohne Nisoldipin. Die Zellen wurden ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV depolarisiert. Die Zahlen entsprechen der Anzahl der gemessenen Zellen.

Der Strom der Wildtypzellen wird durch Nisoldipin zu 80 % gehemmt, der der heterozygoten zu 45 % und der der knock out Zellen nur noch zu 25 %. Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei den unterschiedlichen Zelllinien um die gleiche Art von Block handelte, allerdings mit deutlich unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber Nisoldipin.

Obwohl das  $\alpha_{1C}$  Gen in den (-/-) Herzzellen inaktiviert wurde, besitzen diese Zellen dennoch einen L-Typ ähnlich Kalziumkanal, über den voraussichtlich das für die Kontraktion der Herzen notwendige Kalzium in die Zelle einströmen kann.

## 4 Diskussion

Die Einführung genetischer Veränderungen in die Keimbahn von Säugetieren bietet große Vorteile zur Analyse der Funktion von Proteinen. Mit Hilfe von „gene targeting“ können Gene u.a. gezielt inaktiviert werden. Anhand der Folgen des Gendefekts können Rückschlüsse auf die ursprüngliche Genfunktion gezogen werden. Beim klassischen Gentergeting wird ein Selektionsmarker in das Zielgen eingesetzt, wodurch die Genstruktur zerstört wird und das Gen seine Funktion verliert. Diese Strategie hat allerdings gewisse Einschränkungen (Rajewsky et al., 1996). Die Präsenz des Selektionsmarkers, der für die Selektion rekombinanter ES Zellklone exprimiert werden muss, könnte den mutierten Phänotyp beeinflussen. Führt außerdem die Keimbahnmutation zu embryonaler Letalität, dann existiert kein mutierter Organismus, an dem die Folgen des Gendefekts untersucht werden könnten. Eine weitere Begrenzung des klassischen Gentergeting ist, dass Genfunktionen, die erst in späteren Entwicklungsstadien wichtig werden, nicht aufgeklärt werden können, da nur der Zeitpunkt aufgeklärt werden kann, an dem das Gen zum erstenmal seine Funktion übernimmt. Eine Weiterentwicklung des klassischen Gentergetings ist das konditionale Gentergeting. Das Cre/loxP Rekombinationssystem aus dem Bakteriophagen P1 ist dafür geeignet (Metzger und Feil, 1999). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des Cre/loxP Systems verschiedene genetische Veränderungen innerhalb des  $\alpha_{1C}$  Gens durchgeführt mit der Absicht, die physiologische Rolle des  $\alpha_{1C}$  Gens in den verschiedenen Geweben weiter zu untersuchen. Das  $\alpha_{1C}$  Gen wird im Herz, im glatten Muskel, in endokrinen und neuronalen Zellen exprimiert und codiert die  $\alpha_{1C}$  Untereinheit eines L-Typ Kalziumkanals. Das  $\alpha_{1C}$  Gen hat zahlreiche physiologisch wichtige Funktionen, wie z.B. Kontraktion des Herzmuskels und Aufrechterhaltung des Gefäßtonus. Alles was zur weiteren Aufklärung der Genfunktionen des  $\alpha_{1C}$  Gens beiträgt, ist demnach von großem Interesse.

Das  $\alpha_{1C}$  Gen wurde zunächst in embryonalen Stammzellen der Maus genetisch modifiziert. Die genetisch modifizierten ES Zellen wurden anschließend auf frühe Mausembryos übertragen und nahmen an der weiteren Embryonalentwicklung teil. Die Keimbahngängigkeit der modifizierten ES Zellen führte zu heterozygoten Mäusen, bezüglich der eingeführten Mutation.

Bei der Einführung genetischer Veränderungen innerhalb des  $\alpha_{1C}$  Gens wurden zwei konkrete Ziele verfolgt. Ein erstes Ziel bestand darin, das  $\alpha_{1C}$  Gen konventionell, d.h. in allen Zellen schon von Beginn der Embryonalentwicklung an, zu inaktivieren und gleichzeitig den zunächst mit eingeführten Selektionsmarker über Cre-vermittelte Rekombination wieder zu entfernen. Dadurch konnten möglicherweise durch die Expression des Selektionsmarkers verursachte, störende Einflüsse auf den mutierten Organismus ausgeschlossen werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen konditionalen „knock out“ der  $\alpha_{1C}$  Untereinheit vorzubereiten. Beide Ziele wurden im Verlauf dieser Arbeit mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems erreicht.

Um die Voraussetzungen für eine Cre-gerichtete Mutagenese zu schaffen, wurden die für einen funktionsfähigen Kalziumkanal essentiellen Exons 14 und 15 mit zwei gleich gerichteten loxP Sequenzen flankiert. Dazu wurden in einem ersten Targetingschritt zunächst insgesamt drei loxP Seiten über homologe Rekombination in das Genom embryonaler Stammzellen eingeführt. Zwei gleichgerichtete loxP Seiten, die einen Selektionsmarker flankierten, wurden in das Intron 5' terminal von Exon 14 eingeführt, eine dritte loxP Seite wurde in das Intron 3' terminal von Exon 15 integriert (**Abbildung 3-2**). Insgesamt gingen aus diesem ersten Targeting zwei positive ES Zellklone hervor, die die oben beschriebenen Mutationen an der vorgesehenen Stelle in ihrem Genom integriert hatten (vgl. 3.4.1). In einem zweiten Targetingschritt wurde die Cre-vermittelte Rekombination im Genom der ES Zellen durchgeführt. Zwei unterschiedliche ES Zellgenotypen gingen daraus hervor. Es entstanden ES Zellklone mit einem zerstörten Allel des  $\alpha_{1C}$  Gens, da der Selektionsmarker zusammen mit den Exons und dem dazwischenliegenden DNS Abschnitt deletiert wurde. Zusätzlich entstanden auch ES Zellklone mit einem „gefloxten“ (loxP-flankierten) Allel des  $\alpha_{1C}$  Gens, d.h. innerhalb der Introns 5' terminal von Exon 14 und 3' terminal von Exon 15 befanden sich nach den Targetingschritten jeweils einzelne, gleich gerichtete loxP Sequenzen (vgl. 3.4.2). Beide verschiedenen ES Zellgenotypen wurden – wie unter 3.5 beschrieben - erfolgreich in Blastozysten injiziert und diese in scheinchwangere Leihmütter reimplantiert. Aus beiden Zellklonen gingen heterozygote Mäuse hervor (3.6.1 und 3.6.2). Im Fall der heterozygot gefloxten Mäuse wurde sichergestellt, dass die Insertion der loxP Sequenzen die Expression des  $\alpha_{1C}$  Gens nicht beeinflusst. Die Verpaarung heterozygot gefloxter Mäuse führte zu lebensfähigen homozygot gefloxten Mäusen ( $+^{flox}/+^{flox}$ ), die phänotypisch nicht von Wildtyp Mäusen unterscheidbar und fertil waren (3.7.1). Aus einer weiteren Verpaarung von ( $+/+^{flox}$ ) Mäusen mit ( $+/-$ ) Mäusen gingen sogar ( $+^{flox}/-$ ) Mäuse hervor, deren  $\alpha_{1C}$  Gen auf einem Allel zerstört war und das andere Allel die loxP Sequenzen, wie oben beschrieben, enthielt. Auch diese Mäuse waren phänotypisch normal. Mit Hilfe von RT PCR konnten die kritischen Exons, 14 und 15 und die Exons 15 und 16 von der RNS aus ( $+^{flox}/+^{flox}$ ) Mäusen amplifiziert werden (3.7.2). Dadurch wurde eindeutig bestätigt, dass das Exon/ Intron Spleißen durch die Integration beider loxP Motive nicht gestört wurde. Demnach wurde eine genetisch modifizierte Mauslinie etabliert, die für weitere Cre-gerichtete Mutationen zur Verfügung steht. Mit Hilfe von weiteren Verpaarungen mit bestimmten Cre-exprimierenden Mäusen kann das  $\alpha_{1C}$  Gen gewebespezifisch und zeitlich kontrolliert inaktiviert werden.

