

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München

Induzierbare Cre-vermittelte Rekombination im glatten Muskel der Maus

Susanne Kühbandner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Bauer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H.-R. Fries
2. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann

Die Dissertation wurde am 19.12.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum für Ernährung, Land-
nutzung und Umwelt am 22.02.2001 angenommen.

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V

A. Einleitung

A.1. Konditionale Mutagenese mit Hilfe des Cre/lox Systems.....	1
A.2. Liganden-aktivierbare Cre Rekombinasen	4
A.3. Validierung transgener Cre Mäuse	6
A.4. Kalziumregulation im glatten Muskel	7
A.5. Zielsetzung	8

B. Material und Methode

B.1. Molekularbiologische Methoden	9
B.1.1. Konstruktion von Plasmiden.....	9
B.1.2. Synthese von Oligonukleotiden.....	10
B.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und RT-PCR.....	10
B.1.4. Sequenzierung von DNS	12
B.1.5. Southern Blot Analyse	12
B.1.6. Quantifizierung von Nukleinsäuren und Proteinen.....	15
B.2. Erzeugung genetisch veränderter Mäuse	16
B.2.1. Kultivierung embryonaler Stammzellen.....	16
B.2.2. Homologe Rekombination in ES Zellen	21
B.2.3. Identifizierung genetisch modifizierter ES Zellen.....	25
B.2.4. Injektion von Blastozysten und Reimplantation	26
B.2.5. Testen von chimären Mäusen auf Keimbahntransmission	31
B.2.6. Haltung und Zucht der Mäuse	32
B.3. Analyse genetisch veränderter Mäuse	32
B.3.1. Präparation und Verabreichung von Liganden	32
B.3.2. Isolierung von DNS und RNS aus Mausgewebe.....	33
B.3.3. Isolierung von Proteinen aus Mausgewebe	34
B.3.4. Kultivierung glatter Muskelzellen aus Mauseaorta	35
B.3.5. Histochemische Methoden und Immunfärbung	36
B.3.6. Bestimmung der Rekombinationseffizienz	38
B.3.7. Dokumentation.....	39

C. Ergebnisse

C.1. Expression von CreER^T unter der Kontrolle des cGKI Promotors	40
C.1.1. Herstellung von GK-KI Mäusen.....	40
C.1.2. Expression von CreER ^T und Rekombination in GK-KI Mäusen.....	43
C.1.3. Expression der cGKI in GK-KI Mäusen.....	46
C.2. Expression von CreER^{T2} unter der Kontrolle des SM22 Promotors	47
C.2.1. Herstellung von SM-TG und SM-KI Mäusen.....	48
C.2.2. Vergleichende Analyse von SM-TG und SM-KI Mäusen	53
C.2.3. Expression von CreER ^{T2} und Rekombination in SM-KI Mäusen.....	57
C.2.4. Expression von SM22 in SM-KI Mäusen	64

D. Diskussion

D.1. Expression von CreER^T unter der Kontrolle des cGKI Promotors	65
D.2. Expression von CreER^{T2} unter der Kontrolle des SM22 Promotors	66
D.2.1. Vergleichende Analyse von SM-TG und SM-KI Mäusen	67
D.2.2. Gewebeselektivität und Effizienz der Rekombination in SM-KI Mäusen ...	69
D.2.3. Vergleich von SM-KI Mäusen mit konventionellen „glattnuskel- spezifischen“ Cre Mäusen.....	70
D.2.4. Vergleich von SM-KI Mäusen mit anderen Liganden-aktivierbaren Cre Mäusen.....	73
D.3. Zukunftsperspektive	74

E. Zusammenfassung

77

F. Anhang

F.1. Verwendete Oligonukleotide	79
F.2. PCR Genotypisierung	79
F.3. Verwendete Antikörper	80
F.4. Analyse der Rekombination in SM-KI Mäusen	80
F.5. Verwendete transgene Mauslinien.....	81

G. Literaturverzeichnis

G.1. Zitierte Veröffentlichungen	82
G.2. Eigene Veröffentlichungen.....	87

Abbildungsverzeichnis

Abb. A-1.	Das Cre/lox Rekombinationssystem	2
Abb. A-2.	Konventionelle und konditionale Mutagenese in der Maus	3
Abb. A-3.	Struktur und Eigenschaften von Tamoxifen-aktivierbaren Cre Rekombinasen	5
Abb. A-4.	Das ACZL Rekombinations-Reportertransgen	6
Abb. B-1.	Aufbau des Southern Blots	14
Abb. B-2.	Herstellung genetisch veränderter Mäuse	17
Abb. B-3.	Prinzip des „Gene Targeting“	22
Abb. B-4.	Vorgehen zur Isolierung von ES Zellklonen.....	24
Abb. B-5.	Injektion von ES Zellen in Blastozysten.....	28
Abb. B-6.	Chimäre Mäuse und Keimbahntransmission	31
Abb. C-1.	Strategie zur Erzeugung der cGKI Knock-in Mauslinie GK-KI	40
Abb. C-2.	Erzeugung von GK-KI Mäusen	42
Abb. C-3.	RT-PCR Analyse der Expression von CreER ^T in GK-KI Mäusen.....	44
Abb. C-4.	PCR Analyse der Rekombination in GK-KI Mäusen	45
Abb. C-5.	Western Blot Analyse der cGKI Expression in GK-KI Mäusen	46
Abb. C-6.	Genotypen der Nachkommen heterozygoter (+/-) GK-KI Eltern	47
Abb. C-7.	Schematische Darstellung des SM22 Gens.....	48
Abb. C-8.	Erzeugung von SM-TG Mäusen	49
Abb. C-9.	Erzeugung von SM-KI Mäusen.....	52
Abb. C-10.	PCR Genotypisierung von SM-KI Mäusen.....	53
Abb. C-11.	RT-PCR Analyse der Expression von CreER ^{T2} in SM-TG und SM-KI Mäusen	54
Abb. C-12.	Rekombination und CreER ^{T2} Expression in kultivierten VSMCs von SM-TG und SM-KI Mäusen.....	55
Abb. C-13.	Transgen-Integrationsmuster in SM-TG Mäusen und Herstellung von SM-TG-E Mäusen	56
Abb. C-14.	RT-PCR Analyse der Expression von CreER ^{T2} und SM22 in SM-KI Mäusen	57
Abb. C-15.	PCR Analyse der Rekombination in SM-KI Mäusen	58
Abb. C-16.	Histochemische Analyse der Rekombination in Organen von SM-KI Mäusen	59
Abb. C-17.	Rekombination im vaskulären und viszeralen glatten Muskel von SM-KI Mäusen	60
Abb. C-18.	Zelluläre Spezifität und Effizienz der Rekombination in SM-KI Mäusen	62
Abb. C-19.	Sensitivität und Persistenz der Rekombination in SM-KI Mäusen.....	63
Abb. C-20.	Western Blot Analyse der SM22 Expression in SM-KI Mäusen.....	64
Abb. D-1.	Modell der Aktivierung von CreER Rekombinasen durch Tamoxifen.....	68
Abb. D-2.	Konditionale Mutagenese im glatten Muskel der Maus	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle B-1. Medien für die ES Zellkultur	18
Tabelle B-2. Gefäße für die Zellkultur	19
Tabelle B-3. Liganden für die Zellkultur	33
Tabelle B-4. Protease-Inhibitoren	34
Tabelle B-5. Filtersätze für die Fluoreszenzmikroskopie	39
Tabelle C-1. Ausbeute bei der Etablierung der GK-KI Mauslinie	43
Tabelle C-2. Ausbeute bei der Etablierung der SM-TG Mauslinie.....	51
Tabelle C-3. Ausbeute bei der Etablierung der SM-KI Mauslinie	51

Abkürzungsverzeichnis

α_{1c}	porenbildende Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
ACZL	P_{CAG} - <i>loxP</i> -CAT- <i>loxP</i> - <i>lacZ</i> Reportertransgen	i.p.	intraperitoneal
bp	Basenpaar	IRES	Internal Ribosomal Entry Site
BSA	Rinderserumalbumin	kb	Kilobase
CAG	chicken β -actin gen	kDa	Kilodalton
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase	<i>lacZ</i>	β -Galaktosidasegen
cDNS	komplementäre DNS	LB	Luria-Bertani
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I	LBD	Ligandenbindungsdomäne
CMV	Cytomegalovirus	LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
cpm	counts per minute	<i>loxP</i>	DNS-Substrat von Cre (locus of crossing over of P1)
Cre	Cre Rekombinase (cyclization recombination)	neo	Neomycinresistenzgen
CreER ^T	Tamoxifen-aktivierbare Cre Rekombinase mit ER ^T -LBD	nt	Nukleotid
CreER ^{T2}	Tamoxifen-aktivierbare Cre Rekombinase mit ER ^{T2} -LBD	OD	optische Dichte
Cy3	Indocarbocyanin	OHT	4-Hydroxytamoxifen
ddNTP	2',3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphat	P	Promotor
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	pA	Polyadenylierungssignal
DMSO	Dimethylsulfoxid	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DNS	Desoxyribonukleinsäure	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat	p.c.	<i>post coitum</i>
E2	17 β -Östradiol	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure	PGK	Phosphoglycerat Kinase
EF	embryonale Fibroblasten („Feederzellen“)	p.o.	peroral
ER	Östrogenrezeptor	p.p.	<i>post partum</i>
ER ^T	LBD des Östrogenrezeptors mit G521R Mutation	RNS	Ribonukleinsäure
ER ^{T2}	LBD des Östrogenrezeptors mit G400V/M543A/L544A Mutation	rpm	Umdrehungen pro Minute
ES Zellen	embryonale Stammzellen	RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
FBS	fötales Rinderserum	RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	SDS	Natriumdodecylsulfat
gefloxt	<i>loxP</i> -flankiert	SM22	“smooth muscle” spezifisches 22 kDa Protein
G418	Geneticin ^R	SV40	simian virus 40
GANC	Ganciclovir	TAE	Tris/Acetat/EDTA
HPRT	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase	Tam	Tamoxifen
		TBE	Tris/Borat-EDTA
		tk	Thymidinkinasegen
		t-RA	all-trans Retinsäure
		Tris	a,a,a-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
		U	Unit, Einheit
		VSMC	vaskuläre glatte Muskelzelle
		X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktosid

Die Abkürzungen für die verwendeten transgenen Mauslinien sind im Anhang (F.5) erklärt, die eingesetzten Inzucht- und Auszucht- Mauslinien sind unter B.2.6 aufgeführt.

A. Einleitung

A.1. Konditionale Mutagenese mit Hilfe des Cre/lox Systems

Die Möglichkeit das Mausgenom durch zufällige Integration von Transgenen oder gezielt über homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES Zellen) zu verändern hat entscheidend dazu beigetragen, die Funktion von Genen besser zu verstehen (Übersicht: Jaenisch, 1988; Capecchi, 1989). Da diese Techniken eine permanente genetische Modifikation in der Keimbahn der Maus erzeugen, führt das konventionelle Ausschalten eines Gens („Knockout“) in allen Zellen des Tieres während der prä- und postnatalen Entwicklung zum Verlust der Genfunktion (Abb. A-2A). Ein solcher „chronischer“ Gen-Knockout kann zu embryonalem Tod oder Mausmutanten mit schweren Defekten und stark eingeschränkter Lebensfähigkeit führen. Insbesondere kann die zeit- und zelltypspezifische Funktion eines Gens an konventionellen Nullmutanten nicht analysiert werden. Zudem eignen sich die oben genannten Techniken nicht zur Erzeugung komplexer chromosomaler Veränderungen, wie großer Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen. Deshalb wurden die klassischen Methoden zur Modifikation von Genen mit Rekombinationssystemen kombiniert, die darauf beruhen, dass Rekombinasen einen Austausch zwischen zwei kurzen DNS Erkennungssequenzen herbeiführen. Obwohl diese Rekombinasen mikrobiellen Ursprungs sind, kann die Rekombination in höheren Eukaryonten wie Pflanzen, Fliegen und Mäusen stattfinden. Das Cre/lox Rekombinationssystem hat sich in Säugerzellen als sehr effizient erwiesen und wird daher verwendet, um gezielte genetische Veränderungen in ES Zellen und in Somazellen der Maus zu induzieren (Übersicht: Sauer, 1994).

Die Cre („cyclization recombination“) Rekombinase ist ein 38 kDa Protein des Bakteriophagen P1. Cre katalysiert die Rekombination zwischen zwei 34 bp *loxP* („locus of crossing over of P1“) Erkennungssequenzen, ohne dass die Rekombinase hierzu einen Cofaktor benötigt. Abhängig von der Orientierung der *loxP* Sequenzen zueinander und dem Ort ihrer Integration kann man durch Cre-vermittelte Rekombination eine Inversion, Excision/Integration oder Translokation von DNS erzeugen (Abb. A-1). Das Cre/lox Rekombinationssystem bietet damit eine große Bandbreite an Variationen wie das Genom modifiziert werden kann. Um Veränderungen des Genoms *in vivo* durchzuführen, wurde bisher meist das Herausschneiden von *loxP*-flankierten („gefloxten“) DNS Segmenten verwendet (Abb. A-1C), z.B. um Gene durch Cre-vermittelte Excision gefloxter Exons zu inaktivieren (Übersicht: Sauer, 1998; Metzger & Feil, 1999; Nagy, 2000). Die Grundstrategie ist, *loxP* Erkennungssequenzen in das Chromosom entweder gezielt über homologe Rekombination in ES Zellen oder zufällig über ein konventionelles Transgen einzuführen und dann durch Expression von Cre eine Rekombination zu verursachen.

Rekombination zwischen *loxP* Sequenzen kann man in ES Zellen (Gu et al., 1993) oder in befruchteten Eizellen (Araki et al., 1995) über transiente Cre Expression genauso wie in Cre-transgenen Mäusen (Lakso et al., 1992; Orban et al., 1992) erhalten. Nach Einkreuzung von sog. Cre „deleter“ Mäusen, die Cre in einem frühen Entwicklungsstadium und/oder in Keimzellen exprimieren, kann die rekombinierte DNS über die Keimbahn weitergegeben werden. Cre „deleter“ Mäuse (z.B. CMV-Cre; Dupé et al., 1997; Schwenk et al., 1995) werden in erster Linie verwendet, um gefloxt Markergene zu entfernen oder Nullmutanten zu erzeugen (Übersicht: Rajewsky et al., 1996).

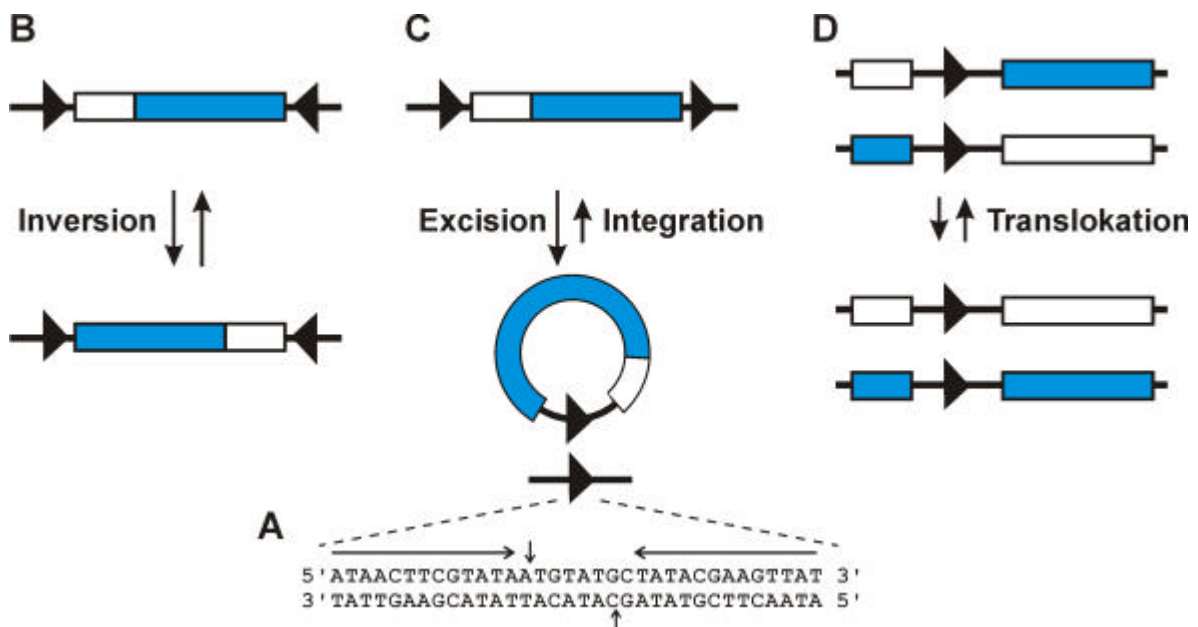


Abb. A-1. Das Cre/lox Rekombinationssystem

Cre verursacht die Rekombination zwischen zwei 34 bp langen *loxP* Erkennungssequenzen (Dreiecke). **(A)** Die *loxP* Sequenz besteht aus zwei 13 bp Palindromen (waagrechte Pfeile), die eine asymmetrische 8 bp „core“ Region flankieren. Die Phosphodiesterbindungen, die Cre spaltet, sind durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet. **(B)** Die Rekombination zweier entgegengesetzt orientierter *loxP* Sequenzen im selben DNS-Molekül (intramolekulare Rekombination) führt zur Inversion der dazwischenliegenden Region. **(C)** Die Rekombination zweier gleichgerichteter *loxP* Sequenzen in derselben DNS führt zur Excision des flankierten Segments. Wenn die *loxP* Sequenzen auf unterschiedlichen DNS Molekülen liegen (intermolekulare Rekombination), kann eine Integration **(C)** oder Translokation **(D)** der DNS erreicht werden. Die Länge der Reaktionspfeile gibt die relative Effizienz jeder Reaktion an.

In vielen Fällen wäre eine Modifikation des Genoms informativer, wenn man sie konditional, d.h. nur in einem bestimmten Zelltyp und zu einem gewählten Zeitpunkt während des Lebens des Tieres induzieren könnte. Derzeitige Strategien zur konditionalen somatischen Mutagenese in der Maus basieren auf der gewebespezifischen oder induzierbaren Expression von Cre über geeignete Promotoren (Abb. A-2B) sowie auf der Verwendung von Liganden-aktivierbaren Cre Rekombinasen (Abb. A-2C).

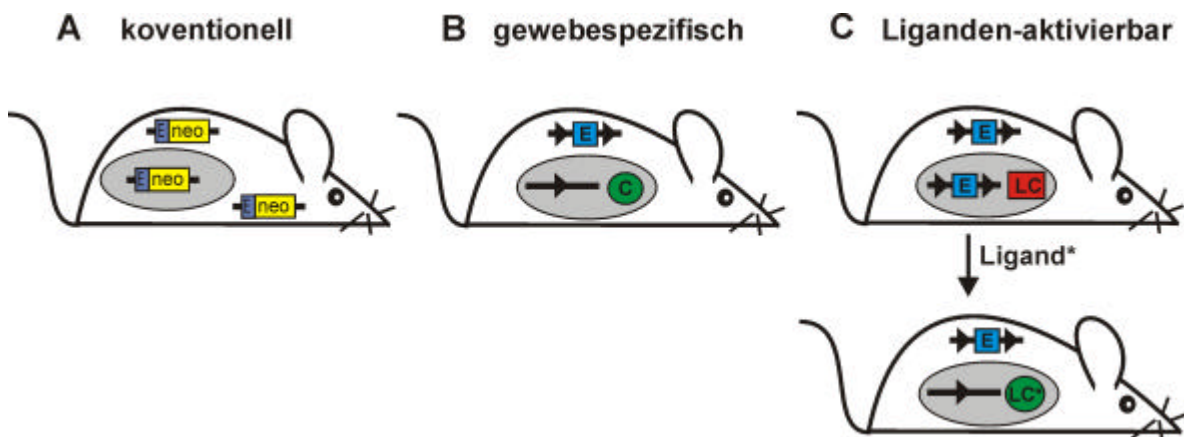


Abb. A-2. Konventionelle und konditionale Mutagenese in der Maus

(A) Konventionelle Inaktivierung eines Gens durch Einföhrung eines Neomycinresistenzgens (neo) in ein Exon (E). **(B)** Gewebespezifische Inaktivierung eines Gens durch Excision eines *loxP*-flankierten (Dreiecke) Exons (E) in allen Cre (C im grünen Kreis) exprimierenden Zellen (graues Oval). **(C)** Die Verwendung einer Liganden-aktivierbaren Cre Rekombinase (LC) erlaubt eine zeitliche Kontrolle der Rekombination. Diese modifizierte Cre Rekombinase ist zunächst inaktiv (LC im roten Quadrat) und wird erst in Anwesenheit eines synthetischen Liganden (*) aktiviert (LC* im grünen Kreis). Eine örtliche und zeitliche Regulation der Rekombination wird durch die gewebespezifische Expression einer Liganden-aktivierbaren Cre Rekombinase ermöglicht.