Die Verpaarung der ( $+/-$ ) Mäuse führte zu keinen lebensfähigen ( $-/-$ ) Mäusen (3.7.3). Der homozygote Gendefekt resultierte in embryonaler Letalität. Das  $\alpha_{1C}$  Gen wurde kurz vor Beginn und während dieser hier vorgestellten Arbeit von Frau Dr. Claudia Seisenberger auf konventionellem Weg inaktiviert. Die Geninaktivierung beruhte auf der Insertion eines Neomycinresistenzgens in das dritte Exon der  $\alpha_{1C}$  Untereinheit, dass das erste Transmembransegment codiert. Aufgrund des letalen Phänotyps wurde die Embryonalentwicklung genauer analysiert. In beiden knock-out Ansätzen wurde festgestellt, dass die ( $-/-$ ) Embryos am Tag 14 *post coitum* im Uterus starben, langsam degenerierten und vollständig resorbiert wurden (3.8.1).

L-Typ Kalziumkanäle sind sehr wichtig für die physiologische Funktion des kardiovaskulären Systems. Es ist bekannt, dass das  $\alpha_{1C}$  Gen für die Kontraktion des Herzmuskels, d.h. für den Herzschlag verantwortlich ist. Während der Embryonalentwicklung beginnt das normale Herz am Tag 8,5 p.c. unregelmäßig zu kontrahieren. Am Tag 9 p.c. kontrahieren die primitiven Atrien und Ventrikel bereits regelmäßig und kräftig (Kaufmann, 1995, The atlas of mouse development). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden deshalb die Auswirkungen des  $\alpha_{1C}$  Gendefekts auf die Entwicklung und Funktion der Herzen in (-/-) Embryos untersucht. Für die Untersuchungen wurden beide Mauslinien verwendet. Anhand der Übereinstimmungen wurden die Ergebnisse bestätigt.

Die Embryos, und daraus die Herzen, wurden am Tag 12,5 p.c. aus dem Uterus isoliert und genotypisiert (3.8.2). RT PCR Analysen der RNS aus Embryos, die ebenfalls am Tag 12,5 p.c. isoliert wurden, bestätigten die Deletion der Exons 14 und 15 in (-/-) Embryos (**Abbildung 3-21**). Zusätzlich wurde durch Sequenzanalyse von PCR Produkten (3.8.4) nachgewiesen, dass durch die Integration einer Intronsequenz in die Boten-RNS, der Leserahmen in den k.o. Embryos verschoben wurde, was zu einem vorzeitigen Translationsstop führt.

Am Tag 12,5 p.c. lebten trotzdem die Embryos aller drei Genotypen und auch die Herzen waren bei allen Embryos phänotypisch normal entwickelt und kontrahierten regelmäßig (**Tabelle 3-4**). Die Herzschlagfrequenzen der (+/+), (+/-) und (-/-) Herzen war innerhalb der drei Genotypen nicht signifikant unterschiedlich (**Abbildung 3-23**). Die Atrien und Ventrikel der Herzen wurden im weiteren Verlauf unterschiedlich weiter behandelt. Aus den Ventrikelzellen wurden Primärkulturen angelegt. Am nächsten Tag wurden die schlagenden Zellen in Kultur ausgewertet. Auch dabei zeigten sich keine deutlichen Unterschiede in der Herzschlagfrequenz (**Abbildung 3-23**).

Anhand dieser Ergebnisse konnte bewiesen werden, dass das  $\alpha_{1C}$  Gen während der Embryogenese bis zum Tag 14,5 p.c. keinen Einfluss auf die Entwicklung eines phänotypisch, normalen Herzens hat und vor dem Tag 14,5 p.c. für die Kontraktion des Herzmuskels nicht unbedingt notwendig ist.

Die elektrophysiologischen Charakterisierungen der Atrium-Zellen wurden mit Hilfe von Patch-Clamp Messungen in der Ganz-Zell Konfiguration bei RT durchgeführt. Als Ladungsträger wurde  $Ba^{2+}$  verwendet, um die  $Ca^{2+}$  abhängige Inaktivierung des L-Typ Kalziumkanals auszuschließen und einen vorzeitigen „run down“ der geklemmten Zellen zu verhindern. Die Membranen der Zellen wurden ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV depolarisiert. Das Vorhandensein normaler Natriumströme in den geklemmten Zellen zeigte, dass die Zellen untereinander nicht unterschiedlich waren (**Tabelle 3-4**).

Wie in **Abbildung 3-24** dargestellt, zeigten die (+/+) und (+/-) Herzzellen einen normalen L-Typ Bariumstrom, der bei ungefähr -30 mV aktivierte und das Maximum bei 0 mV bis -10 mV erreichte. Dieser Strom war DHP sensitiv. Wurden die Zellen mit 1  $\mu$ M BayK 8644 superfundiert zeigte sich eine Vergrößerung des Bariumstroms, wurden die Zellen dagegen mit (200 nM) Nisoldipin superfundiert trat deutlich eine Inhibierung des Stroms ein. Überraschenderweise konnte in den (-/-) Herzzellen ebenfalls ein L-Typ ähnlicher, DHP sensitiver Bariumstrom gemessen werden. Die Kinetik des Stroms war leicht in Richtung

negativerer Potentiale verschoben. Der Strom aktivierte ungefähr bei  $-40$  mV und erreichte das Maximum bei  $-10$  mV. Unabhängig davon auf welche Weise das  $\alpha_{1C}$  Gen inaktiviert wurde, stimmten die Ergebnisse der ermittelten Strom-Spannungskurven in beiden k. o. Ansätzen überein.