Die Probleme vieler transgener Cre Mauslinien liegen darin, dass die Rekombinase zu unerwünschten Zeitpunkten und/oder in unerwünschten Geweben gebildet wird („leakiness“) oder dass Cre mosaik exprimiert wird. Wenn Cre bereits während der frühen Embryonalentwicklung ektopisch aktiv ist, kann die DNS in den meisten Zellen des adulten Tieres rekombiniert sein. Auch wenn die Rekombination nur in einem Teil der Zellen eines bestimmten Gewebes stattfindet, erschwert dies die Analyse des Phänotyps. Andererseits könnte sich die Erzeugung von mosaiken Mutationen in bestimmten Fällen auch zur Etablierung von Krankheitsmodellen, z.B. für Krebs und Atherosklerose eignen.

Transgene Mauslinien, die Cre gewebespezifisch exprimieren (Abb. A-2B), haben bereits zur Aufklärung biologischer Fragestellungen beigetragen (z.B. Brüning et al., 1998; Chen et al., 1998; Hirota et al., 1999; Kulkarni et al., 1999). Durch die selektive Cre-vermittelte Inaktivierung von Genen in den gewünschten Geweben konnten Probleme der „chronischen“ Gendeletion (Abb. A-2A) wie embryonale Letalität umgangen werden. Mit Hilfe gewebespezifischer Knockout-Mäuse kann man auch unterscheiden, ob sich der beobachtete Phänotyp aus der primären Funktion des Gens im Gen-defizienten Gewebe ergibt, oder ob die Gendeletion in diesem Gewebe sekundär auch andere Gewebe beeinflusst.

A.2. Liganden-aktivierbare Cre Rekombinasen

Um den Zeitpunkt der Rekombination kontrollieren zu können, wurden modifizierte Cre Rekombinasen entwickelt, die sich durch synthetische Stoffe aktivieren lassen, sog. Liganden-aktivierbare Cre Rekombinasen (Abb. A-2C). Die Fusion von Cre mit mutierten Ligandenbindungsdomänen (LBDs) verschiedener Steroidhormonrezeptoren resultiert in chimären CreLBD Rekombinasen, deren Rekombinaseaktivität durch synthetische, nicht aber durch natürliche Liganden des jeweiligen Rezeptors induziert werden kann (Übersicht: Metzger & Feil, 1999).

Tamoxifen-aktivierbare Cre Rekombinasen (CreER Rekombinasen) wurden durch Fusion von Cre mit mutierten LBDs des Östrogenrezeptors (ER) konstruiert (Abb. A-3). CreER Rekombinasen sind zunächst inaktiv und können durch den partiellen ER-Antagonisten Tamoxifen bzw. dessen aktiven Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen (OHT) aktiviert werden. Die ursprüngliche CreER Rekombinase wird jedoch auch durch das körpereigene Hormon Östradiol (E2) aktiviert, was ihre Anwendung in der Maus limitiert. Durch Einführung spezifischer Punktmutationen in die ER-LBD entstanden die E2-insensitiven/Tamoxifensensitiven CreER-Derivate CreER^T und CreER^{T2}, die sich zur kontrollierbaren Rekombination im Maussystem eignen. In kultivierten Säugerzellen lässt sich CreER^{T2} durch etwa 5-fach niedrigere Konzentrationen von Tamoxifen aktivieren als CreER^T (Abb. A-3) (Feil et al., 1997).

Erste Versuche mit transgenen CreER^T Mäusen haben demonstriert, dass durch Verabreichung von Tamoxifen sowohl in Geweben erwachsener Mäuse (Feil et al., 1996; Brocard et al., 1997) als auch *in utero* während der Embryonalentwicklung (Danielian et al., 1998) eine zeitlich kontrollierbare Excision von geflochten Zielgenen möglich ist.

Allerdings waren relativ hohe Dosen von Tamoxifen (ca. 1 mg pro Injektion) nötig um die CreER^T Rekombinase *in vivo* zu aktivieren, was zu unerwünschten Nebenwirkungen der Tamoxifenbehandlung führen könnte. Weiterhin konnte selbst bei maximaler Tamoxifendosis keine vollständige Rekombination in einem ausgewählten Gewebe erzielt werden, was möglicherweise auf eine heterogene und/oder zu schwache Expression der Rekombinase zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass das Tamoxifen-aktivierbare Rekombinationssystem in der Maus funktioniert, aber auch, dass es bezüglich der Sensitivität gegenüber Tamoxifen und der Effizienz noch verbessert werden sollte.

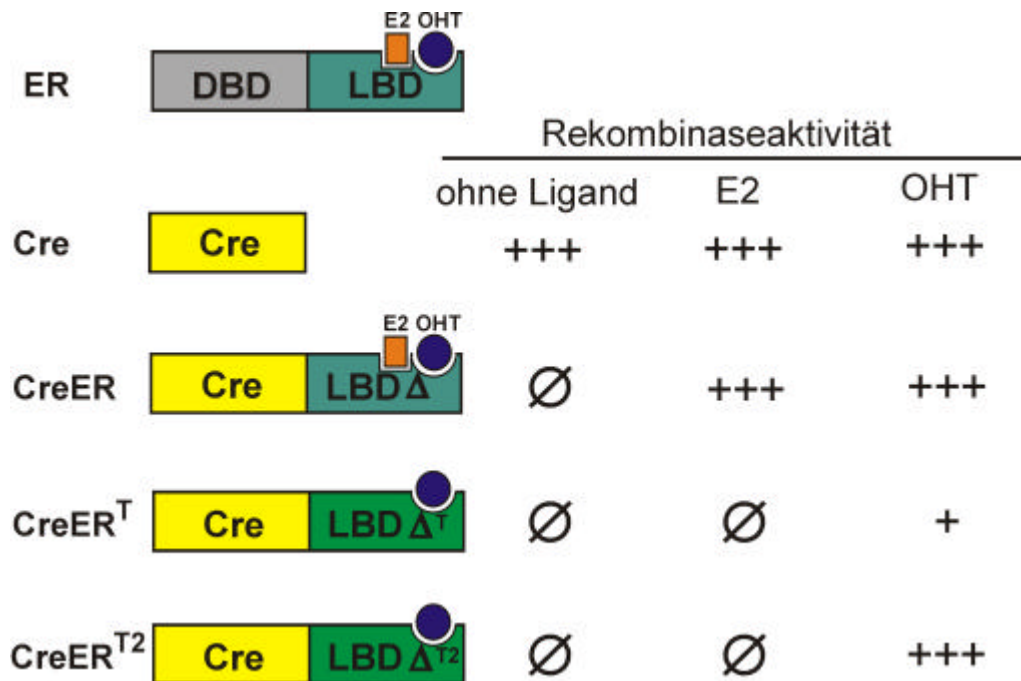


Abb. A-3. Struktur und Eigenschaften von Tamoxifen-aktivierbaren Cre Rekombinasen

Das Cre Gen (Cre) wurde an die cDNS von unterschiedlich modifizierten Ligandenbindungsdomänen (LBDs) des humanen Östrogenrezeptors (ER) fusioniert. Die relativen Aktivitäten von Cre und der chimären CreLBD Rekombinasen (CreER, CreER^T, CreER^{T2}) in kultivierten Säugerzellen in Abwesenheit und Anwesenheit von Liganden (E2, OHT) sind angegeben. Die CreER Rekombinasen enthalten in ihrer LBD folgende Mutationen (?): CreER, G400V; CreER^T, G521R; CreER^{T2}, G400V/M543A/L544A (Feil et al., 1997). DBD, DNS Bindungs-Domäne. Weitere Erklärung im Text.

A.3. Validierung transgener Cre Mäuse

Zur Interpretation des durch konditionale Mutagenese entstandenen Phänotyps ist es notwendig, das Rekombinationsmuster der verwendeten transgenen Cre Maus auf zellulärer Ebene zu kennen. Die Detektion von Cre auf Proteinebene wird durch den Mangel an guten Antikörpern erschwert. Außerdem kann eine transiente Cre Expression in einem früheren Stadium Rekombination verursacht haben (z.B. während der Embryonalentwicklung), obwohl später kein Cre Protein mehr nachweisbar ist (z.B. im adulten Tier). Deshalb ist es sinnvoll, direkt die Aktivität von Cre, also die Rekombination, zu untersuchen. Nach Verpaarung einer Cre Maus mit einer Maus, die ein gefloxtes Zielgen besitzt, kann durch PCR oder Southern Blot Analyse von aus verschiedenen Geweben isolierter DNS die Rekombinationsrate in jedem Gewebe abgeschätzt werden.

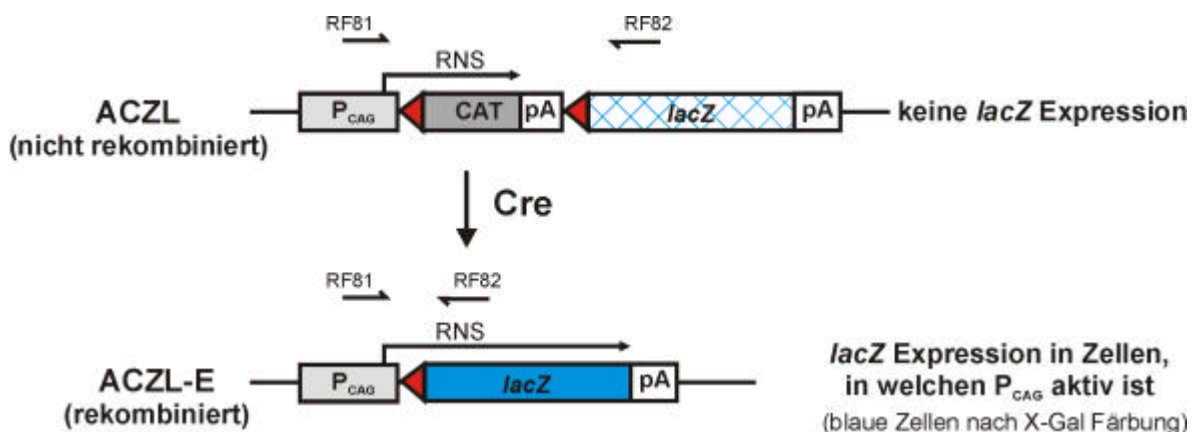


Abb. A-4. Das ACZL Rekombinations-Reportertransgen

Die transgene ACZL Mauslinie (Akagi et al., 1997) erlaubt die Detektion von Rekombination auf zellulärer Ebene durch den Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität mittels X-Gal Färbung von Geweben (Blaufärbung). Die RNS-Synthese vor (ACZL, oben) und nach (ACZL-E, unten) Cre-vermittelter Excision einer *loxP*-flankierten (Dreiecke) CAT Genkassette ist angedeutet (Pfeil). Die Rekombination kann auch direkt auf DNS Ebene durch PCR Analyse detektiert werden (Primer RF81+RF82; langes Produkt vor und kurzes Produkt nach Rekombination; F.1, F.2). P_{CAG} , „chicken β -actin“ Promotor; CAT, Chloramphenicol-Acetyltransferase Gen; pA, Polyadenylierungssignal; *lacZ*, β -Galaktosidase Gen. Weitere Erklärung im Text.

Zur Beurteilung der Gewebeselektivität und Effizienz der Rekombination auf zellulärer Ebene werden sog. Rekombinations-Reportermauslinien eingekreuzt, z.B. die ACZL Mauslinie (Akagi et al., 1997). ACZL Mäuse enthalten ein Transgen, das für ein zelluläres Markerprotein, die β -Galaktosidase, codiert. Die Expression der β -Galaktosidase ist aber zunächst durch ein gefloxtes DNS Segment blockiert und kann erst nach Cre-vermittelter Excision dieses Segments stattfinden (Abb. A-4). Durch den histologischen Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität mittels X-Gal Färbung können Zellen, in denen Cre aktiv war, einfach und sensitiv anhand ihrer blauen Farbe identifiziert werden. Man muss aber beachten, dass mit dieser Methode die Rekombination nur in denjenigen Zellen nachgewiesen wird, in welchen der zur Expression des Reportergens verwendete Promotor aktiv ist. Um zu kontrollieren in welchen Geweben der Promotor aktiv bzw. inaktiv ist, kann eine sog. Excisions-Reporterlinie etabliert werden. So enthalten ACZL-E Kontrollmäuse das rekombinierte Reportergen (ACZL-E; Abb. A-4) in jeder Zelle, so dass man durch X-Gal Färbung nachweisen kann, in welchen Geweben die Rekombination überhaupt histologisch detektiert werden kann bzw. der Promotor aktiv ist

A.4. Kalziumregulation im glatten Muskel

Ein Forschungsschwerpunkt in unserem Labor ist die Untersuchung von Proteinen, welche die zytosolische Kalziumkonzentration im glatten Muskel modulieren. Der intrazelluläre Kalziumspiegel beeinflusst nicht nur die Kontraktion und Relaxation der glatten Muskelzellen und damit den Tonus von Gefäßen und gastrointestinalen Organen, sondern auch ihre Proliferation und Differenzierung. Man nimmt an, dass eine gestörte Kalziumregulation an der Entstehung von Magen-Darm-Erkrankungen sowie von Gefäßkrankheiten, z.B. Atherosklerose und Hypertonie, beteiligt ist. Die Haupteintrittspforte für Kalziumionen in die glatte Muskelzelle ist der L-Typ Kalziumkanal (α_{1C}) (Übersicht: Hofmann et al., 1999), dessen „chronische“ Inaktivierung embryonal letal ist (Seisenberger et al., 2000). Ein weiterer potentiell wichtiger Kalziumregulator im glatten Muskel ist die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI), die in diesen Zellen viele Wirkungen des Signalmoleküls Stickstoffmonoxid vermittelt, z.B. eine Erniedrigung der Kalziumkonzentration (Übersicht: Pfeifer et al., 1999; Hofmann et al., 2000). Mäuse mit einer konventionellen Deletion des cGKI Gens zeigen einen pleiotropen Phänotyp und leben nur 3 bis 6 Wochen (Pfeifer et al., 1998). Aus diesen Gründen kann man mit den bereits etablierten Nullmutanten des α_{1C} Gens als auch des cGKI Gens die spezifische Funktion dieser Gene im glatten Muskel adulter Mäuse nicht untersuchen.

A.5. Zielsetzung

Um die physiologischen Funktionen des α_{1C} und cGKI Gens in adulten Tieren durch konditionale somatische Mutagenese aufzuklären, wurden an unserem Institut bereits Mauslinien mit geflochten Exons des α_{1C} Gens (Specht, 2000) und des cGKI Gens (W. Wolfsgruber, S.K., R. Feil, F. Hofmann; unveröffentlichte Daten) erzeugt. Zur selektiven Deletion dieser und anderer Gene im glatten Muskel adulter Tiere wurde eine glattmuskelspezifische Cre Maus benötigt. Eine solche Mauslinie war jedoch nicht beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es, ein glattmuskelspezifisches und zeitlich regulierbares *Cre/lox* Rekombinationssystem zu etablieren. Dazu sollten transgene Mauslinien hergestellt werden, die eine Tamoxifen-aktivierbare Cre Rekombinase (A.2) selektiv im glatten Muskel exprimieren. Einerseits sollte die $CreER^T$ Rekombinase verwendet werden, da deren Funktionsfähigkeit in der Maus bereits bekannt war (Feil et al., 1996). Darüber hinaus sollte die „sensitive“ $CreER^{T2}$ Rekombinase, die bisher nur in kultivierten Zellen untersucht wurde (Feil et al., 1997), erstmals in transgenen Mäusen getestet werden. Zur Steuerung der Expression der Rekombinasen sollten verschiedene genetische Methoden (klassisches, zufällig integriertes Transgen bzw. gezielte Integration durch „Knock-in“) und Promotoren, die in glatten Muskelzellen aktiv sind (cGKI Promotor bzw. SM22 Promotor) verglichen werden. Die erzeugten Mauslinien sollten mit Reportermäusen verkreuzt und bezüglich ihrer Expressions- und Rekombinationseigenschaften eingehend charakterisiert werden. Idealerweise sollte die Rekombination

- durch kurzzeitige Verabreichung geringer Dosen von Tamoxifen induzierbar sein
- selektiv in glatten Muskelzellen stattfinden
- mit hoher Effizienz (100%) erfolgen
- nach ihrer Induktion durch Tamoxifen lange Zeit anhalten

B. Material und Methoden

B.1. Molekularbiologische Methoden

B.1.1. Konstruktion von Plasmiden

Nährmedien und Lösungen:

Luria-Bertani- (LB-) Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1 l

± 15 g Agar

autoklavieren

± 100 µg/ml Ampicillin

bei 4°C lagern

1000x Ampicillin

100 mg/ml, sterilfiltrieren und portioniert bei -20°C lagern

Endkonzentration: 100 µg/ml LB-Medium

Zugabe zu LB-Flüssigmedium kurz vor dem Animpfen

Zugabe zu LB-Agar nach dem Autoklavieren bei ca. 50°C

10x TBE

0,5 M Tris Base 108 g

0,5 M H₃BO₃ 55 g

0,01 M EDTA 37 g

bei RT lagern ad 1 l H₂O

Durchführung:

Zur Neukombination von DNS in bakteriellen Vektoren wurden gängige Methoden der enzymatischen Modifikation von DNS angewendet (Sambrook et al., 1989). Die Amplifikation von Plasmiden erfolgte i.d.R. in dem *Escherichia coli* Stamm XL1-blue (Stratagene) in Gegenwart von Ampicillin. Bakterienkulturen wurden bei 37°C aerob in flüssigem Luria-Bertani- (LB-) Medium oder auf LB-Agarplatten angezogen. Um Einzelkolonien zu erhalten und zur kurzfristigen Aufbewahrung bei 4°C, wurden Bakteriensuspensionen auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Zur längeren Aufbewahrung wurden 0,5 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur mit 0,5 ml autoklaviertem Glycerin gemischt und bei -20°C gelagert.

Plasmid-DNS wurde mit Restriktionsendonukleasen in Fragmente zerlegt, elektrophoretisch in Agarosegelen (0,8-2,5% Agarose in 1xTBE) aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (25 µg pro 100 ml Gel) sichtbar gemacht. Bei Bedarf wurden die gewünschten DNS-Fragmente aus dem Gel isoliert („Qiaquick Gel Extraction Kit“, Qiagen), in geeigneten Plasmiden mittels T4 DNS-Ligase neu kombiniert und durch Elektroporation in die Bakterien eingeschleust. Rekombinante Bakterienklone wurden nach Schnellisolierung der Plasmid-DNS durch alkalische Lyse (Birboim & Doly, 1979) mit

Hilfe einer Restriktionsanalyse identifiziert. Die Gewinnung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNS (mg Bereich) erfolgte ebenfalls durch alkalische Lyse, jedoch mit anschließender Säulenreinigung („Nucleobond AX“ Säulen, Macherey-Nagel). Die Integrität rekombinanter Plasmide wurde durch Sequenzieren (B.1.4) überprüft.

B.1.2. Synthese von Oligonukleotiden

Die Herstellung von einzelsträngigen DNS Oligonukleotiden erfolgte durch die Firma MWG-Biotech, Grafting. Die Oligonukleotide wurden als Primer für die PCR oder für die Sequenzierung verwendet. Die Basensequenzen und Bindungsstellen der eingesetzten Oligonukleotide sind im Anhang (F.1) angegeben.

B.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine enzymatische Methode zur *in vitro*-Amplifikation von definierten DNS-Segmenten aus einem Gemisch von Nukleinsäuren (Saiki et al., 1988; Sambrook et al., 1989). Sie ist ein zyklisch verlaufender Prozess und beruht auf der Kettenverlängerung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer durch eine hitzestabile DNS-Polymerase. Durch die mehrfache Wiederholung eines Reaktionszyklus (Denaturierung, Primeranlagerung, Polymerisation) wird eine Vervielfältigung des zwischen den zwei Primern liegenden DNS-Abschnittes erreicht.

Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode sind vielfältig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Konstruktion von Plasmiden sowie zur Amplifikation von genomischer DNS aus kultivierten Zellen und Mausegeweben verwendet. Um die Expression von Genen auf RNS Ebene zu untersuchen, wurde RNS mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) in cDNS umgeschrieben und durch PCR amplifiziert (RT-PCR).

Reagenzien:

Taq-DNS Polymerase (5 U/μl, Böhrringer)

für RT-PCR vor Gebrauch 1+9 in H₂O verdünnen

„Expand™ Long Template PCR System“

(3,5 U/μl, Böhrringer; Gemisch aus Taq und Pwo DNS Polymerase)

M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/μl, GibcoBRL)

vor Gebrauch 1+19 in H₂O verdünnen

10x PCR-Puffer (mit dNTPs)	500 mM	KCl
	100 mM	Tris, pH 8,0
	15 mM	MgCl ₂
	je 2 mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Durchführung der PCR:

- Ansatz: DNS (ca. 10 ng Plasmid oder 500 ng genomische DNS) 2,0 µl
 Primer A (25 pmol/µl) 0,2 µl
 Primer B (25 pmol/µl) 0,2 µl
 10x PCR-Puffer (mit dNTPs) 2,0 µl
 Taq-DNS Polymerase (5U/µl) 0,2 µl
 H₂O 15,4 µl
- Standardbedingungen für die Amplifikation (für DNS-Fragmente bis ca. 1 kb):

initiale Denaturierung	94°C, 5 min	}	35x
Denaturierung	94°C, 10 sec		
Primeranlagerung	55°C, 30 sec		
Polymerisation	72°C, 30 sec		
finale Polymerisation	72°C, 5 min		
- Standardbedingungen je nach Größe der zu amplifizierenden DNS-Fragmente und Primersequenzen optimieren; bei DNS-Fragmenten bis zu 2 kb kann Taq DNS Polymerase verwendet werden; für DNS-Fragmente über 2 kb sollte ein spezielles Gemisch aus Polymerasen („ExpandTM Long Template PCR System“) benutzt und das Protokoll und die Puffer nach Angaben des Herstellers angepasst werden
- amplifizierte DNS-Fragmente, die für die Konstruktion von Plasmiden eingesetzt werden, nach ihrer Klonierung sequenzieren (B.1.4), um mögliche Fehler der Polymerasen zu erkennen.