DHPs als selektivste und effizienteste Hemmer der L-Typ Kalziumkanäle interagieren spannungsabhängig mit L-Typ Kanälen. Die Hemmung des Kanals wird durch Depolarisierung gefördert. Im folgenden wurde untersucht, ob der L-Typ ähnliche Bariumstrom, der in  $\alpha_{1C}$  knock out Zellen gefunden wurde, ebenso eine unterschiedliche Sensitivität haben könnte. Die Unterschiede in der Sensitivität waren besonders auffällig, wenn die Zelle ausgehend von einem Haltepotential von  $-80$  mV auf das maximale Potential depolarisiert wurden.  $200$  nM Nisoldipin reduzierte den Bariumstrom der Wildtypzellen auf  $20\%$  des unbehandelten Stromes, den der heterozygoten Zellen genauso, die homozygoten Herzzellen dagegen waren deutlich weniger sensitiv mit einer Reduktion des  $I_{Ba}$  auf  $80\%$  des unbehandelten Stromes. Die Veränderung des Haltepotentials von  $-80$  mV auf  $-40$  mV reduzierte den Bariumstrom in Wildtypzellen (**Abbildung 3-25**) und heterozygoten Zellen auf  $0$  pA, was damit übereinstimmt, dass DHPs mit hoher Affinität an Kanäle im inaktivierten Zustand binden. In homozygoten ( $-/-$ ) Zellen dagegen reichte diese Konzentration Nisoldipin ( $200$ nM) nicht aus, um den Strom vollständig auf  $0$  pA zu reduzieren (**Abbildung 3-25**). Der Bariumstrom wurde bei einem HP von  $-40$  mV um  $80\%$  reduziert, ein Reststrom, ungefähr  $20\%$  des unbehandelten Stroms, blieben erhalten. Die Hemmung war in allen Zellen reversibel. Sobald das HP von  $-40$  mV wieder auf  $-80$  mV gesetzt wurde, konnte in Anwesenheit von Nisoldipin wieder der gleiche Strom detektiert werden, wie vor der Veränderung des Haltepotentials. Diese Ergebnisse zeigten, dass es sich um die gleiche Art von Block handelte. Wobei die Sensitivität gegenüber Nisoldipin in den ( $-/-$ ) Zellen deutlich anders war als in den ( $+/+$ ) und ( $+/-$ ) Zellen.

Bis zum Tag 14 der Schwangerschaft ist das  $\alpha_{1C}$  Gen für die Entwicklung eines phänotypisch normalen (Atrium und Ventrikel bereits ausgebildet) und kontrahierfähigen Herzens nicht notwendig. Bei den Bariumströmen der ( $-/-$ ) Embryos handelt es sich eindeutig um L-Typ Ströme, die zwar in ihrer Kinetik leicht nach links verschoben waren, dennoch auf DHPs sensitiv reagierten. BayK 8644 erhöhte die Stromamplitude, Nisoldipin inhibierte den Kanal. Durch welchen Kanal das für die Kontraktion notwendige Kalzium in die Zellen eintritt bleibt in weiteren Versuchen aufzuklären. Drei weitere Gene, die einen L-Typ Kalziumkanal codieren sind bekannt.  $\alpha_{1S}$  codiert zwar einen L-Typ Kalziumkanal, hat aber eine andere Kinetik als der hier beschriebene Kalziumkanal (De Jongh et al., 1991). Das  $\alpha_{1F}$  Gen wird nur in der Retina exprimiert (Bech-Hansen et al. 1998; Strom et al., 1998) und kann demnach ebenfalls nicht die Funktion vom  $\alpha_{1C}$  Gen übernehmen. Als interessantester Kandidat bleibt das  $\alpha_{1D}$  Gen übrig, das ebenfalls einen L-Typ Kalziumkanal codiert und auch im Herzen exprimiert wird. Weitere Analysen auf diesem Gebiet werden aufklären, ob das  $\alpha_{1D}$  Genprodukt das  $\alpha_{1C}$  Genprodukt kompensieren kann und vor Tag 14 p.c. für den Herzschlag verantwortlich ist.