Durchführung der RT-PCR:

- Ansatz: RNS (0,1 µg/µl) 5,0 µl
 Primer A (25 pmol/µl) 0,5 µl
 Primer B (25 pmol/µl) 0,5 µl
 10x PCR-Puffer (mit dNTPs) 5,0 µl
 H₂O 34 µl
- Reverse Transkription:
 - Denaturierung 94°C, 5 min
 - langsam auf 50°C abkühlen (von 94°C auf 50°C in 10 min; 0,07°C/sec)
 - 5 µl MMLV-RT (10 U/µl) zugeben
 - 50°C, 20 min
 - 5 µl Taq-Polymerase (0,5 U/µl) zugeben
- Amplifikation (Bedingungen wie für die PCR, siehe oben)

B.1.4. Sequenzierung von DNS

Die Sequenzierung von DNS erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977). DNS-Fragmente wurden mittels „Terminator Cycle Sequencing“ enzymatisch synthetisiert und durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) terminiert. Die Sequenzanalyse erfolgte mit einem Sequenzierautomaten („ABI Prism™ Sequence-Analyser“, Perkin-Elmer Applied Biosystems). Dabei detektiert ein Laser die Abfolge der fluoreszenzmarkierten DNS-Fragmente, die durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Aus den Rohdaten wird von einem Computerprogramm (Multiscan 100ES, Sony) die DNS-Sequenz errechnet.

Durchführung des „Terminator Cycle Sequencing“:

- Ansatz: DNS (30-90 ng gereinigtes PCR-Produkt oder Plasmid) x µl
 „Terminator Ready Reaction Mix“^a 4 µl
 Primer (0,8 pmol/µl) 4 µl
 H₂O ad 20 µl
^aenthält „AmpliTaq“ DNS Polymerase, Puffer, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Perkin-Elmer Applied Biosystems)

- Synthese der DNS-Abbruchfragmente:

Denaturierung	95°C	2 min	}	25x
Denaturierung	95°C	30 sec		
Primeranlagerung	50°C	40 sec		
Polymerisation	60°C	4 min		

- Reinigung des Sequenzierproduktes mit „Centri Sep Spin Columns“ (Perkin-Elmer Applied Biosystems) nach Anweisung des Herstellers

- getrocknete DNS in 20 µl „Template Suppression Reagent“ (Perkin-Elmer Applied Biosystems) suspendieren; vor Analyse im Sequenzierautomaten 3 min bei 95°C denaturieren

B.1.5. Southern Blot Analyse

Als „Southern Blotting“ (Southern, 1975) bezeichnet man ein Verfahren, bei dem DNS-Fragmente durch Gelelektrophorese ihrer Größe nach getrennt und anschließend aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägermembran übertragen und immobilisiert werden. Das im Gel vorliegende Trennmuster der DNS-Fragmente bleibt erhalten, d.h. auf der Membran befindet sich eine Kopie des ursprünglichen Gels. Durch Hybridisierung der Membran mit einer ³²P-markierten DNS-Sonde können DNS-Fragmente lokalisiert werden, die eine zur Sonde komplementäre Region enthalten.

Lösungen:

Lösung 1	0,5 M Tris pH 8,0	250 ml (1 M)
	1,5 M NaCl	150 ml (5 M)
	5 mM EDTA	5 ml (0,5 M)
	bei RT lagern	ad 500 ml H ₂ O
Lösung 2	2x SSC	50 ml (20x)
	0,1% SDS	5 ml (10%)
	bei RT lagern	ad 500 ml H ₂ O
Hybridisierungslösung		
	40% Formamid	400 ml
	0,9 M NaCl	180 ml (5 M)
	50mM Phosphatpuffer	100 ml (0,5 M)
	2mM EDTA	4 ml (0,5 M)
	4x PAF	80 ml (50x)
	5% Dextransulfat	200 ml (25%)
	1% SDS	100 ml (10%)
	bei RT lagern	
50x PAF	1% BSA	4 g
	1% Ficoll (M.W. 400.000, ICN)	4 g
	1% Polyvinylpyrrolidone (M.W. 360.000, ICN)	4 g
		ad 400 ml H ₂ O
	Aliquots à 40 ml bei -20°C lagern	
0,5 M Phosphatpuffer		
	0,5 M Na ₂ HPO ₄ x12 H ₂ O (179,1 g/l H ₂ O)	375 ml
	0,5 M NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O (68,5 g/l H ₂ O)	625 ml
	bei RT lagern	
25% Dextransulfat (M.W. 500.000, ICN)		250g
	Aliquots á 50 ml bei -20°C lagern	ad 1 l H ₂ O
10x TE	0,1 M Tris, pH 8,0	50 ml (1 M)
	10 mM EDTA, pH 8,0	10 ml (0,5 M)
	autoklavieren; bei RT lagern	ad 500 ml H ₂ O
50x TAE	2 M TrisBase	242 g
	2 M HAc	57,1 ml (Eisessig)
	100 mM Na ₂ EDTAx2H ₂ O	37,2g
	bei RT lagern	ad 1 l H ₂ O
20x SSC	3 M NaCl	175 g
	0,3 M Na ₃ Citratx2H ₂ O	88g
	bei RT lagern	ad 1 l H ₂ O

Durchführung:

- DNS mit Restriktionsenzymen fragmentieren, durch Agarosegel-Elektrophorese (i.d.R. 0,8% Agarose in 1xTAE) auftrennen, mit Ethidiumbromid (1 mg/l H₂O, Sigma) färben und mit angelegtem Lineal fotografieren
- ca. 20 min in 0,1 N HCl (20 ml HCl_{konz.} ad 1 l H₂O) schwenken (Verfärbung des Farbmarkers Bromphenolblau nach gelb), kurz in H₂O waschen, ca. 20 min in 0,5 N NaOH (50 ml 10 N NaOH ad 1 l H₂O) schwenken (Verfärbung des Farbmarkers von gelb nach blau)
- über Nacht auf Trägermembran („Nytran-Plus“, Schleicher & Schuell) transferieren (Abb. B-1)

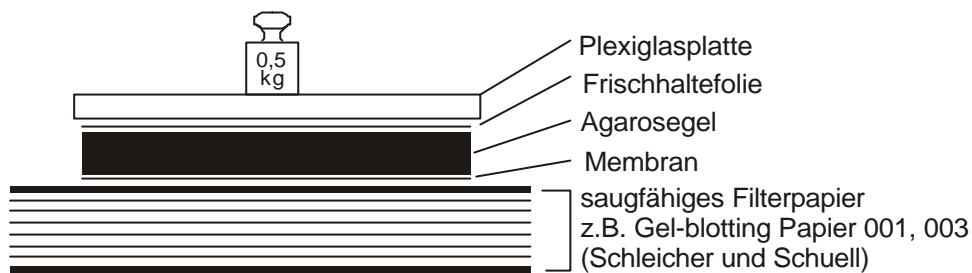


Abb. B-1. Aufbau des Southern Blots

- Prähybridisierung:
 - Blot abbauen, Geltaschen mit Bleistift markieren und Membran wie gewünscht zuschneiden
 - Membran kurz in H₂O, dann je 30 min in Lösung 1 und Lösung 2 schwenken (Lösungen 1 und 2 können mehrmals verwendet werden)
 - 50 ml Hybridisierungslösung (ausreichend für bis zu 4 Membranen im Format 6 x 20 cm) auf 37°C vorwärmen. 250 µl Lachsspermien-DNS (10 mg/ml, GibcoBRL) 5 min aufkochen und sofort zugeben
 - Membranen in Hybridisierungstaschen (GibcoBRL) mit Hybridisierungslösung einschweißen und 1-12h bei 42°C schwenken
- Herstellung ³²P-markierter DNS-Sonden durch „Random-Primed Labeling“:
 - DNS-Sonde (ca. 100-1000 bp) durch Restriktionsverdau aus Plasmid oder durch PCR gewinnen; über Agarosegel-Elektrophorese und Gelextraktion („Qiaquick Gel Extraction Kit“, Qiagen) reinigen
 - 200-400 ng DNS mit „NEBlot™ Kit“ (New England Biolabs) nach Vorschrift des Herstellers mit α³²P-dCTP (10 µCi/µl, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH) markieren
 - DNS durch Säulenchromatographie über eine „Nick™ Column“ (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH) nach Herstellerangaben von nicht eingebauten Nukleotiden abtrennen und mit 400 µl 1xTE eluieren
 - spezifische Aktivität der ³²P-markierten Sonde durch Szintillationszählung bestimmen (ca. 1x10⁵ cpm/µl)
- Hybridisierung:
 - ³²P-markierte DNS-Sonde 5 min aufkochen, sofort zu den prähybridisierten Membranen in die Hybridisierungstasche geben (ca. 8x10⁵ cpm/ml Hybridisierungslösung) und über Nacht bei 42°C schwenken

- Membranen aus der Tasche nehmen und mehrmals mit Lösung 2 waschen. Dabei die Temperatur solange steigern (auf 55-65°C) bis die Membranen nur noch wenig radioaktiv sind (Handmonitor unter 50 „Einheiten“)
- Membranen auf Filterpapier trocknen und in Plastikfolie einschlagen
- Die Detektion radioaktiver Signale kann durch „Phosphoimaging“ (Exposition 4-24 h bei RT) und/oder durch Autoradiographie („Hyperfilm“, Amersham Pharmacia Biotech; Exposition 1-14 d bei -80°C mit Verstärkerfolie) erfolgen.

B.1.6. Quantifizierung von Nukleinsäuren und Proteinen

B.1.6.1. Quantifizierung 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 1,0:

50 µg/ml doppelsträngiger DNS

40 µg/ml einzelsträngiger RNS

33 µg/ml einzelsträngigem Oligonukleotid.

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

B.1.6.2. Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Die in saurer Lösung vorliegenden Anionen des Farbstoffes Coomassie Blau (braune Leukoform) werden durch Bindung an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen wieder in den ursprünglichen blauen Farbstoff überführt. Durch Messung der Extinktion einer „gefärbten“ Proteinlösung bei 595 nm lässt sich über eine Eichkurve deren Protein-Konzentration bestimmen (Bradford, 1976).

Färbelösung:

200 mg Coomassie Blue G 250 (Serva) in 100 ml Ethanol lösen

ad 1,8 l mit H₂O auffüllen

200 ml 85% H₃PO₄ zugeben und über Nacht rühren

Lösung filtrieren bis OD_{595} konstant bleibt (ca. 0,35 gegen H₂O), lichtgeschützt bei RT lagern

Durchführung:

- Proteinprobe in H₂O auf eine Konzentration von ca. 0,05 µg/µl verdünnen
- 100 µl der Probe in Plastikkuvette (1 cm Schichtdicke) mit 1 ml Färbelösung mischen, 15 min im Dunkeln inkubieren
- OD_{595} gegen Referenz-Küvette (100 µl H₂O + 1 ml Färbelösung) messen; Protein-Konzentration über Eichgerade (1-10 µg BSA in 100 µl H₂O) berechnen

B.2. Erzeugung genetisch veränderter Mäuse

Seit etwa 10 Jahren ist es möglich durch sogenanntes „Gene Targeting“ definierte Mutationen in das Erbgut von Mäusen einzuführen (Capecchi, 1989). Diese Technik basiert im wesentlichen darauf, dass man pluripotente embryonale Stammzellen (ES Zellen) der Maus *ex vivo* kultivieren, gezielt genetisch verändern und schließlich wieder in die Keimbahn der Maus einführen kann. Die einzelnen Schritte zur Herstellung einer genetisch veränderten Mauslinie sind in Abb. B-2 dargestellt und werden ausführlich in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit besprochen. Der Zeitaufwand beträgt für die Konstruktion des „Targeting Vektors“ zwischen 6 und 12 Monaten, für die Durchführung der homologen Rekombination und Identifizierung modifizierter ES Zellen ca. 3 Monate und für die Generierung chimärer Mäuse und deren Testung auf Keimbahntransmission nochmals mindestens 4 Monate. Die Herstellung einer Mausmutante ist also eine aufwendige und langwierige Prozedur, die etwa 1-2 Jahre dauert. Weitere Ausführungen zur Theorie und Praxis des „Gene Targeting“ sind der Fachliteratur zu entnehmen (Wassermann & DePamphilis, 1993; Hogan et al., 1994; Schenkel, 1995; Torres & Kühn, 1997; etc).

B.2.1. Kultivierung embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES Zellen) sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen werden. Sie lassen sich kultivieren, genetisch manipulieren und wieder in Ammenmäuse reimplantieren. Allerdings können aus den ES Zellen nur dann Mauslinien etabliert werden, wenn sie in der Keimbahn der Mäuse weitergegeben werden. Um die „Keimbahngängigkeit“ der ES Zellen zu erhalten bzw. um eine Differenzierung der Zellen zu verhindern, muss ihre Kultivierung sehr gewissenhaft und unter optimalen Bedingungen erfolgen. Da die Differenzierung von ES Zellen in Anwesenheit des Maus „Leukämie-inhibierenden Faktors“ (LIF) unterdrückt wird, wurde dem Nährmedium LIF zugegeben. Darüber hinaus wurden die ES Zellen auf einem Zellrasen embryonaler Fibroblasten („Feederzellen“) kultiviert, die neben anderen Wachstumsfaktoren auch LIF bilden. Dadurch bleiben die ES Zellen pluripotent und proliferieren weiterhin ohne zu differenzieren. Eine hohe Zelldichte und Passagenzahl (>25) sollte vermieden werden, da dadurch die Keimbahngängigkeit beeinträchtigt werden kann.

In dieser Arbeit wurden R1 ES Zellen (Nagy et al., 1993) verwendet, die aus Blastozysten von agouti farbigen Mäusen gewonnen wurden (Passage 11 vom 22.01.95). Es wurden Gefrierkulturen der Passage 12-15 angelegt und für die Zellkultur eingesetzt.

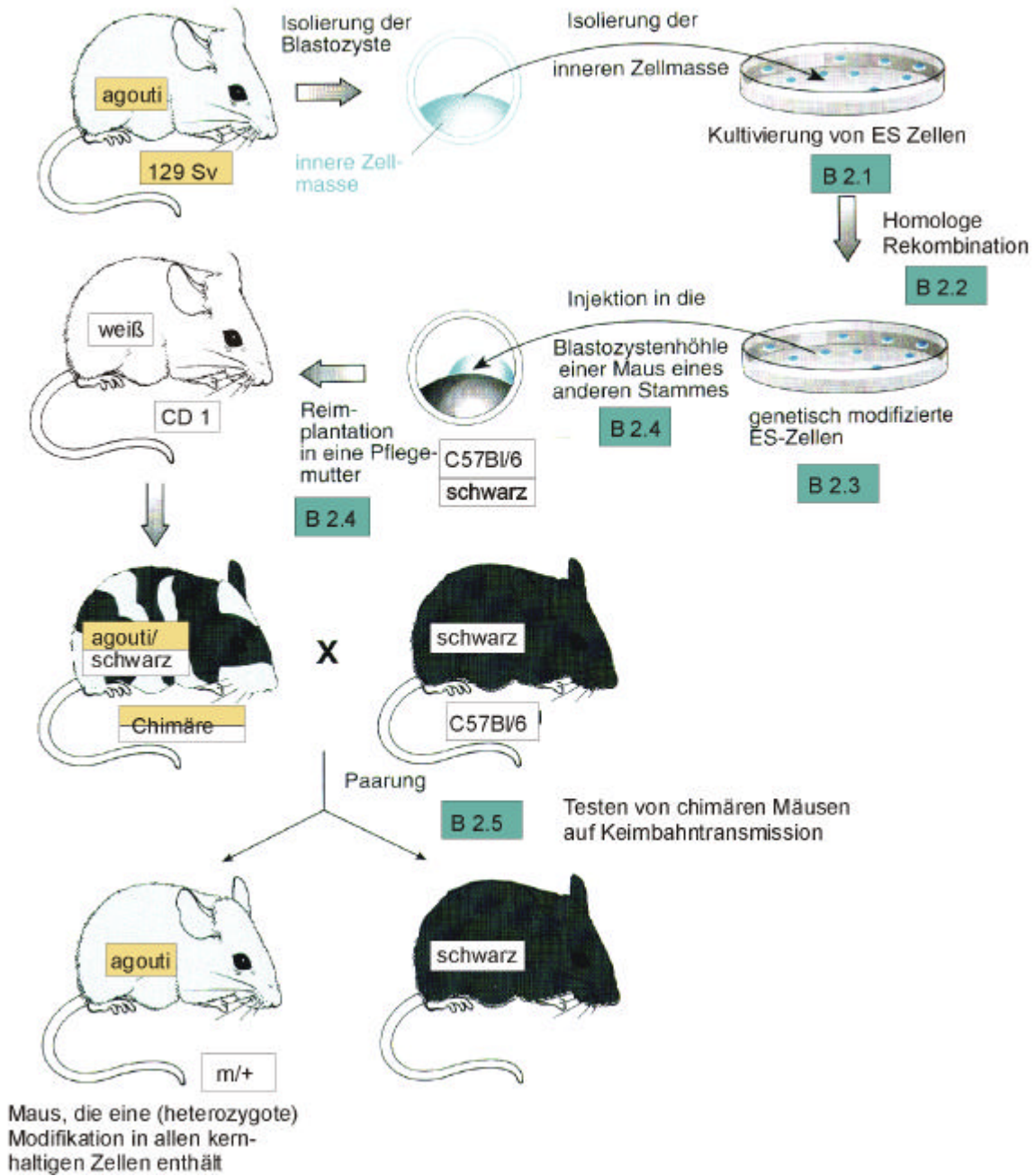


Abb. B-2. Herstellung genetisch veränderter Mäuse

(modifiziert nach Strachan & Read, 1996; Erklärung im Text)

B.2.1.1. Lösungen und Nährmedien

PBS	135 mM NaCl	4 g
	3 mM KCl	100 mg
	8 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	710 mg
	2 mM KH ₂ PO ₄	120 mg
		ad 500 ml H ₂ O
	pH 7,4 (mit NaOH einstellen)	
	autoklavieren	
	bei RT lagern	
Trypsin	9 Teile PBS + 1 Teil 10x Trypsin/EDTA (Gibco-BRL)	
	Lagerung bei 4°C (maximal 1 Monat)	
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (GibcoBRL, Bestell-Nr. 31966)	
	mit GlutamaxI TM (Dipeptid L-Alanyl-L-Glutamin), 4500 mg/l D-Glukose und Natriumpyruvat	
	Lagerung bei 4°C	
FBS	fötales bovines Serum (GibcoBRL, Bestell-Nr. 10270)	
	vor Gebrauch hitzeinaktivieren (30 min, 56°C)	
	Aliquots à 50 ml bei -20°C lagern	
	Eignung für die ES-Zellkultur testen und größere Charge reservieren	
	(in dieser Arbeit wurde die Charge 40F4674K benutzt)	
LIF	Maus Leukämie-inhibierender Faktor („ESGRO TM “, GibcoBRL, 1x10 ⁷ U/ml)	
	500x LIF	0,5x10 ⁶ U/ml EF Medium
		sterilfiltrieren, Aliquots à 1 ml sterilfiltriert bei 4°C lagern
2-Mercaptoethanol (β-ME)	(Sigma M-7522)	
	500x β-ME	50 mM (70 µl β-ME in 20 ml PBS)
		sterilfiltrieren, Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern
G418	Geneticin®/G418-Sulfat (GibcoBRL Bestell-Nr. 11811-064)	
	100x G418	40 mg/ml PBS
		Aliquots à 5 ml bei -20°C lagern
GANC	Cymeven®/Ganciclovir-Natrium (Roche)	
	10⁴x GANC	20 mM (50 mg/10 ml H ₂ O)
		Aliquots à 50 µl bei -20°C lagern

Tabelle B-1. Medien für die ES Zellkultur

Medium	Komponente	Volumen	Endkonzentration
EF-Medium^a (für Feederzellen) (bei 4°C max. 1 Monat lagern)	DMEM	450 ml	90%
	FBS	50 ml	10%
ES-Medium^a (für ES-Zellen) (bei 4°C max. 1 Monat lagern)	DMEM	400 ml	80%
	FBS	100 ml	20%
	500x LIF	1 ml	1000 U/ml
	500x β-ME	1 ml	0,1 mM
	zur Selektion zusetzen	100 x G418	5 ml
	10 ⁴ x GANC	50 µl	2 µM

^a keine Antibiotika/Antimykotika zusetzen

Tabelle B-2. Gefäße für die Zellkultur

Kulturgefäß	Fläche	Medium-Volumen	Trypsin-Volumen
Flasche	175cm ²	20 ml	5 ml
Flasche	75cm ²	15 ml	3 ml
Petrischale	55cm ²	10 ml	2 ml
Flasche	25cm ²	5 ml	2 ml
6 Loch Platte	6 x 9 cm ² =54 cm ²	3 ml/Loch	700 µl/Loch
12 Loch Platte	12 x 3,5 cm ² =42 cm ²	1,5 ml/Loch	500 µl/Loch
24 Loch Platte	24 x 2,3 cm ² =55 cm ²	1 ml/Loch	300 µl/Loch
48 Loch Platte	48 x 0,7 cm ² =34 cm ²	0,5 ml/Loch	200 µl/Loch
96 Loch Platte	96x 0,32 cm ² =29 cm ²	200 µl/Loch	30 µl/Loch

B.2.1.2. Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten („Feederzellen“) wurden aus Embryos am Tag 14,5 p.c. isoliert. Um die Selektion rekombinanter ES Zellen mit G418 zu überleben, müssen die Feederzellen ein Neomycinresistenzgen besitzen. Für die Erzeugung der Embryos wurden Mäuse, die homozygot ein Neomycinresistenzgen enthalten mit Wildtyp Mäusen verpaart. In dieser Arbeit wurden für die Verpaarung CNG3 (-/-) Mäuse verwendet (freundlicherweise von Herrn Prof. M. Biel, München zur Verfügung gestellt). Aus einem Embryo konnten Feederzellen für die Kultivierung in 2 Zellkulturflaschen (175 cm²) gewonnen werden. Die Zellen einer 90-100% konfluent bewachsenen Flasche wurden durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen teilungsunfähig gemacht und bis zur ihrer Verwendung eingefroren. Jede Präparation von Feederzellen wurde vor Gebrauch auf ihre Eignung für die Kultivierung von ES Zellen getestet. Je nach Qualität und Quantität (Passagenzahl) konnte der eingefrorene Inhalt einer Zellkulturflasche (175 cm²) auf 150-300 cm² ausgesät werden.

B.2.1.2.1. Isolierung der Feederzellen

- Verpaarung von 2-4 Männchen (mit Neomycinresistenzgen) mit je 2 Weibchen (C57BL/6 = 8 Wochen), Weibchen mit Vaginalpfropf („Plug“) am Tag 0,5 p.c. separieren
- 1-3 schwangere Weibchen am Tag 14,5 p.c. töten, in 80% Ethanol baden, Uterus entnehmen. Embryos in Petrischale mit PBS legen, den Kopf und blutführende Organe (rot) entfernen. Während der gesamten Prozedur steril arbeiten
- Torsos in kleine Stücke schneiden, in 50 ml Röhrchen mit Trypsin (1 ml pro Embryo) überführen und 10 min bei 37°C inkubieren
- Gewebe mit Pipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml) mechanisch zerkleinern, 5 min bei 37°C inkubieren und mit einer 2 ml Pipette gut homogenisieren

- EF-Medium zugeben (2 ml pro Embryo), suspendieren, 5 min absetzen lassen
- pro Embryo in 2 Zellkulturflaschen (175 cm²) 20 ml EF-Medium vorlegen, je 1,5 ml aus dem Überstand der Zellsuspension dazugeben
- bei 37°C und 6% CO₂ bis zu 90-100% Konfluenz wachsen lassen (4-6 Tage)

B.2.1.2.2. Ernten, Bestrahlen, Einfrieren und Passagieren

- Zellen mit 15 ml PBS waschen, mit 5 ml Trypsin ablösen (5-10 min bei 37°C), 6 ml EF-Medium zugeben und suspendieren
- von jeder Flasche 9 ml abnehmen (in 50 ml Röhrchen vereinen); die restlichen 2 ml Zellsuspension ad 20 ml mit EF-Medium auffüllen und wieder bis zur Konfluenz wachsen lassen
- die 50 ml Röhrchen mit der Zellsuspension zentrifugieren (5 min, 1000 rpm) und Zellen in EF-Medium suspendieren (4 ml pro geerntete Flasche)
- Zellen absinken lassen und mit 5000 Rad bestrahlen (Röntgenquelle im Max-Planck-Institut, Martinsried; 4.41 min Bestrahlungszeit)
- Zellen zentrifugieren (5 min, 1000 rpm) und in Einfriermedium aufnehmen (90% EF-Medium + 10% DMSO; frisch ansetzen; 3 ml pro geerntete Flasche)
- Aliquots à 1 ml in Kryoröhrchen abfüllen, bei -80°C (für kürzere Zeit) oder in flüssigem Stickstoff lagern
- diese Prozedur kann mehrmals wiederholt werden (aus einer Präparation von Embryos wurden bis zu 6 Passagen Feederzellen gewonnen)

B.2.1.2.3. Auftauen und Aussäen von Gefrierkulturen

- Kryoröhrchen in 37°C Wasserbad auftauen und Inhalt (1 ml) in 24 ml EF-Medium aufnehmen; zentrifugieren (5 min, 1000 rpm) und Zellen in EF-Medium suspendieren; der Inhalt eines Kryoröhrchens kann i.d.R. auf 50-100 cm² ausgesät werden

B.2.1.3. Allgemeines Vorgehen bei der Kultivierung von ES Zellen

B.2.1.3.1. Kultivierung

- die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 6% CO₂ in ES-Medium
- am Abend vor dem Aussäen der ES Zellen Feederzellen auftauen und in EF- oder ES-Medium aussäen (B.2.1.2.3)
- am nächsten Morgen ES Zellen in ES-Medium auf die Feederzellen aussäen
- jeden Tag Medium wechseln
- bei 60-80% Konfluenz Zellen passagieren: Zellen mit PBS waschen, mit Trypsin ablösen (5-10 min bei 37°C), 1-2 Volumen ES-Medium zugeben, suspendieren, zentrifugieren (5 min, 1000 rpm) und auf das 3-fache der „abgeernteten“ Fläche aussäen (1:3 „Splitting“)
- bei jedem Ablösen mit Trypsin steigt die Passagenzahl
- je nach Kulturgefäß bzw. Fläche werden verschiedene Volumina an Medium und Trypsin benötigt (Tabelle B-2)

B.2.1.3.2. Anlegen von Gefrierkulturen

- Zellen einer ca. 80% konfluenten Zellkulturflasche (75 cm²) mit 3 ml Trypsin ablösen (5-10 min bei 37°C), 3 ml ES-Medium zugeben, suspendieren, zentrifugieren (5 min, 1000 rpm)
- Zellen in 6 ml Einfriermedium (90% ES-Medium + 10% DMSO) aufnehmen, Aliquots à 1 ml in Kryoröhrchen abfüllen; bei -80°C einfrieren (ca. 24h) und dann in flüssigem Stickstoff lagern

B.2.1.3.3. Auftauen und Aussäen von Gefrierkulturen

- Kryoröhrchen in 37°C Wasserbad auftauen und Inhalt (1 ml) in 4 ml ES-Medium aufnehmen; zentrifugieren (5 min, 1000 rpm) und Zellen in ES-Medium suspendieren; der Inhalt eines Kryoröhrchens (entspricht 12,5 cm² der geernteten 75 cm² Flasche) kann i.d.R. auf 25 cm² ausgesät werden

B.2.2. Homologe Rekombination in ES Zellen

Das „Targeting“ von chromosomaler DNS über homologe Rekombination in ES Zellen ermöglicht die gezielte Einführung von Mutationen in das Genom von Mäusen. Das Prinzip des „Gene Targeting“ ist in Abb. B-3 dargestellt. Mit Hilfe kurzer Hochspannungsimpulse wird die Permeabilität der Zytoplasmamembran kurzzeitig erhöht (Elektroporation), so dass der „Targeting“ Vektor in das Innere der Zellen eingeschleust wird. Die DNS wird nun entweder durch zweifaches „crossing over“ homologer Regionen gezielt an einen vorbestimmten Genort eingebaut (homologe Rekombination, Abb. B-3A), zufällig in das Genom integriert (Abb. B-3B) oder aber überhaupt nicht eingebaut. Um diejenigen ES Zellen anzureichern, die die fremde DNS in ihr Genom integriert haben, enthält das „Targeting-Konstrukt“ Selektionsmarker, z.B. ein Neomycinresistenzgen (neo) und ein Herpes simplex Virus Thymidin Kinase Gen (tk). Nur Zellen, die das neo Gen enthalten, können in Anwesenheit von G418 wachsen (positive Selektion). Das tk Gen wird außerhalb der homologen Region des „Targeting“ Konstrukts platziert, so dass es nach homologer Rekombination nicht erhalten bleibt, während es bei zufälliger Integration der DNS meist ebenfalls in das Genom eingebaut wird (Abb. B-3). In Gegenwart von Ganciclovir wachsen nur Zellen, die das tk Gen nicht enthalten (negative Selektion), so dass ES Zellklone mit homologer Rekombination gegenüber Zellen mit zufälliger Integration des „Targeting“ Vektors angereichert werden. Die Frequenz der homologen Rekombination ist entscheidend von der Länge und Isogenität der zum Zielgen homologen Arme des „Targeting“ Konstrukts abhängig (langer Arm = 3 kb; kurzer Arm = 1 kb).

Für das „Targeting“ von ES Zellen muss ein Zeitraum ca. 4-5 Wochen veranschlagt werden. Die Frequenz, mit der man korrekt modifizierte ES Zellklone erhält, beträgt je nach Zielgen, DNS Konstrukt und Selektionsmethode ca. 0,1-10%, d.h. man sollte etwa 300 bis 1000 Klone isolieren (siehe unten) und analysieren (B.2.3).

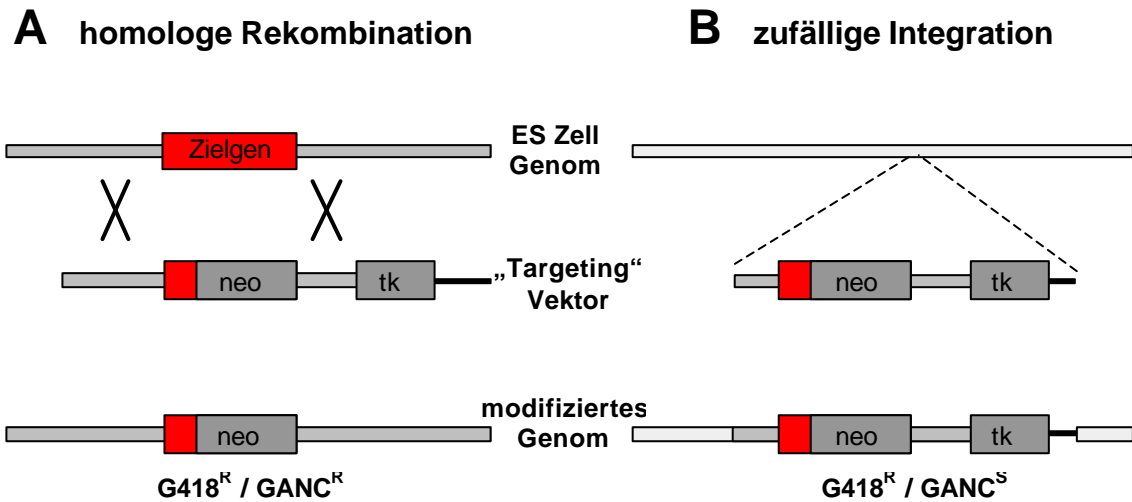


Abb. B-3. Prinzip des „Gene Targeting“

(A) Homologe Rekombination. Kreuze deuten das „crossing over“ homologer Regionen von Genom und „Targeting“ Konstrukt an. (B) Zufällige Integration. Unterbrochene Linien deuten die nicht homologe Rekombination an. Durch positiv/negativ Selektion werden ES Zellen mit homologer Rekombination angereichert. G418^R, resistent gegenüber G418; GANC^R, resistent gegenüber GANC; GANC^S, sensitiv gegenüber GANC. Weitere Erklärung im Text.

B.2.2.1. Vorbereitung der DNS

- 25-50 µg des „Targeting“ Vektors durch Restriktionsverdau linearisieren
- DNS mit Ethanol fällen, unter Sterilbank trocknen und in 100 µl PBS lösen (kann bei -20°C gelagert werden); mit Hilfe eines Agarosegels DNS-Konzentration abschätzen
- 2-5 pmol (entspricht ca. 20-50 µg eines 15 kb Konstrukts) linearisierte DNS für die Elektroporation (B.2.2.3) einsetzen

B.2.2.2. Vorbereitung der ES Zellen

- wie unter B.2.1.3 beschrieben ES Zellen auftauen, auf 25 cm² Flasche aussäen (Passagenzahl notieren), auf 75 cm² Flasche passagieren und bis 60-80% Konfluenz wachsen lassen (dauert 3-6 Tage); die Zellen einer 75 cm² Flasche sind für 1-2 Elektroporationen ausreichend
- Zellen 2x mit PBS waschen, mit 3 ml Trypsin ablösen (5-10 min bei 37°C), suspendieren, 7 ml ES-Medium zugeben, zentrifugieren (5 min, 1000 rpm) und Zellen in 10 ml PBS suspendieren
- Zellen in einer Neubauer Zählkammer zählen; Vitalität durch Ausschluß von Trypanblau bestimmen (sollte >95% sein)
- zentrifugieren (5 min, 1000 rpm) und Zellen in einer Dichte von 5x10⁶-1x10⁷/ml in PBS suspendieren

B.2.2.3. Elektroporation

- 1 ml Zellsuspension (B.2.2.2) mit DNS (20-50 µg, B.2.2.1) mischen und in Elektroporationsküvette (Peqlab, Elektrodenabstand 4 mm) transferieren
- Elektroporationsbedingungen („Gene Pulser™“ ohne „Pulse Controller“, BIO-RAD):
 - Spannung: 0,23 kV
 - Kapazität: 500 µFD
 - es sollte sich eine Zeitkonstante von ca. 5 ms ergeben
- Zellen 5 min bei RT stehen lassen, in 9 ml ES-Medium überführen, suspendieren und je 1 ml auf 10 Petrischalen (55 cm²) mit Feederzellen in ES-Medium verteilen

B.2.2.4. Selektion

- Zellen ca. 24 h nach Elektroporation (10-20% konfluent) in ES/G418-Medium kultivieren
- Zellen ca. 48 h nach Elektroporation (20-30% konfluent) bei Bedarf in ES/G418/GANC-Medium kultivieren; täglich Medium wechseln
- massives Absterben der nicht resistenten Zellen setzt i.d.R. 46 Tage nach der Elektroporation ein; G418/GANC resistente Zellklone sind leicht an ihren klaren Umrissen zu erkennen

B.2.2.5. Isolierung von ES Zellklonen

Je nach Zielgen und Konstrukt erhält man 300-1000 G418/GANC-resistente Klone. Das Vorgehen zur Isolierung von ES Zellklonen ist in Abb. B-4 gezeigt. Die Klone werden isoliert („gepickt“) und auf zwei 96 Loch Platten (A, B) dupliziert. Platte A wird bei 70-80% Konfluenz eingefroren, Platte B wird vervielfältigt (Platten B, C, D). Aus diesen Platten wird DNS isoliert und analysiert um Klone mit korrekt integriertem Konstrukt zu identifizieren (B.2.3). Die gewünschten ES Zellklone werden schließlich aus der eingefrorenen Platte A wieder in Kultur genommen und für die Injektion in Blastozysten verwendet (B.2.4).

- die ersten Klone können 79 Tage nach der Elektroporation gepickt werden; je nach Wachstum der Zellen kann man das Picken alle 1-2 Tage wiederholen (bis zu 3 Mal); Klone sind mit bloßem Auge auf dem Boden der Petrischalen zu erkennen; pro Tag können 100-300 Klone isoliert werden
- morgens Feederzellen in ES/G418-Medium in 96 Loch Platten aussäen (150 µl); 2 Platten pro 96 gepickte Klone vorbereiten (Platte A und B)
- zum Picken der Klone 96 Loch Platten mit PBS (30µl) vorbereiten
- Klone mit 20 µl Pipette (auf 2 µl eingestellt) vom Boden der Petrischalen ablösen^a und in je ein Loch der Platte mit PBS geben bis die Platte voll ist (Abb. B-4)
- 30 µl 2x Trypsin dazugeben, 10 min bei 37°C inkubieren, suspendieren, 60 µl ES/G418-Medium zugeben und nochmals suspendieren
- je 60 µl suspendierte Zellen auf die zwei Platten mit Feederzellen (Platte A und B) verteilen und wachsen lassen (Abb. B-4), am nächsten Tag Medium wechseln
- bei 60-80% Konfluenz (3-4 Tage nach dem Picken) Platte A einfrieren (B.2.2.6) und Platte B auf 3 weitere 96 Loch Platten (B, C, D) passagieren (B.2.2.7 und Abb. B-4)

^abeim Picken sollte folgendes beachtet werden:

- Stereomikroskop („Stemi SV6“, Zeiss) unter Sterilbank aufbauen; Klone können am besten im Dunkelfeld bei etwa 25-facher Vergrößerung gepickt werden
- auszuwählende Klone: mit bloßem Auge erkennbar, mit klar umrissenem, hellem Rand, nicht ausgefranst (differenziert), deutlich vereinzelt (keine Mischklone)
- mit Pipettenspitze Kreis um Klon ziehen; möglichst gesamte Zellen eines Klons mit der Pipette aufnehmen, sonst wächst der gleiche Klon erneut an
- für jeden Klon neue Pipettenspitze verwenden

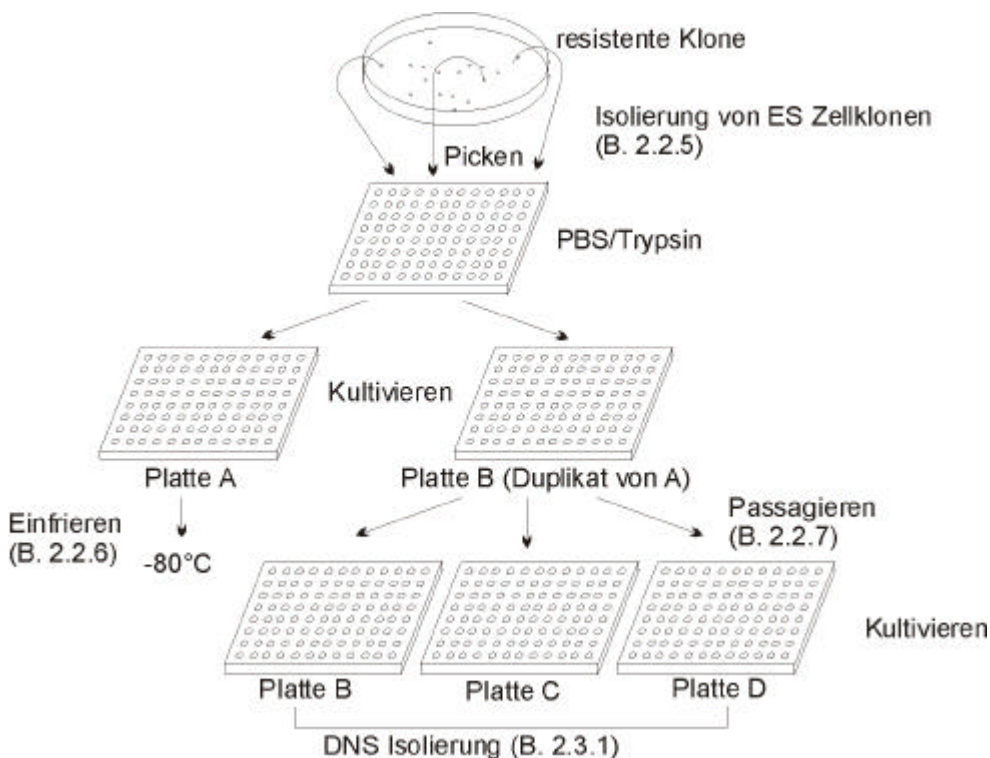


Abb. B-4. Vorgehen zur Isolierung von ES Zellklonen
(Erklärung im Text)

B.2.2.6. Einfrieren

- Medium von Platte A abkippen, Zellen mit PBS waschen (180 μl), mit 30 μl Trypsin ablösen (10 min bei 37°C), 180 μl Einfriermedium (90% ES-Medium + 10% DMSO, frisch ansetzen) zugeben und suspendieren
- Platte mit Autoklavierband verschließen, langsam einfrieren (1-3h bei -20°C) und bei -80°C lagern

B.2.2.7. Passagieren

- in zwei 96 Loch Platten (Platte C und D, ohne Feederzellen) je 150 µl ES-Medium vorgelegen
- Medium von Platte B abkippen, Zellen mit PBS waschen (180 µl), mit 30 µl Trypsin ablösen (10 min bei 37°C), 120 µl ES-Medium zugeben und suspendieren
- je 50 µl aus Platte B in Platte C und D geben; Platte B mit 150 µl ES-Medium auffüllen (Abb. B-4); bis zu 100% Konfluenz wachsen lassen (3-4 Tage)
- Medium von Platten B, C und D abkippen, Zellen 2x mit PBS waschen und trocknen; DNS sofort isolieren (B.2.3.1) oder Platten bei -20°C lagern

B.2.3. Identifizierung genetisch modifizierter ES Zellen

Die korrekte Integration des DNS Konstrukts wurde mit Hilfe von Southern Blot (B.2.3.2) oder PCR Analyse (B.2.3.3) überprüft. Der Zeitaufwand von der Isolierung der DNS (B.2.3.1) bis zur Identifizierung der korrekt modifizierten ES Zellklone beträgt je nach Anzahl der gepickten Klone 2-4 Wochen.