Einen wichtigen Beitrag dazu werden die Ergebnisse der konditionalen Geninaktivierung liefern. Die in dieser Arbeit beschriebene Maus, deren  $\alpha_{1C}$  Gen homozygot gefloxt wurde, wird mit folgenden Cre-exprimierenden Mäusen verpaart werden: MLC 2a-Cre (K.R. Chien, La Jolla USA), Nex-Cre (Klaus-Armin Nave, Heidelberg) und Rip-Cre (Mark Magnuson, Nashville, USA). Der MLC 2a Promoter wird im Herz exprimiert, wodurch eine herzspezifische Inaktivierung des  $\alpha_{1C}$  Gens erreicht wird. Die Cre Expression unter Kontrolle des Nex Promoters dagegen, verursacht eine Zerstörung des  $\alpha_{1C}$  Gens in neuronalen Bereichen. Die Verpaarung mit Rip-Cre Mäusen führt zur Inaktivierung der  $\alpha_{1C}$  Untereinheit in den  $\beta$  Zellen des Pankreas. Desweiteren soll das  $\alpha_{1C}$  Gen zukünftig zusätzlich zur gewebespezifischen Inaktivierung auch noch zeitlich kontrolliert ausgeschaltet werden. Die „gefloxt“ Maus wird mit einer Cre-exprimierenden Maus verpaart, die die Cre Rekombinase nur im glatten Muskel exprimiert. Ein modifiziertes Cre Gen (Cre-ER<sup>T</sup>) wurde dazu in den Genlokus eines glattmuskulären Proteins eingesetzt („knock in“) (Kühbandner et al., 2000). Durch die Fusion des Cre-Rekombinasegens mit der modifizierten Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors ist die Aktivierung der Cre Rekombinase im glatten Muskel über Applikation von Tamoxifen induzierbar, d.h. der Zeitpunkt der Geninaktivierung ist dadurch steuerbar.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems das  $\alpha_{1C}$  Gen genetisch modifiziert. Über Cre-vermittelte Rekombination wurden die Exons 14 und 15 deletiert. Diese Exons codieren für Transmembransegmente der zweiten Domäne der  $\alpha_{1C}$  Untereinheit und sind wesentlich an der Porenbildung beteiligt. Durch Deletion der Exons wurde die Genstruktur zerstört, so dass keine funktionsfähige  $\alpha_{1C}$  Untereinheit mehr gebildet werden konnte. Der Gendefekt führte zu embryonaler Letalität am Tag 14,5 p.c.. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das  $\alpha_{1C}$  Gen vor dem Tag 14,5 p.c. für die Entwicklung eines funktionsfähigen Herzens und die Kontraktion des Herzmuskels nicht notwendig ist. Wurden (-/-) Embryos während der Schwangerschaft vor diesem Zeitpunkt aus dem Uterus isoliert, lebten sie und waren phänotypisch von (+/+) und (+/-) Embryos nicht zu unterscheiden. Herzschlagfrequenz und Anzahl der Kontraktionen kultivierter Herzzellen zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Elektrophysiologische Charakterisierungen der Kardiomyozyten aus Herzen, die am Tag 12,5 p.c. isoliert wurden zeigten, dass in (-/-) Zellen ein L-Typ ähnlicher Bariumstrom vorhanden war. Die Strom-Spannungsbeziehung dieses Stroms war leicht in Richtung negativerer Potentiale verschoben und die Stromamplitude war geringer als in (+/+) und (+/-) Zellen. Der detektierte Strom war DHP sensitiv, aktivierbar mit BayK 8644 und inhibierbar mit Nisoldipin. Auffällig war, dass die (-/-) Zellen weniger sensitiv gegenüber Nisoldipin waren. 200 nM Nisoldipin reichten nicht aus, den Strom vollständig zu blockieren, auch nicht wenn das Haltepotential von -80 mV auf -40 mV verändert wurde. Der Strom wurde nur zu 80 % im Vergleich zum Ausgangsstrom inhibiert.

Neben der konventionellen Inaktivierung des  $\alpha_{1C}$  Gens wurde parallel eine konditionale Inaktivierung des  $\alpha_{1C}$  Gens vorbereitet. Dazu wurden zwei gleichgerichtete loxP Seiten in die Introns 5' terminal von Exon 14 und 3' terminal von Exon 15 eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Insertion dieser beiden loxP Seiten das Exon/ Intron Spleißen nicht negativ beeinflusste. Auf RNS Ebene konnten die loxP-flankierten Exons 14 und 15 und das unmittelbar folgende Exon 16 mittels RT-PCR amplifiziert werden. Verpaarungen der heterozygoten (+/+<sup>flox</sup>) Mäuse untereinander und mit (+/-) Mäusen führte zu homozygoten (+<sup>flox</sup>/+<sup>flox</sup>) und zu (+<sup>flox</sup>/-) Mäusen. Alle Nachkommen waren lebensfähig, phänotypisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden und fertil.

Mit Hilfe dieser „geflochten“ Mauslinie ist es möglich das  $\alpha_{1C}$  Gen konditional zu inaktivieren. Die „geflochten“ Mäuse werden mit verschiedenen Cre-exprimierenden Mäusen verpaart. In nächsten Schritten kann das  $\alpha_{1C}$  Gen im Herz, im Hirn und in der Bauchspeicheldrüse inaktiviert werden. Im glatten Muskel wird es zusätzlich zur Gewebespezifität zeitlich kontrolliert inaktiviert werden.

Auf diese Weise können zukünftig die unterschiedlichen Funktionen des  $\alpha_{1C}$  Gens in verschiedenen Geweben aufgeklärt werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Auflistung der verwendeten Oligonukleotide (Primer)

#### 6.1.1 Exonprimer

Nam e	Sequenz in 5' - 3' Richtung	Bindungsstelle
VS1	5'GAA CGA GTG GAG TAT CTC TTC CTC 3'	nt1644 -1667
VS2	5'CCT ACA ACC ACG ATT ATA AAA TCC 3'	nt1760 - 1783
VS3	5'ACC ATT TGA AAT CAT TAT TTT ACT 3'	nt1538 - 1561
VS4	5'CAG GTT GGA GTT GGT GGC GTT GGA 3'	nt1620 - 1643
VS5	5'TTG GGA CTC CGG ACA CTA GCC 3'	nt1903 - 1923
VS7	5'ATG TTC CGG CAG AAG AGG ATC C 3'	nt1928 - 1948
VS8	5CCA GTA CAG CAC GTC TGT CCA G 3'	nt2083 - 2104
VS9	5'ACA CAG CCA ATA AAG CCC TCC TG 3'	nt2258 - 2279
VS10	5'TTG AAG ATC CTG AGC AAC CGC AC 3'	nt2679 - 2699
VS11	5'CTG GAA TTC CTT GAG CAA CCT TGT 3'	nt2813 - 2835
VS12	5'CTG AAA CAC AGT GAG GAG AGA CT 3'	nt2836 - 2858
VS13	5'CTT GGT AGT GGG TGG GGA TTC TC 3'	nt3030 - 3052
VS14	5'CCA GGT GGT CCT GAA CTC CAT 3'	nt3065 - 3088
VS15	5'TAC TGG CGC AGG TGG AAT CGA 3'	nt3247 - 3269
VS16	5'AAT TTC CAC AGA TGA AGA GGA TG 3'	nt3275 - 3294
VS17	5'GAC CGG GGA GGA CTG GAA TT 3'	nt3268 - 3390
VS18	5'GGC CAG CTT CTT CCT CTC CTT 3'	nt3394 - 3417
VS19	5'TCC TAC TGA ATG TGT TCT TGG CCA 3'	nt3483 - 3503
VS20	5'CTT GCA CTT CTG TGA GCC AGT GA	nt3604 - 3626
VS21	5'ATC AAC ATG GAT GAC CTC C 3'	nt3627 - 3645

Die Sequenzen der angegebenen Oligonukleotide beziehen sich auf die in der Datenbank veröffentlichte Sequenz MMDHPCC (L01776) (Ma et al., 1994).