B.2.3.1. Isolierung von DNS aus 96 Loch Platten

Lösungen:

Lysepuffer für 96 Loch Platten	10 mM NaCl	1 ml (5 M)
	10 mM Tris, pH 7,4	5 ml (1 M)
	10 mM EDTA	10 ml (0,5 M)
	0,5% Sarcosyl	2,5 g
	bei RT lagern	ad 500 ml H ₂ O
+ 0,25 mg/ml Proteinase K (immer frisch zugeben)		
Proteinase K (Böhringer)	50 mg/ml 1xTE (B.1.5)	
	Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern	
EtOH/NaCl	pro Platte 10 ml 100% EtOH (eiskalt) + 150 µl 5M NaCl	

Durchführung:

- 96 Loch Platte (B.2.2.7) mit 50 µl Lysepuffer über Nacht bei 55°C inkubieren; Platte mit Parafilm und Frischhaltefolie verschließen (Verdunstungsgefahr)
- Platte nach dem Abkühlen auf RT öffnen und DNS durch Zugabe von 100 µl EtOH/NaCl 1h bei RT fällen (DNS haftet an der Plastikoberfläche); Platte vorsichtig aber zügig über eine Ecke abkippen
- 2-3x mit 70% Ethanol (100 µl) waschen, schräg mit der Öffnung nach unten aufstellen und ca. 1h bei RT trocknen
- für Southern Blot Analyse Restriktionsverdau durchführen (B.2.3.2) bzw. für PCR Analyse DNS in H₂O lösen (B.2.3.3)
- die getrocknete oder gelöste DNS kann bei -20°C gelagert werden

B.2.3.2. Southern Hybridisierung

- Restriktionsverdau direkt in den 96 Loch Platte (B.2.3.1) durchführen; dazu Enzymmix auf die getrocknete DNS geben und über Nacht inkubieren
- Restriktionsverdau in 96 Loch Platte

Enzymmix (pro Loch):	Puffer	5,0 µl
	100x BSA	0,5 µl
	Restriktionsenzym (10-50 U/µl)	1,0 µl
	H ₂ O	43,5 µl
- Southern Blot und Hybridisierung wie unter B.1.5 beschrieben durchführen

B.2.3.3. PCR Analyse

- DNS in 96 Loch Platte (B.2.3.1) in 40 µl H₂O lösen
- je ein Aliquot der DNS (5 µl pro Loch) aus 8 Löchern in Reagiergefäß (1,5 ml Sarstedt) vereinen (40 µl Gesamtvolumen)
- 5 µl des DNS-Gemisches (pools) für PCR Analyse einsetzen (B.1.3); bei positivem Ergebnis PCR mit DNS (2 µl) jedes einzelnen Klons, der im Pool enthalten war, wiederholen

B.2.4. Injektion von Blastozysten und Reimplantation

B.2.4.1. Material und Lösungen

- EF-Medium, ES-Medium (B.2.1.1)
- M2 Medium („Embryo tested“, Sigma M-7167)
- Mineralöl („Embryo tested“, Sigma M-8410)
- Transferpipette, angefertigt aus einer Glaskapillare (1,5 mm O.D. x 1,17 mm I.D., Clark Electromedical Instruments), die über dem Bunsenbrenner auf ca. 200 µm Innendurchmesser ausgezogen wurde, einem Schlauch mit Filter und einem Mundstück (Abb. B-5B)
- Präparierbesteck (2 Pinzetten, Schere, Nadelhalter; autoklaviert)
- Stereomikroskop („Stemi SV6“, Zeiss)
- Injektionsstand (Abb. B-5A)
- Injektionskammer (Abb. B-5C)
- Halte- und Injektionspipetten („Sterile VacuTips“, „Sterile TransferTips (ES)“, Eppendorf, Bestell-Nr. 5175 108.000 und 5175 107.039-00)
- Spritzen, Kanülen („Sterican“, 27x1⁴/₅, 22Gx1¹/₄, Braun)
- Nahtmaterial („Ethilon^R II 5/0“, FS-3 45 cm EH7823H, Ethicon)
- Plastischalen (35 mm, Nunc), Deckgläser (24x40 mm, Roth)
- Xylazin/Ketamin Narkotikum

1 ml	Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun®, Bayer)
2 ml	Ketaminhydrochlorid 50 mg/ml (Curamed)
7 ml	0,9% NaCl

bei RT für bis zu 4 Wochen lagern
für Maus (ca. 30 g) 0,2-0,25 ml i.p. einsetzen (entspricht 15 mg/kg Xylazinhydrochlorid, 40 mg/kg Ketaminhydrochlorid)

B.2.4.2. Verpaarung der Mäuse für die Generierung von Chimären

Die ES Zellen wurden in Blastozysten injiziert, die am Tag 3,5 p.c. aus C57BL/6 Spendertieren gewonnen wurden. Dafür wurden 4 Tage vor jedem Injektionstag am Abend je zwei C57BL/6 Weibchen (≥ 8 Wochen alt) zu ca. 30 C57BL/6 Männchen (≥ 8 Wochen alt) gesetzt. Am nächsten Morgen wurde das Vorhandensein eines Vaginalpfropfs („plug“) mittels einer Sonde überprüft und die „plug“ positiven Weibchen separiert (Tag 0,5 p.c.).

Als Ammenmütter („foster“) zum Austragen der injizierten Blastozysten eignen sich Mäuse mit guten Mutterinstinkten, wie z.B. der Auszuchtstamm CD-1 (Hogan et al., 1994). Eine Scheinschwangerschaft der CD-1 Weibchen (≥ 12 Wochen alt) wurde durch die Verpaarung mit vasktomierten FVB/N Männchen (≥ 10 Wochen alt, Iffa Credo, Lyon) erreicht. Die Verpaarung fand nach dem gleichen Schema wie bei den C57BL/6 Spendertieren statt (siehe oben), jedoch jeweils einen Tag später, so dass sich die „plug“ positiven CD-1 Weibchen am Injektionstag im Scheinschwangerschaftsstadium Tag 2,5 p.c. befanden.

Für einen Injektionstag benötigt man 6-8 „plug“ positive C57BL/6 Spenderweibchen (ergeben ca. 30-40 Blastozysten) und 3-4 „plug“ positive CD-1 Ammenmütter (10-15 Blastozysten pro Reimplantation)

B.2.4.3. Blastozystenpräparation

- am Morgen des Injektionstages Plastikschalen (35 mm) mit 2-3 ml EF-Medium füllen und ca. 30 min bei 10% CO₂ und 37°C equilibrieren (1 Schale für zwei Spenderweibchen)
- zusätzlich ES-Medium (2-3 ml) in 2 weiteren Schalen equilibrieren
- die Weibchen durch Genickbruch töten, die Bauchdecke nach Desinfektion mit 80% Ethanol öffnen, Uterus herauspräparieren und an den Enden der beiden Uterushörner durch Abschneiden der Ovarie öffnen
- je zwei Uteri in eine Schale mit EF-Medium geben und die Blastozysten mit Hilfe einer Spritze mit ca. 45° gebogener Kanüle (22G) von der Gabelung in Richtung der beiden Uterushörner mit EF-Medium herausspülen
- nachdem sich die Blastozysten in den Schalen abgesetzt haben, mit der Transferpipette (Abb. B-5B) unter dem Stereomikroskop (10-fache Vergrößerung) aufsammeln, in eine Schale mit ES-Medium überführen und bei 10% CO₂ und 37°C für 1-3h inkubieren
- die Ausbeute beträgt durchschnittlich 5 Blastozysten pro Spendertier

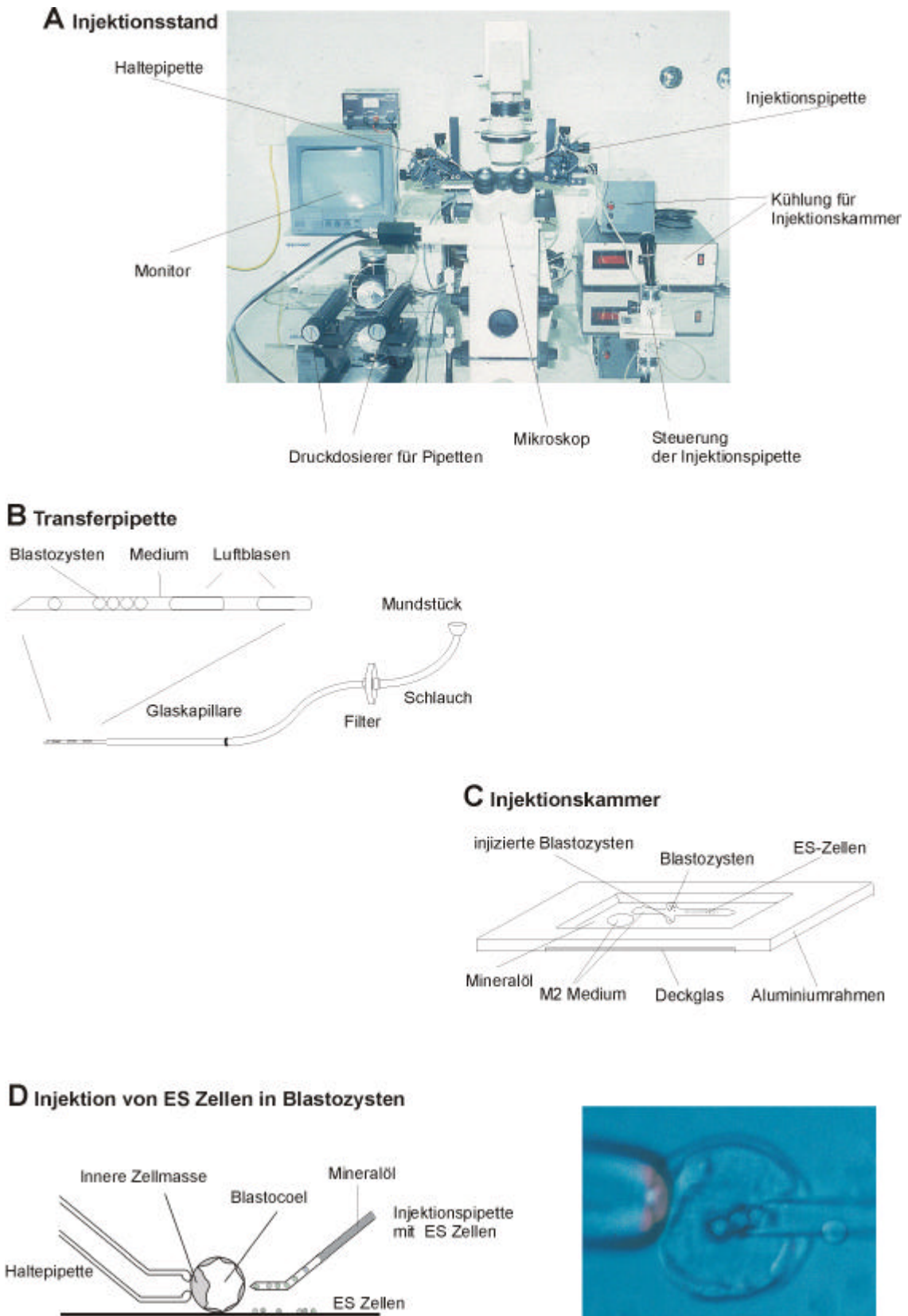


Abb. B-5. Injektion von ES Zellen in Blastozysten
(Erklärung im Text)

B.2.4.4. Vorbereitung der ES Zellen für die Injektion

- ES Zellen 7-9 Tage vor Injektion in Kultur nehmen (B.2.1.3)
- eingefrorene 96 Loch Platte mit ES Zellklonen (Abb. B-4, Platte A) in Plastikfolie verpacken und im Wasserbad bei 37°C auftauen; den Inhalt aus jedem Loch, das einen korrekten ES Zellklon enthält, direkt in ein Loch einer 24 Loch Platte aussäen und in ES-Medium auf Feederzellen wachsen lassen; nach 1-2 Tagen Medium wechseln
- bei 60-80% Konfluenz (nach 3-5 Tagen) die Zellen in 6 Loch Platte passagieren (B.2.1.3.1)
- bei 60-80% Konfluenz der 6 Loch Platte (nach ca. 3 Tagen) die Zellen in unterschiedlicher Dichte (1:3 und 1:10 „Splitting“) in 6 Loch Platten passagieren (B.2.1.3.1) um sicher zu gehen, dass zum Zeitpunkt der Injektion genügend Zellen zur Verfügung stehen
- von den restlichen Zellen Gefrierkulturen anlegen (pro Loch einer 60-80% konfluenten 6 Loch Platte 2-3 Kryoröhrchen, B.2.1.3.2)
- am Injektionstag die Zellen aus einem Loch einer 6 Loch Platte (ca. 60% konfluent, nicht differenziert) mit Trypsin ablösen und in 35 ml ES-Medium aufnehmen; 1,5 ml davon wird für die Injektion benötigt (B.2.4.5); Rest für DNS Präparation verwenden (B.3.2.1) um den Genotyp der ES Zellen nochmals überprüfen zu können.
- ES Zellen für die Injektion (1-1,5 ml) in ein Reagiergefäß überführen, zentrifugieren (2 min, 1000 rpm), Überstand bis auf ca. 50 µl abheben und die Zellen in den verbleibenden 50 µl gut suspendieren; die Zellen sollten am besten sofort injiziert werden; wenn nötig für maximal 1-2 h bei 4°C lagern

B.2.4.5. Injektion

- Injektionskammer vorbereiten: an die Rückseite eines Aluminiumrahmens (80 x 25 mm) ein Deckglas (24 x 40 mm) mit Vaseline so fixieren, dass eine Injektionskammer entsteht (Abb. B-5C); zwei Tropfen M2 Medium auf die Glasoberfläche auftragen und mit einer Spritze (Kanüle 22G) mit Mineralöl überschichten; den einen Tropfen zum Spülen der Injektionspipetten verwenden, in den zweiten, größeren Tropfen mit der Transferpipette sowohl die Blastozysten (ca. 30-40) als auch die ES Zellen (nicht zu dicht) geben (Abb. B-5C)
- die Halte- und Injektionspipetten mit Hilfe der Druckdosierer („Cell Tram Oil“, Eppendorf, Abb. B-5A) so mit Mineralöl füllen, dass keine Luft mehr enthalten ist
- die Injektionskammer auf dem gekühlten (10°C) Objektträgertisch des Mikroskops platzieren; die Schärfe auf die am Boden liegenden Zellen einstellen und die Halte- sowie die Injektionspipette korrekt ausrichten (Vergrößerung x50)
- mit der Haltepipette aus dem kleineren Tropfen Medium aufnehmen (ca. 1 cm) und anschließend beide Pipetten in dem großen Tropfen Medium versenken; in die Injektionspipette nur wenig Medium einsaugen, so dass die Medium/Öl Grenze noch im Mikroskop sichtbar ist
- mit der Injektionspipette die ES Zellen vom Boden aufsammeln, jeweils 10-15 Zellen in eine an der Haltepipette angesaugte Blastozyste injizieren^a (Vergrößerung 100x) (Abb. B-5D); die injizierten Blastozysten an geeigneter Stelle innerhalb des Tropfens ablegen
- Blastozysten nach Beendigung der Injektion mit der Transferpipette in eine mit ES-Medium befüllte Plastikschaale (B.2.4.3) überführen und bis zur Reimplantation inkubieren bei 10% CO₂ und 37°C (ca. 1-6 h)

^afür eine erfolgreiche Injektion ist folgendes zu beachten:

- in den Plastikschaalen können die Blastozysten am besten bei einer 10- bis 20-fachen Vergrößerung im Dunkelfeld (Stereomikroskop) gefunden werden. Das vorherige Einsaugen von 1-2 Luftblasen verlangsamt die Beweglichkeit der aufgenommenen Blastozysten in der Transferpipette und verhindert so den Verlust durch eine ruckartige ungewollte Bewegung (Abb. B-5B).
- in eine Injektionskammer sollten je nach Routine nur so viele Blastozysten (ca. 30-40) gefüllt werden, dass die Injektion nicht länger als 2 h dauert. Bei größerem Bedarf sollten die ES Zellen frisch aus einer 6 Loch Platte isoliert und die Injektionskammer neu befüllt werden.
- nur „gesund“ aussehende ES Zellen (nicht die größeren Feederzellen) sollten perlschnurartig aneinander gereiht, d.h. ohne viel dazwischenliegendes Medium aufgesammelt werden (Abb. B-5D). Es können je nach Pipette und Übung auch ES Zellen für mehrere Injektionen angesaugt werden. Sie sollten jedoch nicht mit dem Öl in Kontakt kommen, da sie sonst lysieren und die Pipette verklebt.
- beim Ansaugen an die Haltepipette sollte die Blastozyste solange gedreht werden bis sie in geeigneter Position für die Injektion liegt (Abb. B-5D). Dann sollte der Rand der Blastozyste mit den Einschnürungen zwischen den Trophoblasten scharf gestellt werden. Die Injektionspipette befindet sich erst in der richtigen Ebene, wenn sie genau so fokussiert ist wie der Rand der Blastozyste. Es kann dann ganz leicht an einer Einschnürung in die Blastozyste eingestochen werden. Jeder Blastozyste sollten 10-15 ES Zellen mit möglichst wenig Medium in die Höhle injiziert werden. Die Injektionspipette nicht zu tief in die Blastozyste eingeführen, da sie sonst leicht an der Haltepipette abbrechen oder die innere Zellmasse verletzen kann. Die Blastozyste kann beim Herausziehen der Pipette oder durch Kontakt der ES Zellen mit der inneren Zellmasse kollabieren, expandiert aber i.d.R. wieder nach 1-3 Stunden im Inkubator.

B.2.4.6. Reimplantation der Blastozysten in Ammenmütter

- ca. 30 g schweres, scheinchwangeres CD-1 Weibchen (Tag 2,5 p.c., B.2.4.2) durch i.p. Injektion (Kanüle 27x1⁴/₅) von 200-250 µl Xylazin/Ketamin Narkotikum (B.2.4.1) betäuben; bis die Narkose wirkt (1-3 min), mit der Transferpipette 8-12 Blastozysten aufsammeln (u.U. auch nicht injizierte Blastozysten beimischen)
- die Maus unter dem Stereomikroskop ablegen, eine Flanke mit 80% Ethanol desinfizieren und durch einen kleinen Schnitt zwischen Oberschenkel und letzter Rippe öffnen
- mit einer Pinzette Ovar und Uterus am Fett herausziehen und festhalten; mit einer Spritze (Kanüle 22G) ein Loch in den Uterus machen
- die Blastozysten mit der Transferpipette durch die Öffnung in den Uterus übertragen und den Uterus wieder in die ursprüngliche Lage bringen (Vergrößerung ca. x5)
- Muskelschicht und Haut vernähen, die Maus bis zum Erwachen (10-30 min nach Narkotisierung) unter eine wärmende Rotlichtlampe legen
- bei erfolgreicher Blastozysteninjektion und Reimplantation befinden sich Chimären unter den Nachkommen; Der Grad des Chimärismus (Verhältnis von agouti farbenem zu schwarzem Fell) kann bereits 7-14 Tage nach der Geburt abgeschätzt werden

B.2.5. Testen von chimären Mäusen auf Keimbahntransmission

Chimäre Mäuse besitzen einen Anteil von Zellen, der aus den Blastozysten der schwarzen C57BL/6 Spendertiere stammt und einen Anteil von Zellen, der aus den injizierten ES Zellen hervorgegangen ist (Abb. B-2, S.17). Da die ES Zellen von agouti farbigen 129/Sv Mäusen abstammen, kann deren Anteil leicht am Fell abgelesen werden (Abb. B-6A). Um eine genetisch veränderte Mauslinie zu etablieren, muss das mutierte Allel von der Chimäre weiter vererbt werden, d.h. die genetisch modifizierten ES Zellen müssen zur Bildung von Keimzellen der Chimäre beitragen bzw. „keimbahngängig“ sein. Männliche Chimären mit einem hohen Anteil an agouti farbigem Fell (60-90%) werden mit schwarzen C57BL/6 Weibchen verpaart. Da agouti dominant über schwarz vererbt wird, kann das modifizierte Gen nicht an die Nachkommen mit schwarzem Fell übertragen worden sein. Dagegen sind agouti farbige Nachkommen bezüglich des ES Zell Genoms heterozygot (129/Sv/C57BL/6), d.h. je ein Allel stammt aus dem 129/Sv bzw. C57BL/6 Genom (Abb. B-6B). Das Genom jeder agouti farbigen Maus muss daraufhin analysiert werden, ob bezüglich der eingeführten genetischen Veränderung das Wildtyp (+) oder das mutierte (m) Allel von der Chimäre weitergegeben wurde.

- Schwanzbiopsie von agouti farbigen Tieren entnehmen und DNS isolieren (B.3.2.1)
- mittels PCR (B.1.3) und/oder Southern Analyse (B.1.5) Tiere identifizieren, die auf einem Allel die genetische Mutation enthalten (+/m)
- die heterozygoten (+/m) Tiere untereinander verpaaren um zu homozygoten (m/m) Tieren zu gelangen

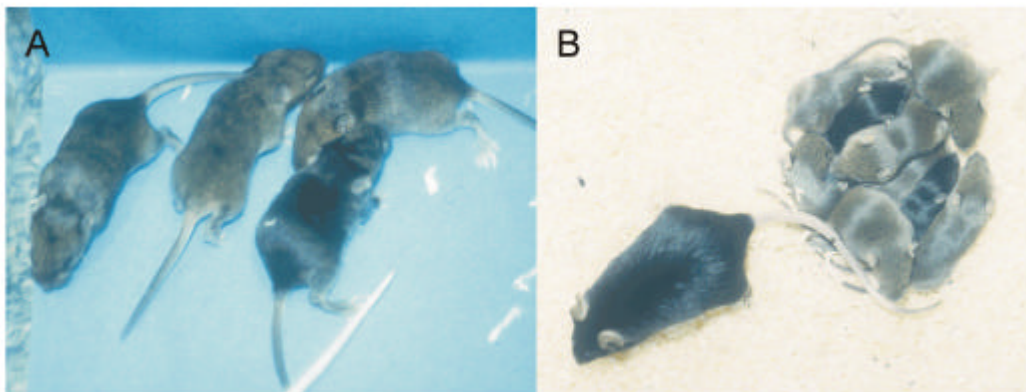


Abb. B-6. Chimäre Mäuse und Keimbahntransmission

(A) Chimären; der Anteil von agouti farbigem Fell spiegelt den Beitrag der injizierten ES Zellen wieder. (B) Wurf (oben rechts) einer C57BL/6 Mutter (unten links), die mit einer Chimäre verpaart wurde. Agouti farbige Nachkommen demonstrieren die erfolgreiche Keimbahntransmission des ES Zell Genoms. Weitere Erklärung im Text.

B.2.6. Haltung und Zucht der Mäuse

Die Mäuse wurden in einem dafür geeigneten Tierstall den Anforderungen nach in Makrolon Käfigen gehalten (bis zu 5 adulte Tiere in einem Typ II Käfig, bis zu 12 adulte Tiere oder 2 Weibchen mit ihren Würfen in einem Typ III Käfig). Als Einstreu wurden autoklavierte Späne (Altromin) verwendet, die bei Bedarf noch mit Nistmaterial („Nestlets“, Emsicon) ergänzt wurden. Die Fütterung („Zuchtdiät – Ratten und Mäuse“, Altromin 1314) und Wasserversorgung erfolgte *ad libidum*. Zur Zucht wurden i.d.R. jeweils zwei Weibchen im paarungsfähigen Alter (5-30 Wochen) zu einem Männchen (6 Wochen–1^{1/2} Jahre) gesetzt. Die Nachkommen wurden mit 10-14 Tagen durch PCR Analyse (B.1.3) von Schwanzbiopsien (B.3.2.1) genotypisiert und im Alter von 3-4 Wochen von der Mutter abgesetzt und Männchen und Weibchen getrennt.

Die Inzuchtstämme C57BL/6 (C57BL/6N CrI BR) und FVB/N (FVB/N CrI BR) sowie der Auszuchtstamm CD-1 [CrI:CD[®]-1(ICR) BR] wurden von der Firma Charles River, Sulzfeld bezogen. Die Vasektomie von FVB/N Männchen wurde von der Fa. Iffa Credo, Lyon durchgeführt. Die 129/Sv Inzuchtmäuse stammten aus dem Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried (Dr. A. Pfeifer, persönliche Mitteilung). Die verwendeten transgenen Mauslinien, deren Kennzeichen und Herkunft sind im Anhang (F.5) ausführlich beschrieben.

B.3. Analyse genetisch veränderter Mäuse

B.3.1. Präparation und Verabreichung von Liganden

100 mg Tamoxifen freie Base (Sigma T-5648) oder 4-Hydroxytamoxifen (OHT, Minimum 70% Z Isomer, Sigma H-6278) wurde in 0,5 ml 100% EtOH aufgenommen und dann 9,5 ml Erdnussöl ergänzt (im Ultraschallbad lösen). Die Stammlösungen (10 mg/ml) und Verdünnungen in Erdnussöl (1 mg/ml oder 0,1 mg/ml) wurden mehrere Wochen bei –20°C gelagert und vor Gebrauch bei 37°C aufgetaut. I.d.R. wurde 4-8 Wochen alten Mäusen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen je 100 µl der Stammlösung (1 mg), einer Verdünnungen (0,1, 0,01 mg) oder reines Erdnussöl (Vehikel zur Kontrolle) i.p. injiziert. I.d.R. wurden die Mäuse 3 Tage nach der letzten Injektion durch Genickbruch getötet und analysiert.

Die Behandlung kultivierter Zellen mit Liganden erfolgte i.d.R. für 2-4 Tage wie in Tabelle B-3 angegeben.

Tabelle B-3. Liganden für die Zellkultur

Ligand	Stammlösung ^a	Endkonzentration im Medium
Tamoxifen freie Base (Sigma T-5648)	1 mM	1 µM
4-Hydroxytamoxifen (OHT; Minimum 70% Z-Isomer, Sigma H-6278)	1 mM	1 µM
17-β-Östradiol (E2, Sigma E-2758)	1 mM	100 nM
all-trans Retinsäure (t-RA, Sigma R-2625)	6,4 mM	1 µM

^a in EtOH; Lagerung bei -20°C

B.3.2. Isolierung von DNS und RNS aus Mausgewebe

B.3.2.1. Isolierung von DNS

Lösungen:

Lysepuffer für Mausgewebe und ES Zellen

50 mM Tris, pH 7,4	25ml (1 M)
5 mM EDTA	5 ml (0,5 M)
1% SDS	50ml (10%)
0,2 M NaCl	20ml (5 M)
	ad 500 ml H ₂ O

bei RT lagern

+ 0,5 mg/ml Proteinase K
(immer frisch zugeben)

Proteinase K (Böhringer):

50 mg/ml TE (B.1.5)
Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

Durchführung:

- ca. 2 mm des Schwanzes von 10-14 Tage alten Mäusen (zur Genotypisierung) oder 50-100 mg Gewebe adulter Mäuse oder pelletierte ES Zellen über Nacht in Lysepuffer (0,5-0,7 ml) bei 55°C inkubieren
- mit einem Volumen Phenol:Chloroform (1:1) extrahieren und zentrifugieren (5 min, 13.000 rpm bei RT); die obere wässrige Phase abnehmen, mit 100% Ethanol (1 ml) 5 min bei RT fällen und 2x mit 70% Ethanol (1 ml) waschen; DNS bei 37°C lufttrocknen und in 50 µl (Schwanzbiopsien, kleinere Gewebeprobe / ES Zellen) bis 300 µl (größere Gewebeprobe) H₂O lösen; DNS bei -20°C lagern
- ca. 1:100 Verdünnung für die Quantifizierung einsetzen (B.1.6.1)
- je nach Gewebe können 0,5-10 µg DNS pro mg eingesetzten Gewebes gewonnen werden

B.3.2.2. Isolierung von RNS

- alle benötigten Lösungen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ (0,05% Diethylpyrocarbonat in H_2O ; gut schütteln, 1 h bei RT inkubieren und autoklavieren) herstellen
- Gewebe (50-100 mg) in 1 ml „peqGold RNAPureTM“ (Peqlab) mit einem UltraTurrax (IKA Werk) homogenisieren, 0,2 ml Chloroform zugeben, schütteln, zentrifugieren (5 min, 13.000 rpm, RT), obere wässrige Phase mit 0,5 ml Isopropanol 5 min bei RT fällen, zentrifugieren (5 min, 13.000 rpm, 4°C)
- 2x mit 1 ml 75% Ethanol waschen, die RNS kurz lufttrocknen und in 50-300 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ lösen; RNS bei -80°C lagern
- ca. 1:100 Verdünnung für die Quantifizierung einsetzen (B.1.6.1)
- je nach Gewebe können 0,5-10 μg RNS pro mg eingesetzten Gewebes gewonnen werden.

B.3.3. Isolierung von Proteinen aus Mausgewebe

Lösungen:

Extraktionspuffer	20 mM Tris, pH 8,0	1,21 g
	100 mM NaCl	2,92 g
		ad 500 ml H_2O
	bei RT lagern	
	+ Protease-Inhibitoren	
	wie in Tabelle B-4 angegeben immer frisch zugeben)	

Tabelle B-4. Protease-Inhibitoren

Inhibitor	Stammlösung	Menge aus Stammlösung je ml Extraktionspuffer	Endkonzentration im Extraktionspuffer
DTT	100 mM ^d	25 μl	2,5 mM
EDTA	500 mM ^b	5 μl	2,5 mM
Benzamidin	200 mM ^c	12,5 μl	2,5 mM
PMSF	100 mM ^{a, d}	25 μl	2,5 mM
Leupeptin	1 mg/ml ^{a, d}	1 μl	1 $\mu\text{g/ml}$

^a in EtOH; ^b Lagerung bei RT; ^c Lagerung bei 4°C, ^d Lagerung bei -20°C

Durchführung:

- Gewebe (ca. 100 mg) auf Eis mit UltraTurrax (IKA Werk) in 0,5-1,0 ml Extraktionspuffer/Protease-Cocktail homogenisieren
- zentrifugieren (5 min, 13000 rpm, 4°C) und Überstand (= Proteinextrakt) abheben; Proteinextrakt bei -80°C lagern
- ca. 1:50 Verdünnung für die Quantifizierung einsetzen (B.1.6.2)
- je nach Gewebe können 10-100 μg Protein pro mg eingesetzten Gewebes gewonnen werden.

B.3.4. Kultivierung glatter Muskelzellen aus Mausaorta

Vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs) wurden durch enzymatischen Verdau aus Aorten isoliert (modifiziertes Protokoll nach Kleppisch & Nelson, 1995) und kultiviert. Die Identität der Zellen wurde immunocytochemisch mit einem Antikörper gegen glattmuskuläres α -Aktin überprüft (F.3), wobei mehr als 90% der kultivierten Zellen angefärbt wurden. Experimente wurden entweder direkt mit der Primärkultur oder der 1. Passage durchgeführt.

Lösungen und Nährmedien:

PBS (B.2.1.1)

Trypsin (B.2.1.1)

Pen/Strep

Penicillin/Streptomycin (GibcoBRL, 10.000 U/ml)

Aliquots à 5 ml bei -20°C lagern

VSMC-Medium

DMEM (B.2.1.1)

10% FBS (B.2.1.1)

100 U/ml Pen/Strep

bei 4°C für max. 4 Wochen lagern

Ca²⁺-freies Medium

10 mM HEPES 2,38 g

60 mM NaCl 3,5 g

85 mM Na-Glutamat 14,37 g

5,6 mM KCl 0,417 g

2,0 mM MgCl₂ 0,406 g

ad 1 l H₂O

pH 7,4 mit NaOH einstellen

bei 4°C lagern

Enzymlösung 1

1,0 mg/ml BSA (Roth, Art.8076.2)

1,0 mg/ml DTT (Roth, Art. 6908.2)

0,7 mg/ml Papain (Sigma P-4762)

frisch in Ca²⁺-freiem Medium herstellen und sterilfiltrieren
(2 ml für 3-6 Aorten)

Enzymlösung 2

1 mg/ml BSA (Roth, Art.8076.2)

1 mg/ml Hyaluronidase (Sigma H-3506)

1 mg/ml Collagenase (Sigma C-7926)

frisch in Ca²⁺-freiem Medium herstellen und sterilfiltrieren
(2 ml für 3-6 Aorten)

Isolierung der VSMCs:

- während der gesamten Prozedur möglichst steril arbeiten
- Aorten (3-6 Stück) in Petrischale mit PBS überführen, Fettgewebe entfernen, in Ca^{2+} -freiem Medium mit einer Schere zerkleinern und für ca. 10 min bei RT inkubieren
- mit einer Pinzette die Aortenstücke in Enzymlösung 1 (2 ml) überführen, bei 37°C inkubieren bis leichte Zersetzung des Gewebes einsetzt (ca. 30 min)
- Aorten zentrifugieren (5 min, 1000 rpm), Überstand vorsichtig abheben und Gewebe in Enzymlösung 2 (2 ml) suspendieren; bei 37°C inkubieren, zwischendurch suspendieren, bis einzelne Zellen vorhanden sind (nach ca. 25 min; nicht zu lange verdauen, da sonst die Zellen zerstört werden)
- VSMC-Medium (6 ml) zugeben, zentrifugieren (5 min, 1000 rpm), Überstand vorsichtig abheben und Zellen in VSMC-Medium (2,5 ml) suspendieren
- Zellen in einer Neubauer-Zählkammer zählen und Vitalität durch Trypanblau-Ausschluss bestimmen; pro Aorta werden $2\text{-}3 \times 10^5$ Zellen mit einer Vitalität von $>90\%$ gewonnen

Kultivierung der VSMCs:

- ca. 1×10^4 Zellen/ cm^2 aussäen und bei 37°C und 6% CO_2 in VSMC-Medium inkubieren (Primärkultur)
- die Zellen können bei Bedarf einmal passagiert werden: Zellen bei ca. 90% Konfluenz (nach 6-8 Tagen) mit Trypsin ablösen und im Verhältnis 1:3 passagieren (1. Passage)

B.3.5. Histochemische Methoden und Immunfärbung

B.3.5.1. Fixierung von Zellen und Mausgeweben

- Zellen (10 min bei 4°C), Mausgewebe (1 h bei RT) in 2% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd (in PBS; B.2.1.1) fixieren
- fixierte Zellen bzw. Mausgewebe 2x mit PBS waschen; in PBS bei 4°C lagern

B.3.5.2. X-Gal-Färbung

Zellen und Gewebe, die β -Galaktosidase exprimieren, können durch Anfärbung mit dem chromogenen β -Galaktosidase Substrat X-Gal detektiert werden. Nach Hydrolyse und Luftoxidation entsteht aus X-Gal ein blauer, schwer löslicher Indigofarbstoff, der nicht aus den Zellen herausdiffundiert (Ibelgauf, 1990).

Lösungen:

PBS (B.2.1.1)

X-Gal Stammlösung (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl β -D-Galactosid, Roth):

40 mg/ml DMSO

Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

X-Gal Färbelösung (in PBS)	2,0 mM	MgCl ₂	1 ml (1 M)
	2,5 mM	K ₃ Fe(CN) ₆	0,83 g
	2,5 mM	K ₄ Fe(CN) ₆	1,07 g
			ad 500 ml PBS, pH 7,4
			bei RT lagern
			+ 1 mg/ml X-Gal (immer frisch zugeben)

Durchführung:

- fixierte Zellen (B.3.5.1) bei 37°C bzw. fixiertes Mausgewebe (B.3.5.1) bei RT über Nacht in XGal Färbelösung schwenken
- mit PBS waschen und in PBS bei 4°C lagern

B.3.5.3. Anfertigung von Paraffin Gewebeschnitten

- fixiertes (B.3.5.1) und u.U. X-Gal gefärbtes (B.3.5.2) Mausgewebe dehydratisieren
aufsteigende Ethanolreihe

70% EtOH	30-60 min (Lagerung möglich)
80% EtOH	30-60 min
90% EtOH	30-60 min
96% EtOH I	30-60 min
96% EtOH II	30-60 min
100% EtOH I	30-60 min
100% EtOH II	30-60 min
100% EtOH/Toluol (1:1)	1x15 min
100% Toluol (Roth)	3x10 min (Vorsicht: X-Gal-Färbung wird durch Toluol ausgewaschen)
- dehydratisierte Gewebe in flüssigem Paraffin (60°C, „Paraplast“, Sigma) einlegen

Paraplast I	ca. 30 min
Paraplast II	ca. 30 min
Paraplast III	ca. 60 min

 in Paraplast III einbetten und erkalten lassen
- Schnitte (8-12 µm) mit einem Microtom (Microm HM 335 E) anfertigen, auf Objektträger platzieren und 2-12 h bei 37°C trocknen
- Schnitte auf Objektträgern entparaffinisieren und rehydratisieren

Entparaffinisieren:	100% Toluol	2x 1 min
Rehydratisieren:	100% EtOH	ca. 2 min
	96% EtOH	ca. 2 min
	90% EtOH	ca. 2 min
	70% EtOH	ca. 2 min
	2x mit H ₂ O waschen und lufttrocknen	

B.3.5.4. Histologische Färbungen

- Kernfärbung mit SafraninO: Entparaffinisierte und rehydratisierte Schnitte auf Objektträgern 10-30 sec mit 0,01% SafraninO (Sigma) in 40% Ethanol färben, lufttrocknen
- Kernfärbung mit Hoechst Nr.33258 (Sigma): 1 µg/ml in 80% Glycerol auf die entparaffinisierten und rehydratisierten Schnitte geben, Deckglas auflegen (Stammlösung 1 mg/ml H₂O)

B.3.5.5. Immunfärbung

Die Anwesenheit bestimmter Proteine in Zell- und Gewebeextrakten wurde durch Western Blot Analyse nachgewiesen (Sambrook et al., 1989). Dazu wurden die Proteinproben durch SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Die Bindung spezifischer Antikörper an die Membran wurde durch Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper und anschließende Enzymsubstrat-vermittelte Farbreaktion (alkalische Phosphatase-Technik) detektiert. Die Bindung spezifischer Antikörper an fixierte Zellen (B.3.5.1) wurde durch fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper nachgewiesen. Eine Aufstellung der verwendeten Antikörper ist im Anhang zu finden (F.3).

B.3.6. Bestimmung der Rekombinationseffizienz

Um den Anteil an „rekombinierten“ Zellen in einem Gewebe zu bestimmen, wurden X-Gal gefärbte Paraffingewebeschnitte mit Hoechst Nr.33258 gefärbt (B.3.5). Ein Beobachter, dem die Genotypen der Tiere nicht bekannt waren, zählte bei 400-facher Vergrößerung sowohl die X-Gal gefärbten Zellen (Hellfeldmikroskopie) als auch die Hoechst Nr.33258 gefärbten Zellkerne (Fluoreszenzmikroskopie) aus. Der Anteil an X-Gal gefärbten Zellen einer ausgewählten Population wurde für jedes Gesichtsfeld bestimmt [(X-Gal gefärbte Zellen/Zellkerne) x 100]. Gewebeschnitte wurden von verschiedenen Regionen der Organe angefertigt und mindestens 6 Gesichtsfelder ausgezählt. Um den Anteil an Zellen zu ermitteln, der in doppelt heterozygoten SM-KI/ACZL Mäusen das rekombinierte Reportertransgen enthielt, wurde die Fraktion X-Gal gefärbter Zellen auf die Fraktion X-Gal gefärbter Zellen vergleichbarer Schnitte von heterozygoten ACZL-E Mäusen normalisiert, die gleich 100% gesetzt wurde (C.2.3, S.58, S.60).

B.3.7. Dokumentation

Die Organpräparate wurden mit einem Stereomikroskop („Stemi SV6“, Zeiss; Vergrößerung x8-x50) fotografiert (Kamera: Contax 167 MT, automatische Belichtung; Film: Kodak EPY 64 T).

Zell- und Schnittpräparate wurden mit einem „Axioskop“ (Zeiss) im Hellfeld (X-Gal Färbung und Safraninfärbung) oder bei Fluoreszenzbeleuchtung (Hoechst Färbung und Immunfluoreszenz, Tabelle B-5) bei einer Vergrößerung von 100-400x ausgewertet und fotografiert (Kamera: Contax 167 MT). Bei Hellfeldmikroskopie wurde mit einem Kodakfilm (EPY 64 T) fotografiert und die Belichtung auf Automatik eingestellt. Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurde ein empfindlicher Film (Kodak Select Elite Chrome 400) verwendet und manuell 20-60 sec belichtet.

Tabelle B-5. Filtersätze für die Fluoreszenzmikroskopie

Filtersatz # (Zeiss)	Anregungsfilter [nm]	Strahlenteiler [nm]	Sperrfilter [nm]	Fluorochrom
02	G 365	395	LP 420	Hoechst #33258
09	BP 450-490	510	LP 520	FITC
15	BP 540/12	580	LP 590	Cy3

C. Ergebnisse

C.1. Expression von CreER^T unter der Kontrolle des cGKI Promotors

C.1.1. Herstellung von GK-KI Mäusen

Eine erfolgreiche Expression der CreER^T Rekombinase (A.2; Abb. A-3, S.5) unter der Kontrolle des CMV Promotors und eine zeitliche Regulierbarkeit der Rekombination durch den Liganden Tamoxifen in transgenen Mäusen konnte erstmals von Feil und Kollegen gezeigt werden (Feil et al., 1996). Durch die Expression von CreER^T unter der Kontrolle des endogenen Promotors des Gens der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I (cGKI) könnten zeitlich reguliert, spezifisch in allen cGKI exprimierenden Zellen (z.B. in glatten Muskelzellen; Keilbach et al., 1992) gefloخته Gene (z.B. cGKI, Kalziumkanal; A.4) inaktiviert werden.