#### 6.1.2 Intronprimer

Nam e	Sequenz in 5' - 3' Richtung
V11	5'TGC ACT GGG AGG GTT GC 3'
V12	5'ATG CTT TGG CAC ATG AC 3'
V13	5'TAA CAG AAA TGT CCA AA 3'
V14	5'TGG CCC CTA AGC AAT GA 3'
V14-1	5'TGG TGT GGG TCT GGG ATG C 3'
V15	5'GAA TGA CAG CCA CCA GG 3'
V16	5'TCT CAT TCT TGG ATT TT 3'

V17	5'TCT CTG ACC GAC ATC AT 3'
V18	5'AGG GGT GTT CAG AGC AA 3'
V19	5'TCA AGT GTA ATC AGG AAA GGT CT 3'
V110	5'CCC CAG CCA ATA GAA TGC CAA T 3'
V111	5'GGT ACT GTC TTT ATA TGC CAA T 3'
V112	5'CCG ATC ATA TTC AAT AAC CCT 3'
V113	5'AGG AAT TCC GAT CAT ATT CAA T 3'

Alle hier angegebenen Oligonukleotide binden innerhalb der Introns des  $\alpha_{1C}$  Gens der Maus.

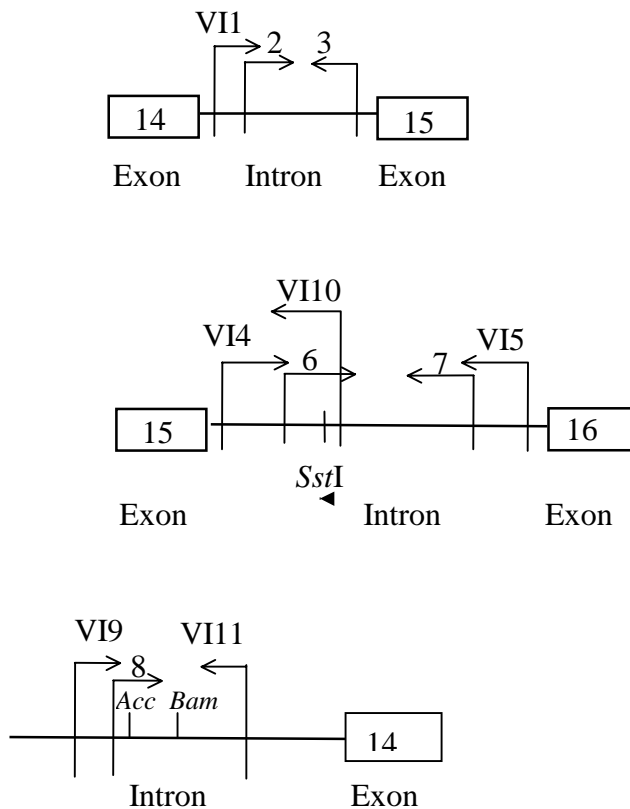


Abbildung 6-1 Skizze der ungefähren Lage der Intronprimer (Pfeile). Exons sind als Rechtecke dargestellt, Introns als waagerechte Linien, Restriktionsschnittstellen als senkrechte Linien, Acc, Acc65I, Bam, BamHI.

### 6.1.3 Sonstige, verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5' - 3' Richtung	Bindungsstelle
CSIII	5'ATG GGA GCC CAC GCC CAG CTC 3'	nt1225 -1245
SP6	5'GGC CGT CGA CAT TTA GGT GAC AC 3'	Polylinker des P1-Phagen
T7	5'CCG CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG A 3'	Polylinker des P1-Phagen
TK1	5'GCG GTC GAC TAG AGC TTG CGG A 3'	Thymidinkinasegen (PolyA-Schwanz)

Neo1	5'GGACGTAAA CTC CTC TTC AGA C 3'	Neomycinresistenzgen
PL1	5'ACC CTC ACT AAA GGG AAC AA 3'	pBS bxp3
PL2	5'CGA AGA GCT CGG ATC CAA GCT TGA TAA CTT CGT ATA GCA 3'	pBS bxp3
TK140	5'ATC CGA AAA GAA AAC GTT GA 3'	Cre Rekombinasegen
TK142	5'ATC CAG GTT ACG GAT ATA GT 3'	Cre Rekombinasegen

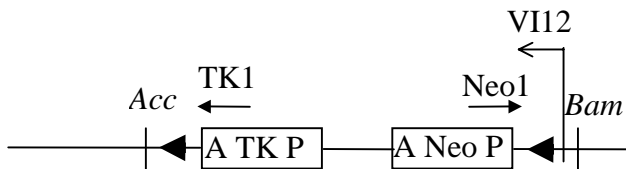


Abbildung 6-2 Lage der Primer TK 1, Neo 1 und VI12 (Pfeile). A steht für PolyA-Schwanz, P für Promoter, TK für Thyminkinase und Neo für Neomycinresistenz, senkrechte Linien sind Restriktionsschnittstellen: Acc, Acc65I, Bam, BamHI.

## 6.2 Sequenzvergleich der Wildtyp $\alpha_{1C}$ Untereinheit mit einem RT PCR Fragment eines (-/-) Embryos in der kritischen Region

Wildtyp	CTCCTGAAGA	TGTACAGCCT	GGGTCTTCAG	GCCTATTTTG	TGTCCTCTT
knock-out	CTCCTGAAGA	TGTACAGCCT	GGGTCTGCAG	GCCTATTTTG	TGTCCTTCTT
Wildtyp	CAACCGCTTT	GACTGTTTCA	TTGTGTGTGG	GGGCATCCTG	GAGACCATCC
knock-out	CAACCGCTTT	GACTGTTTCA	TTGTGTGTGG	GGGCATCCTG	GAGACCATCC
Wildtyp	TGGTGGAGAC	GAAGATCATG	TCTCCCCTGG	GCATCTCTGT	GCTGAGATGT
knock-out	TGGTGGAGAC	GAAGATCATG	TCTCCCCTGG	GCATCTCTGT	GCTGAGATGT
			<b>exon 13•exon14</b>		
Wildtyp	GTGCGGTTGC	TCAGGATCTT	CAAGATCACC	<b>AGG</b> TACTGGA	ATTCCTTGAG
knock-out	GTGCGGTTGC	TCAGGATCTT	CAAGATCACC	AG~~~~~	~~~~~
Wildtyp	CAACCTTG TG	GCATCCTTGC	TGAACTCAGT	GCGCTCCATT	GCCTCCCTGC
knock-out	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Wildtyp	TGCTGCTCCT	CTTCCTCTTC	ATCATCATCT	TCTCCCTCCT	GGGGATGCAG
knock-out	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Wildtyp	CTCTTTGGAG	GGAAGTTCAA	TTTCGATGAG	ATGCAGACCC	GTAGGAGCAC
knock-out	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
			<b>exon 14•exon 15</b>		
Wildtyp	GTTTCGATAAC	TTCCCGCAGT	CTCTCCTCAC	TGTGTTTCAG	ATCCTGACCG
knock-out	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Wildtyp	GGGAGGACTG	GAATTCGGTG	ATGTATGATG	GGATCATGGC	TTATGGCGGC
knock-out	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Wildtyp	CCCTCTTTTC	CAGGGATGTT	AGTCTGTATT	TACTTCATCA	TCCTCTTCAT
knock-out	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
		<b>Exon 15•</b>	<b>Intronsequenz</b>	<b>Exon 16</b>	
Wildtyp	CTGTGGAAAT	<b>T</b>		<b>ATATCCTACT</b>	GAATGTGTTC
knock-out	~~~~~	~~	<b>AGTGG ACACAAACA</b>	<b>GATATCCTACT</b>	GAATGTGTTC
Wildtyp	TTGGCCATTG	CGGTGGACA	ACCTGGCTGA	TGCGGAGAGC	CTGACCTCAG
knock-out	TTGGCCATTG	CGGTGGACA	ACCTGGC <b>TGA</b>	TGCGGAGAGC	CTGACCTCAG
			*		
Wildtyp	CCCAAAGGA	GGAGGAAGAA	GAGAAGGAGA	GGAAGAAGCT	G
knock-out	CCCAAAGGA	GGAGGAAGAA	GAGAAGGAGA	GGAAGAAG~~	~