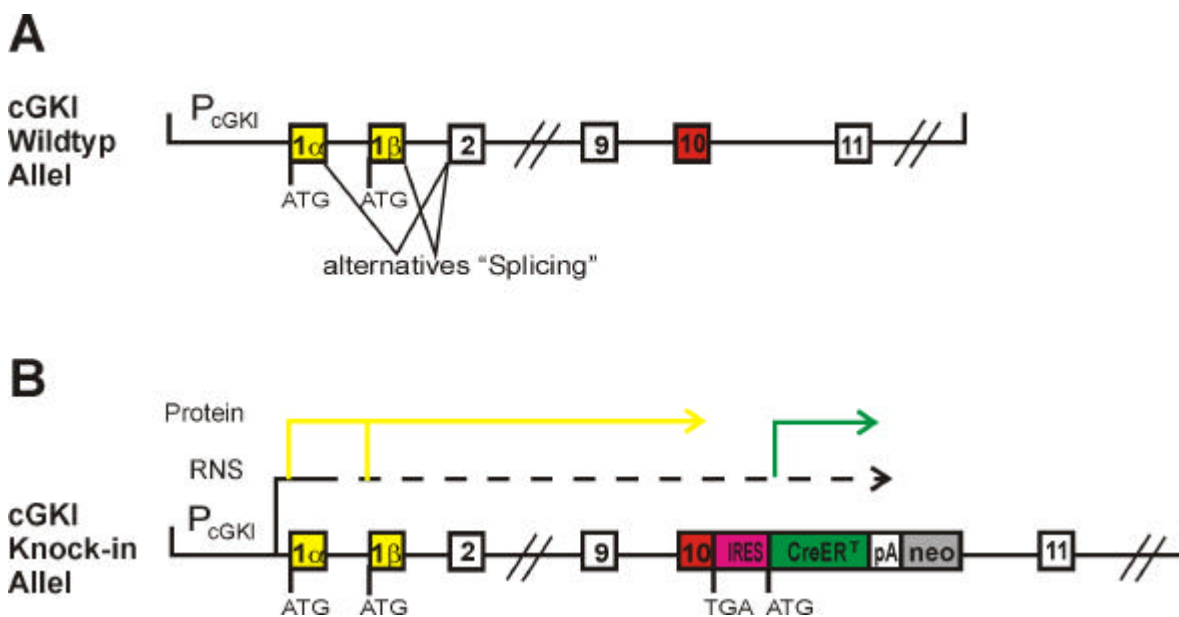


Abb. C-1. Strategie zur Erzeugung der cGKI Knock-in Mauslinie GK-KI
(Erklärung im Text)

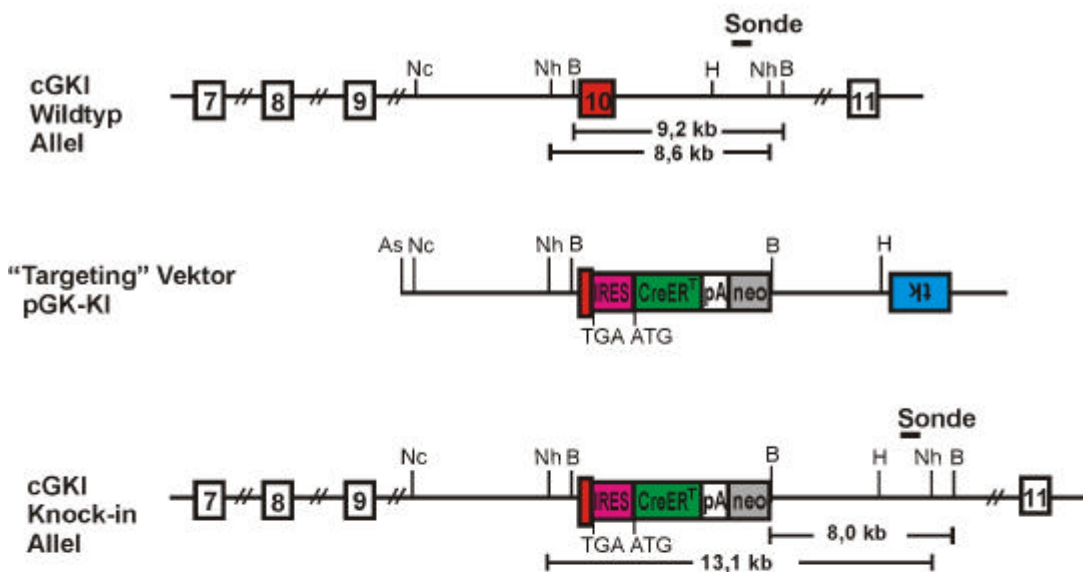
Bei der Transkription des cGKI Gens entstehen zwei „Spliceprodukte“ (Wernet et al., 1989), die entweder Exon 1 α oder Exon 1 β mit dem jeweiligen Translationsstartcodon enthalten (Abb. C-1A). Aufgrund der Anwesenheit zweier alternativer cGKI Transkripte

mit Startcodons war die direkte Fusion der CreER^T Sequenz an ein Startcodon ungünstig. Um die Rekombinase dennoch unter der Kontrolle des endogenen cGKI Promotors zu exprimieren, sollten die Sequenzen, welche für eine „Internal Ribosomal Entry Site“ (IRES), für die CreER^T Rekombinase (Feil et al., 1996), ein „simian virus 40“ (SV40) Polyadenylierungssignal und für ein Phosphoglycerat Kinase (PGK) Promotor gesteuertes Neomycinresistenzgen (neo) codieren, in Exon 10 des cGKI Gens eingebaut werden (Abb. C-1B). Die IRES ermöglicht eine „cap“-unabhängige Initiation der Translation an internen Startcodons polycistronischer Transkripte in eukaryotischen Zellen (Mountford et al., 1994; Übersicht: Mountford & Smith, 1995). Die IRES-CreER^T Konfiguration sollte es also erlauben, dass von der mRNA, die unter Kontrolle des endogenen cGKI Promotor transkribiert wurde, das CreER^T Protein korrekt translatiert werden kann (Abb. C-1B). Die Funktionalität der verwendeten IRES-CreER^T Genkassette wurde durch Transfektion in kultivierte Säugerzellen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

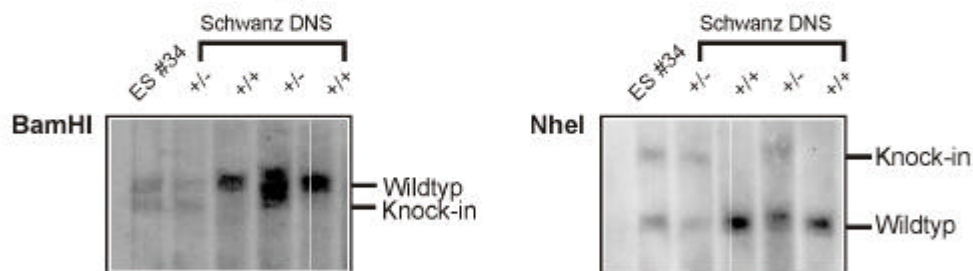
Zur homologen Rekombination in ES Zellen wurde der Targeting Vektor pGK-KI konstruiert (B.1.1) (Abb. C-2A). Der 5' homologe (6,8 kb) und 3' homologe (4,5 kb) Arm wurde aus einer genomischen Genbank aus Mausgewebe (Pfeifer et al., 1998) subkloniert. Die IRES-CreER^T-neo Kassette wurde so in Exon 10 des cGKI Gens integriert, dass einerseits die native „Splice“-Akzeptorstelle erhalten blieb und andererseits die Translation eines potentiellen cGKI Proteins vorzeitig terminiert wurde (Abb. C-1B, Abb. C-2A). Für die negative Selektion wurde 3' terminal des 3' homologen Arms ein PGK Promotor gesteuertes Thymidinkinasegen (tk) platziert. Die Integrität des Konstrukts wurde durch Restriktionsanalyse (B.1.1) und Sequenzierung (B.1.4) überprüft.

Die Erzeugung von GK-KI Mäusen erfolgte wie unter B.2 beschrieben über homologe Rekombination in ES Zellen (Knock-in). Nach Linearisierung mit AscI wurde der pGK-KI „Targeting“ Vektor in R1 ES Zellen elektroporiert. In zwei „Targetings“ wurden 816 G418/Ganciclovir-resistente ES Zellklone analysiert. Durch Southern Blot Analyse konnte bei sechs unabhängigen ES Zellklonen eine korrekte Integration nachgewiesen werden (Abb. C-2A, B). Zwei Klone wurden in Blastozysten injiziert. Von drei Chimären, welche die genetische Veränderung in der Keimbahn weitergaben wurden drei GK-KI Mauslinien etabliert (Tabelle C-1). Da erwartungsgemäß alle drei Linien die gleichen phänotypischen Eigenschaften zeigten (Daten nicht gezeigt), wurde nur mit einer Linie, der GK-KI 1 Mauslinie, weitergearbeitet. Die GK-KI 1 Linie wurde sowohl auf einem reinen (129/Sv) als auch auf einem gemischten (129/Sv / C57BL/6) genetischen Hintergrund gezüchtet, was sich jedoch nicht auf die Eigenschaften der Mäuse auswirkte (Daten nicht gezeigt). Für die Versuche wurden i.d.R. GK-KI 1 Mäuse mit gemischtem genetischen Hintergrund (129/Sv / C57BL/6) verwendet.

A "Targeting" Strategie



B Southern Blot Analyse



C PCR Genotypisierung

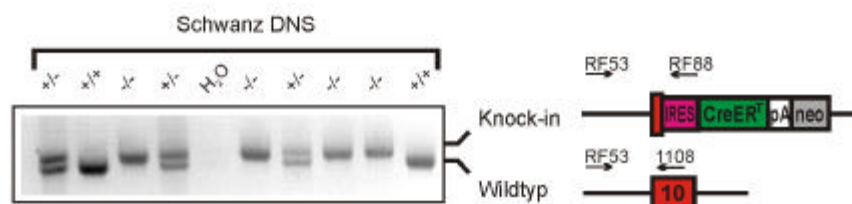


Abb. C-2. Erzeugung von GK-KI Mäusen

(A) „Targeting“ Strategie. Dargestellt ist der cGKI Wildtyp Genort, der „Targeting“ Vektor pGK-KI und der modifizierte Genort nach korrekter Integration (Knock-in Allel). Die Southern Blot Strategie zum Nachweis der korrekten Integration mittels einer 0,4 kb EcoRI-HindIII Sonde und einige Restriktionsenzym-Schnittstellen sind gezeigt. Nc, NcoI; Nh, NheI; B, BamHI; H, HindIII; As, Ascl; (B) Southern Blot Analyse (B.1.5) von DNS des ES Zellklons #34 und der Schwanz DNS von Mäusen (B.3.2.1). (C) Genotypisierung der Mäuse mittels PCR (B.1.3) mit den Primern RF53+RF88+1108 (F.1, F.2). Weitere Erklärung im Text.

Tabelle C-1. Ausbeute bei der Etablierung der GK-KI Mauslinie

ES Zellklon	reimplantierte Blastozysten	Nachkommen	Chimären	GLT ^a	Mauslinie
#34	35	8	3	2	GK-KI 1 GK-KI 2
#331	42	6	1	1	GK-KI 3

^a Chimären mit Keimbahntransmission („germ line transmission“)

Die Anwesenheit des cGKI Knock-in Allels in den Mäusen wurde mittels Southern Blot (Abb. C-2B) und PCR (Abb. C-2C) Analyse der Schwanz DNS überprüft. Die Erzeugung von homozygoten (-/-) Tieren nach Verkreuzung heterozygoter (+/-) Mäuse bestätigte, dass CreER^T im cGKI Genort integriert war.

C.1.2. Expression von CreER^T und Rekombination in GK-KI Mäusen

Die Expression von CreER^T unter der Kontrolle des endogenen cGKI Promotors wurde durch RT-PCR (B.1.3) analysiert. Mit spezifischen Primern wurde die mRNA des cGKI Wildtyp Allels bzw. des Knock-in Allels nachgewiesen. Die mRNA der Wildtyp cGKI konnte in allen untersuchten Organen detektiert werden, wobei in den glattmuskulären Geweben wie Aorta, Lunge, Darm und Uterus die stärkste Expression vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war die vom Knock-in Allel transkribierte RNS, die die IRES-CreER^T Sequenz enthielt, nur in sehr geringen Mengen und nur in den Organen nachzuweisen, in welchen das cGKI Wildtyp Gen in hohen Mengen exprimiert wird (Abb. C-3A). Nach Amplifikation der mRNA im Bereich zwischen Exon 7 und Exon 11 durch RT-PCR wurde aus Gewebe von heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) GK-KI Mäusen, nicht aber aus Gewebe von Wildtyp (+/+) Mäusen, eine cDNS Spezies mit relativ geringem Molekulargewicht erhalten (Abb. C-3B). Dies wies auf ein unerwartetes „Heraussplices“ bzw. „exon skipping“ des modifizierten Exon 10 mitsamt der IRES-CreER^T-neo Kasette hin. Die Sequenzierung (B.1.4) dieser vom Knock-in Allel transkribierten RNS Spezies bestätigte, dass hier Exon 9 direkt auf Exon 11 „gespliced“ wurde (Daten nicht gezeigt).

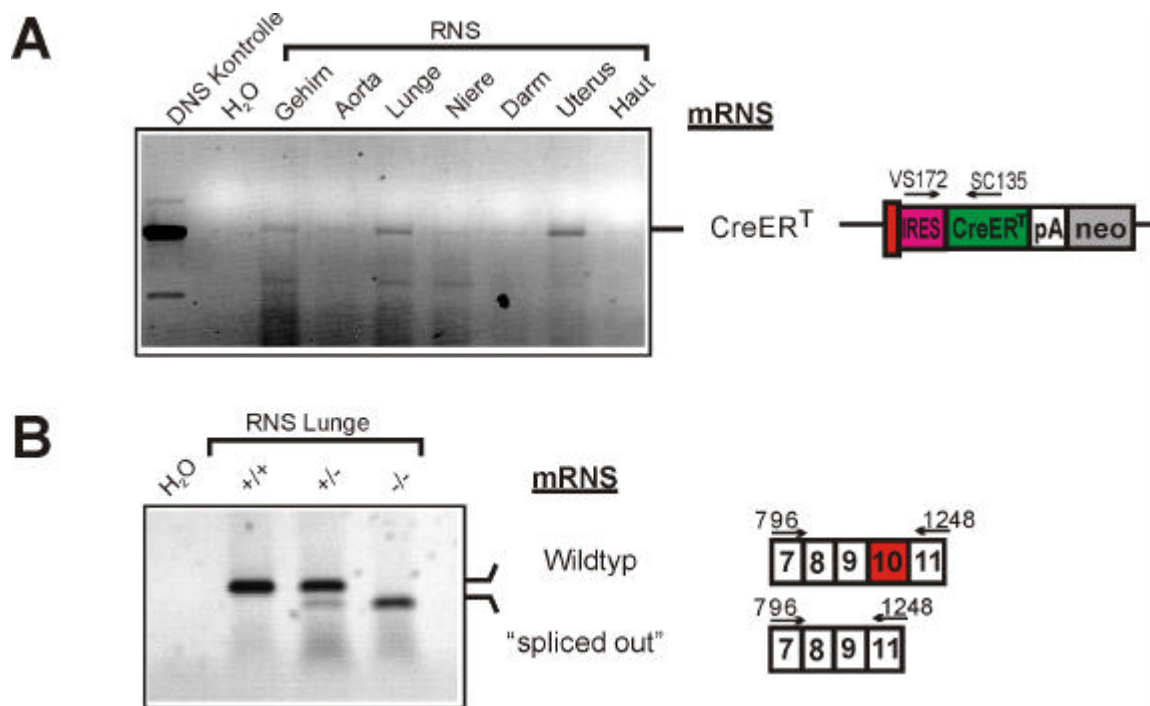


Abb. C-3. RT-PCR Analyse der Expression von CreER^T in GK-KI Mäusen

(A) Nachweis der CreER^T mRNS in verschiedenen Organen einer heterozygoten (+/-) GK-KI Maus (Primer VS172+SC135, F.1). (B) Nachweis der mRNS des cGKI Gens im Bereich zwischen Exon 7 und Exon 11 in der Lunge von Wildtyp (+/+) sowie heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) GK-KI Mäusen (Primer 796+1248; F.1). Die potentiell amplifizierten Exons sind angegeben. Die RNS wurde wie unter B.2.2.2 und B.1.3 angegeben isoliert und durch RT-PCR amplifiziert.

Um die Rekombinationseigenschaften der GK-KI Mäuse zu untersuchen, wurden sie mit transgenen ACZL Reporter-mäusen (Akagi et al., 1997) gekreuzt, die ein *loxP*-flankiertes Zielgen tragen. Durch PCR Analyse von DNS, die aus verschiedenen Organen von GK-KI/ACZL Mäusen isoliert wurde, konnte mit demselben Primerpaar (RF81+RF82) sowohl das nicht rekombinierte (ACZL) als auch das rekombinierte (ACZL-E) Reportergen nachgewiesen werden (Abb. A-4, S.6). Als Positivkontrollen für Rekombination wurden zwei weitere transgene Cre Mauslinien mit ACZL Mäusen verkreuzt. Die eine Linie, CMV-Cre (F.5; Dupé et al., 1997), exprimiert die Cre Rekombinase, die zweite Linie, CMV-CreER^T (F.5; Feil et al., 1996), exprimiert die Tamoxifen-aktivierbare CreER^T Rekombinase unter Kontrolle des CMV Promotors in vielen Geweben.

Erwartungsgemäß wurde in allen untersuchten Geweben von CMV-Cre/ACZL Mäusen (Abb. C-4A) sowie in einigen Geweben von Tamoxifen-behandelten CMV-CreER^T/ACZL Mäusen (Abb. C-4B) starke Rekombination nachgewiesen. Dagegen konnte nach intraperitonealer (i.p.) Injektion von täglich 1 mg Tamoxifen für 5 Tage in keinem der untersuchten

Organe von GK-KI/ACZL Mäusen die Excision des Reportergens detektiert werden (Abb. C-4C). Auch nach täglicher i.p. Injektion von bis zu 2 mg Tamoxifen oder OHT für bis zu 10 Tage oder nach peroraler (p.o.) Gabe der Liganden konnte in GK-KI/ACZL Mäusen keine Rekombination nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das Fehlen einer Rekombination korrelierte mit der geringen Expression von CreER^T in der GK-KI Mauslinie (Abb. C-3A).

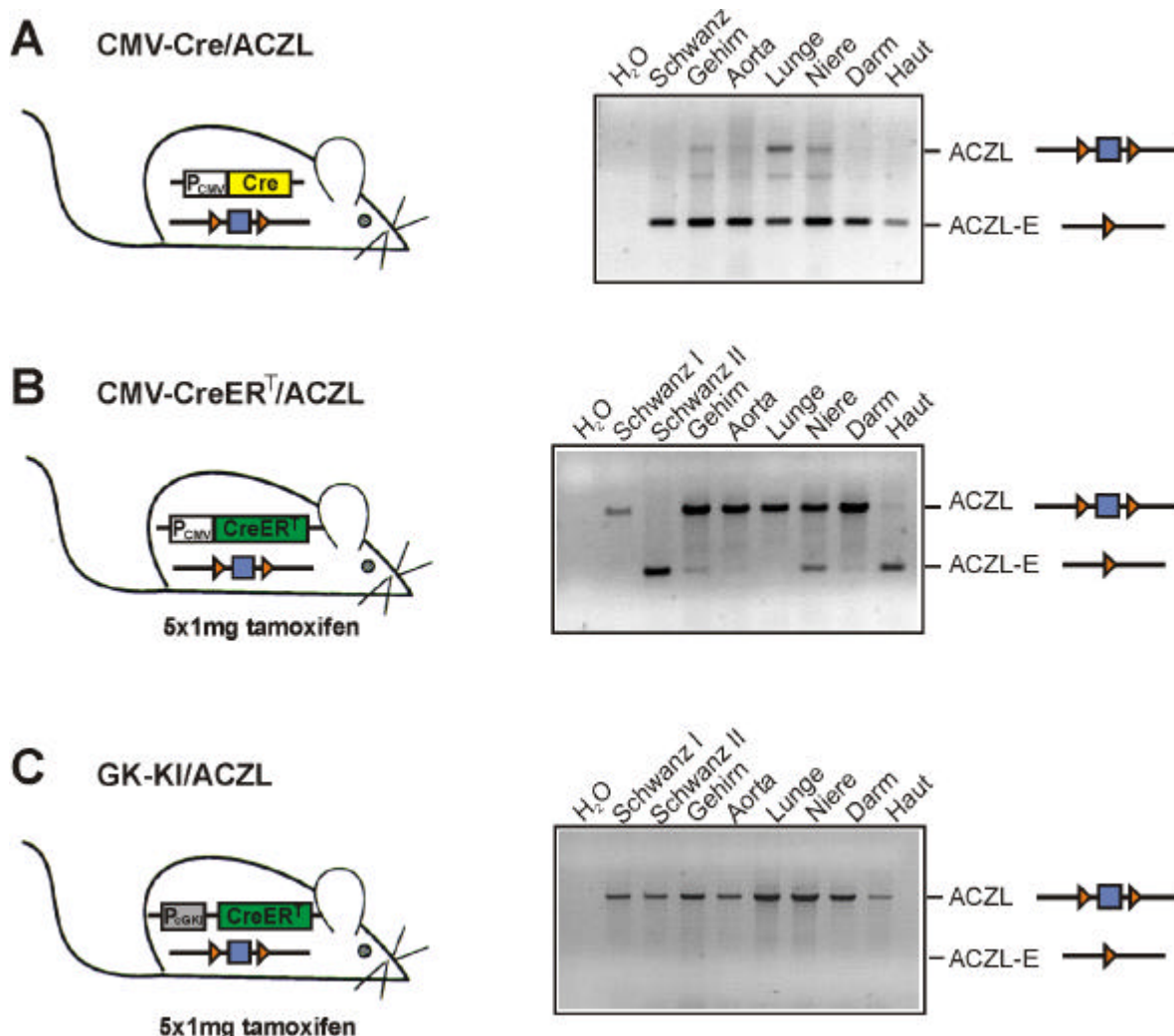


Abb. C-4. PCR Analyse der Rekombination in GK-KI Mäusen

Nachweis der nicht rekombinierten (ACZL) und rekombinierten (ACZL-E) DNS des ACZL Reportergens in verschiedenen Geweben von doppelt heterozygoten **(A)** CMV-Cre/ACZL Mäusen, **(B)** CMV-CreER^T/ACZL Mäusen und **(C)** GK-KI/ACZL Mäusen. CMV-CreER^T/ACZL und GK-KI/ACZL Mäuse wurden wie unter B.3.1 beschrieben mit Tamoxifen behandelt. Die DNS von Schwanz I wurde vor Gabe von Tamoxifen, die DNS von Schwanz II und der anderen Gewebe in **(B)** und **(C)** nach Gabe von Tamoxifen isoliert. Die DNS wurde wie unter B.3.2.1 angegeben isoliert und mittels PCR (B.1.3) mit den Primern RF81 und RF82 (Abb. A-4, S.6; F.1) amplifiziert.