**6.3 Mittelwerte der Kontraktionen der Herzen, isoliert am Tag 12,5 p.c. und der Herzzellen einen Tag nach der Kultivierung.**

+/+	Tag 12,5	Tag 13,5
1	35	79
2	26	92
3	24	72
4	24	103
5		83
6		92

+/-	Tag 12,5	Tag 13,5
1	30	91
2	33	115
3	15	97
4	38	108
5	26	104
6	24	105
7	16	121
8	40	86
9	64	64
10		52

-/-	Tag 12,5	Tag 13,5
1	56	153
2	94	105
3	31	88
4	32	154
5	56	116
6	42	120
7	30	134
8		175
9		48
10		91

## 6.4 Verwendete Restriktionsenzyme

Tabelle 6-1 Verwendete Restriktionsenzyme. N steht für ein beliebiges Nukleotid. Die Schnittstellen sind mit / gekennzeichnet. Die optimale Inkubationstemperatur ist für fast alle angegebenen Enzyme 37 °C, für *SmaI* 25 °C.

Restriktionsenzym	Firma	Erkennungssequenz	Puffer
<i>Asp718</i>	Boehringer	5'-G/GTACC-3'	B
<i>BamHI</i>	NEB	5'-G/GATCC-3'	B
<i>BglII</i>	NEB	5'-A/GATCT-3'	NEB 3
<i>BsrGI</i>	NEB	5'-T/GTACA-3'	NEB 2
<i>BstXI</i>	NEB	5'-CCANNNNN/NTGG-3'	NEB 3
<i>Clal</i>	Boehringer	5'-AT/CGAT-3'	H
<i>DdeI</i>	NEB	5'-C/TNAG-3'	NEB 3
<i>DraI</i>	NEB	5'-TTT/AAA-3'	NEB 4
<i>EcoRI</i>	NEB	5'-G/AATTC-3'	NEB 3
<i>EcoRV</i>	NEB	5'-GAT/ATC-3'	NEB 2
<i>Fnu4HI</i>	NEB	5'-GC/NGC-3'	NEB 4
<i>HindIII</i>	NEB	5'-A/AGCTT-3'	NEB 2
<i>KpnI</i>	NEB	5'-G/GTACC-3'	B, NEB 1
<i>MluI</i>	NEB	5'-A/CGCGT-3'	NEB 3
<i>NcoI</i>	NEB	5'-C/CATGG-3'	NEB 4
<i>NheI</i>	NEB	5'-G/CTAGC-3'	NEB 2
<i>NotI</i>	NEB	5'-GC/GGCCGC-3'	NEB 3
<i>PacI</i>	NEB	5'-TTAAT/TAA-3'	NEB 1
<i>PmeI</i>	NEB	5'-GTTT/AAAC-3'	NEB 4
<i>PstI</i>	NEB	5'-CTGCA/G-3'	NEB 3
<i>SalI</i>	NEB	5'-G/TCGAC-3'	NEB U
<i>SfiI</i>	NEB	5'-GGCCNNNN/NGGCC-3'	NEB 2
<i>SmaI</i>	NEB	5'-CCC/GGG-3'	NEB 4
<i>SpeI</i>	NEB	5'-A/CTAGT-3'	NEB 2
<i>SphI</i>	NEB	5'-GCATG/C-3'	NEB 2
<i>SstI</i>	Gibco-BRL	5'-G/TCGAC-3'	R 2
<i>StuI</i>	NEB	5'-AGG/CCT-3'	NEB 2
<i>XbaI</i>	NEB	5'-T/CTAGA-3'	NEB 2
<i>XhoI</i>	NEB	5'-C/TCGAG-3'	NEB 2

## 6.5 Drei-Buchstaben-Code und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren:

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V



## 7 Literaturverzeichnis

- Angelotti B, Hofmann F, (1996)** Tissue-specific expression of splice variants of the mouse voltage-gated calcium channel  $\alpha_2\delta$  subunit. *FEBS Lett* 392: 331-337
- Beaucage SL, Caruthers MH (1981)** Deoxynucleoside phosphoramidites. A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron –letters* 22: 1859-1862
- Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, Mets M, Musarella MA, Boycott KM (1998)** Loss-of-function mutations in a calcium-channel  $\alpha_1$ -subunit gene in Xp 11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature Gen.* 19: 264-267
- Biel M, Hullin R, Freundner S, Singer D, Dascal N, Flockerzi V, Hofmann F (1991)** Tissue-specific expression of high-voltage –activated dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels. *Eur. J. Biochem.* 200: 81-88
- Biel M, Ruth P, Bosse E, Hullin R, Stühmer W, Flockerzi V, Hofmann F (1990)** Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett.* 269: 409-412
- Birnboim HC, Doly J (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid. *Nucl. Acids. Res.* 7: 1513-1518
- Black JL, Lennon VA, (1999)** Identification and cloning of putative human neuronal voltage-gated calcium channel  $\gamma$ -2 and  $\gamma$ -3 subunits: neurologic implications. *Mayo. Clin. Proc.* 74: 357-361
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynecker HL, Boyer HW (1977)** Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113
- Bosse E, Regulla S, Biel M, Ruth P, Meyer HE, Flockerzi V, Hofman F (1990)** The cDNA and deduced amino acid sequence of the  $\gamma$  subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.* 267: 153-156
- Brocard J, Warot X, Wendling O, Messaddeq N, Vonesch JL, Chambon P, Metzger D (1997)** Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14559-14563
- Capecchi MR (1989)** Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288-1292

- Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, Perez-Reyes E (1993)** Cloning and expression of neuronal calcium channel  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.* 268: 12359-12366
- Chen J, Kubalak SW, Chien KR (1998)** Ventricular muscle-restricted targeting of the RXR  $\alpha$  gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis. *Development* 125: 1943-1949
- Chirgwin JM, Przybyla AE, Macdonald RJ, Rutter WJ (1979)** Isolation of biochemically active ribonucleic acid from source enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299
- Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E (1998)** Cloning and characterization of  $\alpha_{1H}$  from human heart, a member of the T-type  $Ca^{2+}$  channel gene family. *Circ. Res.* 83: 103-109
- Chuang RSI, Jaffe H, Cribbs L, Perez-Reyes E, Swartz KJ (1998)** Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nature neuroscience* 1 (4): 668-674
- Davies MP, An RH, Doevendans P, Kubalak S, Chien KR, Kass RS (1996)** Developmental changes in ionic channel activity in the embryonic murine heart. *Circ. Res.* 78: 15-25
- De Jongh KS, Warner C, Colvin AA, Hell JW, Takahashi M, Catterall WA (1991)** Characterization of two size forms of the  $\alpha_1$  subunit of skeletal muscle L-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10778-10782
- Eberst R, Dai S, Klugbauer N, Hofmann F (1997)** Identification and functional characterization of a calcium channel  $\gamma$  subunit. *Pflügers Arch.* 433: 63-637
- Ellis SB, Williams ME, Ways NR (1988)** Sequence and expression of mRNA encoding the  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 241: 1661-1664
- Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon (1996)** Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10887-10890
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983)** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13
- Gu H, Zou YR, Rajewsky K (1993)** Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73: 1155-1164

- Gollasch M, Haase H, Ried C, Lindschau C, Morano I, Luft FC, Haller H (1998)** L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* 12: 593-601
- Hamill OP, Marty E, Neher E, Sakman B, Sigworth FJ (1981)** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100
- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V (1994)** Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 399-418
- Hofmann F, Lacinová L, Klugbauer N (1999)** Voltage-dependent calcium channels: From structure to function. 139: 32-87
- Hoess RH, Abremski (1990)** The Cre-lox recombination system. *Nucleic Acids and Molecular Biology* 4: 99-109
- Hogan B, Beddington R, Costanini F, Lacy E (1994)** Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Holmes DS, Quigley M (1981)** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197
- Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V (1992)** Calcium channel  $\beta$  subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.* 11: 885-890
- Jaenisch R (1988)** Transgenic animals. *Science* 240: 1468-1474
- Jay SD, Ellis SB, McCue AF, Williams ME, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP (1990)** Primary structure of the  $\gamma$  subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 248: 490-492
- Kaufmann, M H (1998)** The atlas of mouse development (second printing).
- Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M, Hofmann F (1999a)** Molecular diversity of the calcium channel  $\alpha_2\delta$  subunit. *J. Neurosci.* 19 (2) 684-691
- Klugbauer N, Marais E, Lacinova L, Hofmann F (1999b)** A T-type calcium channel from brain. *Pflügers Arch*
- Klugbauer N (1999c)** Molekulare Grundlagen der Wirkung von Kalziumkanalblockern. *Med Welt* 50: 506-511

- Klugbauer N, Dai S, Specht V, Lacinova L, Marais E, Bohn G, Hofmann F (2000)** A family of  $\gamma$ -like calcium channel subunits. *FEBS* 00: 1-9
- Kollmar R, Montgomery LG, Fak J, Henry LJ, Hudspeth AJ (1997a)** Predominance of the  $\alpha_{1D}$  subunit in L-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels of hair cells in the chicken's cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14883-14888
- Kollmar R, Fak J, Montgomery LG, Hudspeth AJ (1997b)** Hair cell-specific splicing of mRNA for the  $\alpha_{1D}$  subunit of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the chicken's cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14889-14893
- Kühbänder S, Brummer S, Hofmann F, Feil R (2000)** Conditional gene targeting in smooth muscle of mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 361 (4).
- Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K (1995)** Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427-1429
- Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn R (1999)** Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic  $\beta$  cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96: 329-339
- Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS, Mori Y, Campbell KP, Frankel WN (1998)** The mouse stargazer gene encodes a neuronal  $\text{Ca}^{2+}$ -channel  $\gamma$  subunit. *Nature Gen.* 19: 340-347
- Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F (1997)** Regional expression and cellular localization of the  $\alpha_{1C}$  and  $\beta$  subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J. Neurosci.* 17 (4): 1339-1349
- Ma WJ, Holz RW, Uhler MD (1992)** Expression of a cDNA for a neuronal calcium channel alpha 1 subunit enhances secretion from adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 267: 22728-22732
- Metzger D, Feil R (1999)** Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 470-476
- Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P (1995)** Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6991-6995
- Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S (1989)** Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340: 230-233

- Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Bagstrom E, Lacerda AE, Wei XY, Birnbaumer L (1992)** Cloning and expression of a cardiac / brain  $\beta$  subunit of the L-type calcium channel. *J. Biol. Chem.* 267: 1792-1797
- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH (1998a)** Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391: 896-900
- Postic C, Shiota M, Nisweder KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, Shelton KD, Lindner J, Cherrington AD, Magnuson (1999)** Dual role for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic  $\beta$  cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *JBC* 274: 305-315
- Powers PA, Liu S, Hogan K, Gregg RG (1992)** Skeletal muscle and brain isoforms of a  $\beta$ -subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *J. Biol. Chem.* 267: 22967-22972
- Pragnell M, Sakamoto J, Jay SD, Campbell KP (1991)** Cloning and tissue-specific expression of the brain calcium channel b-subunit. *FEBS Lett.* 291: 253-258
- Rajewsky K, Gu H, Kühn R, Betz UAK, Müller W, Roes J, Schwenk F (1996)** Conditional gene targeting. *J.Clin. Invest.* 98 (3): 600-603
- Rios E, Pizarro G, Stefani E (1992)** Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation contraction coupling. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 109-133
- Ruth P, Röhrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann F (1989)** Primary structure of the b subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 245: 1115-1118
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Seino S, Chen L, Seino M, Blondel D, Takeda J, Johnson JH, Bell GI (1992)** Cloning of the  $\alpha_1$  subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic  $\beta$ -cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 584-588
- Seisenberger C, Welling A, Specht V, Platzer J, Pfeifer A, Kühbandner S, Feil R, Striessnig J, Klugbauer N, Hofmann F (2000)** Disruption of the  $\alpha_{1C}$  L-type calcium channel uncovers an unusual L-type current in embryonic murine cardiocytes. (submitted)

- Shistik E, Ivanina T, Puri T, Hosey M, Dascal N (1995)** Ca<sup>2+</sup> current enhancement by  $\alpha_2/\delta$  and  $\beta$  subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and  $\alpha_1$  protein level. *J. Physiol.* 489: 55-62
- Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N (1991)** The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 253: 1553-1557
- Soldatov NM (1994)** Genomic structure of human L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Genomics* 22: 77-87
- Southern EM (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517
- Strachan T, Read AP (1996)** Molekulare Humangenetik, Spektrum Akademischer Verlag
- Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellbrand H, Lorenz B, Weber BHF, Wutz K, Gutwillinger N, Rütther K, Drescher B, Sauer C, Zrenner E, Meitinger T, Rosenthal A, Meindl A (1998)** An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature Gen* 19: 260-263
- Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BFX, Catterall WA (1987)** Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5478-5482
- Torres RM, Kühn R (1997)** Laboratory Protocols for Conditional Gene Tageting. Oxford University Press
- Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ, Mayford M, Kandel ER, Tonegawa S (1996)** Subregion- and cell type-restricted gene knock-out in mouse brain. *Cell* 87: 1317-1326
- Wei XY, Perez-Reyes E, Lacerda AE, Schuster G, Brown AM, Birnbaumer L (1994)** Modification of Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_1$  subunit by skeletal muscle  $\beta$  and  $\gamma$  subunits. *J. Biol. Chem.* 266: 21943-21947(1991)
- Welling A, Kwan YW, Bosse E, Flockerzi V, Hofmann F, Kass RS (1993)** Subunit-dependent modulation of recombinant L-type calcium channels: molecular basis for dihydropyridine tissue selectivity. *Circ. Res.* 73: 974-980
- Welling A, Ludwig A, Zimmer S, Klugbauer N, Flockerzi V, Hofman F (1997)** Alternatively spliced IS6 segments of the  $\alpha_{1C}$  gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Circ. Res.* 81: 526-532

**Williams ME, Feldman DH, MC Cue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM (1992)** Structure and functional expression of  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2\delta$  and  $\beta$  subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8: 71-84

**Wiser O, Trus M, Tobi D, Halevi S, Giladi E, Atlas D (1996)** The  $\alpha_2/\delta$  subunit of voltage sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels is a single transmembrane extracellular protein which is involved in regulated secretion. *FEBS Lett.* 379: 15-20

### **7.1 Eigene Veröffentlichungen**

**Specht V, Klugbauer N, Hofmann F (1998)** Construction of a vector for conditional gene targeting of the  $\alpha_{1C}$  subunit of the L-type Ca-channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 358 (1) 13<sup>th</sup> International Congress of Pharmacology (IUPHAR)

**Specht V, Klugbauer N, Hofmann F (1998)** Construction of a targeting vector for conditional gene targeting of the  $\alpha_{1C}$  subunit of the L-type calcium channel. 23<sup>rd</sup> European Symposium Mont Sainte Odile September 25-28

**Specht V, Klugbauer N, Kühbandner S, Feil R, Hofmann F (1999)** Construction of a vector for conditional gene targeting of the  $\alpha_{1C}$  subunit of the L-type calcium channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 359 (3) Abstracts of the 40<sup>th</sup> Spring Meeting

**Specht V, Welling A, Seisenberger C, Klugbauer N, Kühbandner S, Feil R, Hofmann F (2000)** Characterization of cardiac myocytes from embryos at day 12,5 p.c. with a disrupted  $\alpha_{1C}$  L-type calcium channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 361 (4) Abstracts of the 41<sup>st</sup> Spring Meeting

**Klugbauer N, Dai S, Specht V, Lacinova L, Marais E, Bohn G, Hofmann F (2000)** A family of  $\gamma$ -like calcium channel subunits. *FEBS Lett.* 470: 189-197

**Seisenberger C, Welling A, Specht V, Platzer J, Pfeifer A, Kühbandner S, Feil R, Striessnig J, Klugbauer N, Hofmann F (2000)** Disruption of the  $\alpha_{1C}$  L-type calcium channel uncovers an unusual L-type current in embryonic murine cardiocytes. (submitted)

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Norbert Klugbauer für die kompetente Betreuung dieser Arbeit, seine zahlreichen Anregungen und seine fachliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, für alle wissenschaftlichen Ratschläge und für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Walter Staudenbauer bedanke ich mich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Robert Feil und Frau Susanne Kühbandner danke ich ganz herzlich für die sehr hilfreiche Unterstützung angefangen vom ES Zell Targeting bis hin zur Maus - besonders danke ich Susanne für die erfolgreiche Injektion der ES Zellen.

Herrn Prof. Dr. Martin Biel danke ich für seinen fachlichen Rat und für die gute Einführung in den Umgang mit embryonalen Stammzellen der Maus.

Frau Susanne Kampf und Frau Sabine Erhardt danke ich für die fröhliche und erfolgreiche Zusammenarbeit im Labor und speziell Susanne danke ich für die hervorragende Hilfe im Tierstall und die nette Zeit auch außerhalb des Labors.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Andrea Welling für die Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen und für die gute Zusammenarbeit.

Frau Dr. Claudia Seisenberger danke ich für die fachlichen Diskussionen über die Ergebnisse unserer beider k.o. Mäuse.

Bei Frau Dr. Lubica Lacinová bedanke ich mich ganz herzlich für die Abbildungen des HVA Kalziumkanalkomplexes und der Strukturmodelle der Hilfsuntereinheiten.

Frau Dr. Andrea Gerstner, Frau Elsé Marais und Herrn Dr. Andreas Ludwig danke ich für den regen Austausch von Erfahrungen im Laboralltag und für ihre Hilfsbereitschaft.

Frau Anna Klein und Frau Petra Mayr danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die fröhliche Zeit in und außerhalb des Labors.

Allen Mitarbeitern, die während dieser Arbeit irgendwann im zweiten Stock tätig waren, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Frau Roller gilt mein Dank für die photographischen Arbeiten, die sie für mich erledigt hat.

Weiterhin sei meinen netten Kolleginnen, Kollegen und Freunden im Institut für die gute Zusammenarbeit und die sehr nette Atmosphäre gedankt.

Besonderer Dank gilt meiner Familie – für alles.