C.1.3. Expression der cGKI in GK-KI Mäusen

Durch die Integration (Knock-in) der IRES-CreER^T-neo Kasette in den cGKI Lokus wurde der Leserahmen des cGKI Gens unterbrochen (Abb. C-1B). In homozygoten (-/-) GK-KI Tieren konnte mittels Western Blot Analyse kein cGKI Protein nachgewiesen werden (Abb. C-5), d.h. es wurde eine cGKI-defiziente Mauslinie etabliert.

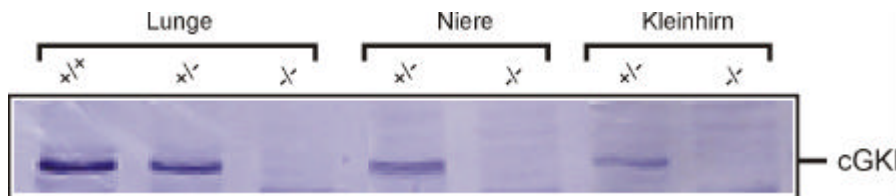


Abb. C-5. Western Blot Analyse der cGKI Expression in GK-KI Mäusen

Aufgetragen wurden jeweils 50 µg Protein aus Geweben von Wildtyp (+/+) Mäusen sowie von heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) GK-KI Mäusen. Die Membranen wurden mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen die cGKI (cGKIcommon Antikörper, F.3) inkubiert. Die Position des cGKI Proteins (ca. 75 kDa) ist angedeutet. Zur Durchführung der Proteinisolierung und des Western Blots siehe B.3.3 und B.3.5.

Heterozygote (+/-) GK-KI Mäuse verhielten sich wie Wildtyp (+/+) Mäuse, d.h. sie zeigten keine offensichtlichen Defekte. Dagegen fielen die cGKI-defizienten homozygoten (-/-) GK-KI Mäuse bereits in den ersten Tagen nach ihrer Geburt durch ihre signifikant geringere Körpergröße auf. Die meisten (-/-) GK-KI Mäuse starben in einem Alter von 3 bis 6 Wochen. Bei der Nekropsie zeigten sich ein stark vergrößerter Blinddarm und weitere Anomalien im Magen-Darm-Trakt (Daten nicht gezeigt). Die geringe Lebenserwartung und die scheinbar gestörte Relaxation glattnuskulärer Organe in (-/-) GK-KI Mäusen entspricht dem Phänotyp einer anderen cGKI-defizienten Mauslinie, die durch Integration einer neo Kasette in Exon 10 hergestellt wurde (Pfeifer et al., 1998). Eine Auswertung der Genotypen der Nachkommen aus Verpaarungen heterozygoter (+/-) GK-KI Eltern ist in Abb. C-6 dargestellt. Daraus ergibt sich, dass die Lebensfähigkeit von cGKI-defizienten Embryonen bis zum Tag 13 p.c. nicht signifikant beeinträchtigt ist (Abb. C-6A). Zum Zeitpunkt der Genotypisierung in einem Alter von 10-14 Tagen sind die (-/-) GK-KI Tiere gegenüber (+/+) Geschwistern jedoch deutlich unterrepräsentiert (Abb. C-6B). Bis zum Absetzen in einem Alter von 3-4 Wochen nimmt die Anzahl der (-/-) GK-KI Nachkommen gegenüber (+/+) Wildtyp Geschwistern nur noch geringfügig ab (Abb. C-6C). Die Lebenserwartung wurde weder vom Geschlecht (Abb. C-6) noch vom genetischen Hintergrund (Daten nicht gezeigt) der Tiere beeinflusst. Da die Sterblichkeit der cGKI-defizienten Mäuse nach dem Absetzen von der Mutter stark zunahm (Daten nicht gezeigt), wurden die Mäuse i.d.R. im Alter von 3-6 Wochen getötet und für Versuche verwendet.

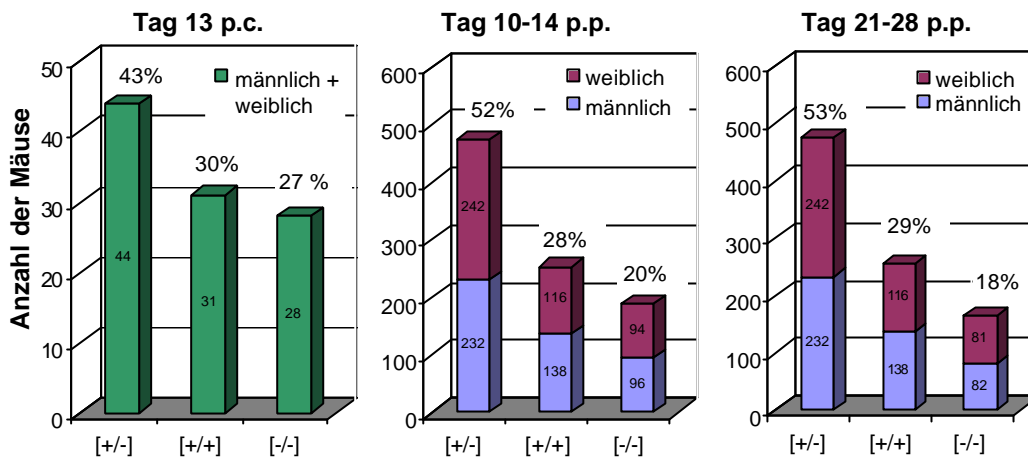


Abb. C-6. Genotypen der Nachkommen heterozygoter (+/-) GK-KI Eltern

Der prozentuale Anteil der Genotypen von Nachkommen aus Verpaarungen heterozygoter (+/-) GK-KI Eltern zu drei verschiedenen Zeitpunkten während der prä- und postnatalen Entwicklung ist angegeben. **(A)** Embryonalstadium Tag 13 *post coitum* (p.c.), **(B)** 10-14 Tage nach der Geburt (*post partum*, p.p.), **(C)** 21-28 Tage nach der Geburt (p.p.). In die Auswertung ging die Zucht auf reinem (129/Sv) als auch auf gemischtem (129/Sv / C57BL/6) genetischen Hintergrund ein. Die Zahlen in den Säulen geben die jeweilige Anzahl der genotypisierten Tiere an.

C.2. Expression von CreER^{T2} unter der Kontrolle des SM22 Promotors

Während für den unter C.1 beschriebenen Knock-in in den cGKI Genort die CreER^T Rekombinase eingesetzt wurde, wurde für weitere Versuche die CreER^{T2} Rekombinase (A.2; Abb. A-3, S.5) verwendet. CreER^{T2} kann in kultivierten Säugerzellen durch relativ geringe Mengen an Tamoxifen aktiviert werden (Feil et al., 1997), wurde aber bisher noch nicht in transgenen Mäusen exprimiert. Um eine durch CreER^{T2} verursachte Rekombination spezifisch im glatten Muskel zu erreichen, wurde diese Rekombinase in transgenen Mäusen unter der Kontrolle des SM22 Promotors exprimiert. Das SM22 Gen (Abb. C-7) wird stark und selektiv in vaskulären und viszeralen glatten Muskelzellen adulter Mäuse exprimiert (Solway et al., 1995; Li et al., 1996a).

Zur Herstellung transgener Mäuse wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurden durch Transgenese in ES Zellen Mauslinien erzeugt, in welchen das SM-CreER^{T2} Transgen zufällig in das Genom integriert war (SM-TG Mäuse, Abb. C-8). Zum anderen wurde die CreER^{T2} Sequenz über homologe Rekombination in ES Zellen (Knock-in) in das endogene SM22 Gen eingeführt (SM-KI Mäuse, Abb. C-9).

C.2.1. Herstellung von SM-TG und SM-KI Mäusen

C.2.1.1. Isolierung der genomischen SM22 DNS

Da die Sequenz des murinen SM22 Gens bekannt war (GenBank accession number Z68618), konnte die genomische SM22 DNS durch PCR isoliert werden. Dazu wurden aus genomischer DNS von R1 ES Zellen drei überlappende Fragmente des SM22 Gens durch „Long-Range“ PCR amplifiziert (B.1.3) und subkloniert (B.1.1). So konnte die DNS des SM22 Gens von nt 656 bis nt 8334 mit allen fünf Exons, den dazwischenliegenden Introns und 1,8 kb der 5' „upstream“ Region des Gens isoliert werden (Abb. C-7). Die klonierte DNS wurde im Bereich der Exons und Exon-Intron Grenzen sequenziert (B.1.4) um potentielle Fehler der DNS Polymerase während der PCR auszuschließen.

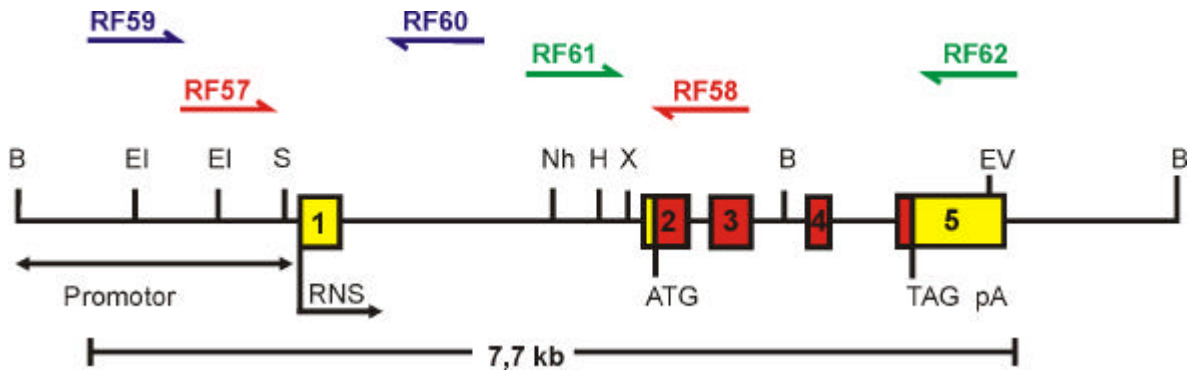


Abb. C-7. Schematische Darstellung des SM22 Gens

Drei überlappende Fragmente des SM22 Gens wurden aus R1 ES Zell DNS mit dem „Expand™ Long Template PCR System“ in Puffer S1 amplifiziert (B.1.3). Das 5' Fragment (2,1 kb) wurde mit den Primern RF59+RF60, das mittlere Fragment (4,5 kb) mit RF57+RF58 und das 3' Fragment (2,1 kb) mit RF61+RF62 amplifiziert (F.1). So wurden insgesamt 7,7 kb des SM22 Gens isoliert. Die potentielle Promotorregion, die RNS Startstelle, die Translationsinitiations- (ATG) und Translationsterminationsstelle (TAG) sowie das pA-Signal und die Exons (Vierecke) sind angedeutet. Einige Restriktionsenzym-Schnittstellen sind angegeben: B, BamHI; EI, EcoRI; EV, EcoRV; S, SphI; Nh, NheI; H, HindIII; X, XbaI

C.2.1.2. Erzeugung von SM-TG Mäusen

Für die Erzeugung transgener SM-TG Mauslinien wurde der Vektor pSM-TG konstruiert (Abb. C-8A). Er enthielt ein 5,5 kb Fragment des SM22 Gens (nt 1152 bis nt 6613) einschließlich der 1,3 kb langen unmittelbaren 5' „upstream“ Region, die die Expression der CreER^{T2} Rekombinase steuern sollte. Durch die Verwendung eines ähnlichen SM22 Promotorfragments konnte ein *lacZ* Transgen erfolgreich in glatten Muskelzellen adulter Mäuse exprimiert werden (Li et al., 1996b; Moessler et al., 1996). Die Sequenz für die CreER^{T2} Rekombinase (Feil et al., 1997) gefolgt von einem SV40 Polyadenylierungssignal wurde direkt an das SM22 Translationsstartcodon im Exon 2 fusioniert. Dabei wurde das Serin an Aminosäureposition 2 der CreER^{T2} Rekombinase zu einem Histidin mutiert (S2H-Mutation). Das Konstrukt wurde durch Restriktionsanalyse (B.1.1) und Sequenzierung (B.1.4) auf seine Richtigkeit überprüft.

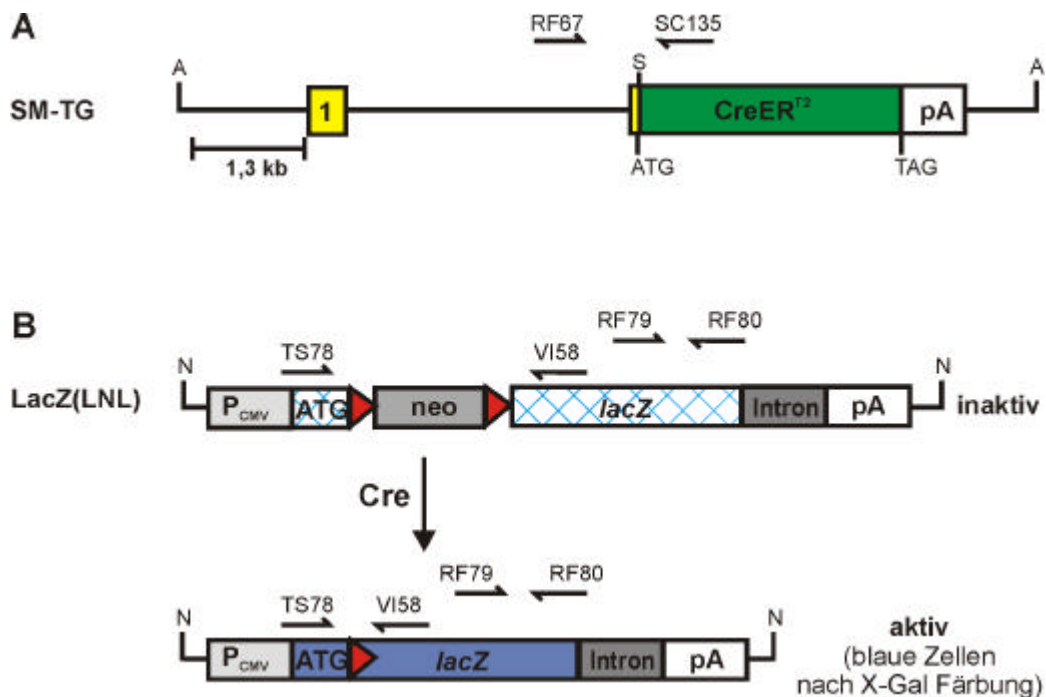


Abb. C-8. Erzeugung von SM-TG Mäusen

R1 ES Zellen wurden mit den Transgenen SM-TG (A) und LacZ(LNL) (B) cotransfiziert. Nach zufälliger Integration beider Transgene wurden ES Zellklone für die Generierung von Mauslinien ausgewählt (siehe Text). Die Integration in das Genom bzw. der Genotyp der Mäuse wurde durch PCR Analyse mit den Primern RF67+SC135 (A) und RF79+RF80 (B) überprüft (F.1; F.2). (A) Das SM-TG Transgen enthielt ein 1,3 kb Promotorfragment, Exon 1, Intron 1 und einen Teil von Exon 2 des SM22 Gens. Die CreER^{T2} Sequenz wurde direkt an das SM22 Startcodon in Exon 2 fusioniert. (B) Das LacZ(LNL) Transgen diente als Rekombinations-Reporter. Die Cre-vermittelte Excision der Neomycinresistenzkassette (neo) kann durch PCR (Primer TS78+VI58, F.1) analysiert werden. Einige Restriktionsenzym-Schnittstellen sind angegeben: A, AseI; S, SphI; N, NsiI. ATG, Translationsstartcodon; TAG, Stopcodon; pA, SV40 pA-Signal; P_{CMV}, Cytomegalovirus Promotor; *lacZ*, β-Galaktosidasegen; Intron, SV40 „small t intron“; rote Dreiecke, *loxP* Sequenz. Weitere Erklärung im Text.

Das 8,9 kb *AseI* Fragment des Plasmids pSM-TG wurde zusammen mit dem über *NsiI* linearisierten Rekombinations-Reporterplasmid pLacZ(LNL) (Feil et al., 1997) in R1 ES Zellen elektroporiert. Das LacZ(LNL) Transgen enthält ein *lacZ* Gen, dessen Leserahmen durch eine *loxP*-flankierte neo Kasette unterbrochen ist (Abb. C-8B). Erst nach dem Herausschneiden der neo Kasette durch die Cre Rekombinase wird der *lacZ* Leserahmen wiederhergestellt. Die Rekombination kann durch PCR Analyse (B.1.3) oder den Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität mittels X-Gal Färbung (B.3.5) nachgewiesen werden.

Das LacZ(LNL) Reportertransgen wurde aus zwei Gründen cotransfiziert. Erstens konnten so Zellen selektioniert werden, die das/die Transgen(e) in das Genom integriert hatten (G418-Resistenz). Zweitens konnte überprüft werden, ob die CreER^{T2} Rekombinase funktionell exprimiert wurde, indem die Zellen mit OHT behandelt wurden und anschließend die Rekombination des Reportertransgens mittels X-Gal Färbung nachgewiesen wurde. Nach zufälliger Integration der Transgene in das Genom der ES Zellen wurden G418-resistente ES Zellklone isoliert (B.2.2). Da anzunehmen war, dass der SM22 Promotor in undifferenzierten ES Zellen nicht aktiv ist, wurden Duplikate der Klone unter Bedingungen kultiviert, welche die Differenzierung in glattmuskuläre Zellen fördern (Blank et al., 1995; Drab et al., 1997). Dazu wurden die ES Zellklone ohne Feederzellen für vier Tage in EF-Medium in Anwesenheit von 1 μ M all-trans Retinsäure (B.3.1) kultiviert. Es wurden mehrere ES Zellklone identifiziert, die sich nach Behandlung mit 1 μ M OHT (B.3.1) und X-Gal Färbung (B.3.5) blau färbten (Daten nicht gezeigt).

Zwei positive ES Zellklone (#53 und #61), die sowohl das LacZ(LNL) als auch das SM-TG Transgen zufällig in ihr Genom integriert hatten, wurden in Blastozysten injiziert um chimäre Mäuse zu erzeugen, welche die veränderte DNS in die Keimbahn weitergaben (B.2.4, B.2.5; Tabelle C-2). Es wurden zwei unabhängige SM-TG Mauslinien etabliert (SM-TG 53 a-g und SM-TG 61), die sich jedoch bezüglich der CreER^{T2} Expression und Rekombinationseffizienz nicht unterschieden (Daten nicht gezeigt). Weitere Untersuchungen wurden mit der SM-TG 53 Mauslinie auf einem gemischten genetischen Hintergrund (129/Sv / C57BL/6) durchgeführt. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mittels PCR Analyse der Schwanz DNS (Abb. C-8, F.2). Heterozygote SM-TG Tiere zeigten keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen.

Tabelle C-2. Ausbeute bei der Etablierung der SM-TG Mauslinie

ES Zellklon	reimplantierte Blastozysten	Nachkommen	Chimären	GLT ^a	Mauslinie
#53	79	32	19	7	SM-TG 53 a-g
#61	73	27	7	1	SM-TG 61

^a Chimären mit Keimbahntransmission („germ line transmission“)

C.2.1.3. Erzeugung von SM-KI Mäusen

Zur Erzeugung der Knock-in Mauslinie SM-KI wurde der „Targeting“ Vektor pSM-KI konstruiert (Abb. C-9A). Er enthielt die SM22 Genfragmente von nt 2268 bis nt 6613 und nt 6698 bis nt 7896 als 5' und 3' homologe Arme. Die Region zwischen nt 6614 und nt 6697 des SM22 Gens wurde durch die CreER^{T2} Sequenz (S2H-Mutation, siehe C.2.1.2), ein SV40 pA-Signal und eine neo Kasette ersetzt. Die Rekombinasesequenz wurde damit direkt an das SM22 Translationsstartcodon fusioniert. Für die negative Selektion wurde 3' terminal des 3' homologen Arms ein PGK Promotor gesteuertes tk Gen eingebaut. Die Integrität des Plasmids wurde durch Restriktionsanalyse (B.1.1) und Sequenzierung (B.1.4) überprüft.

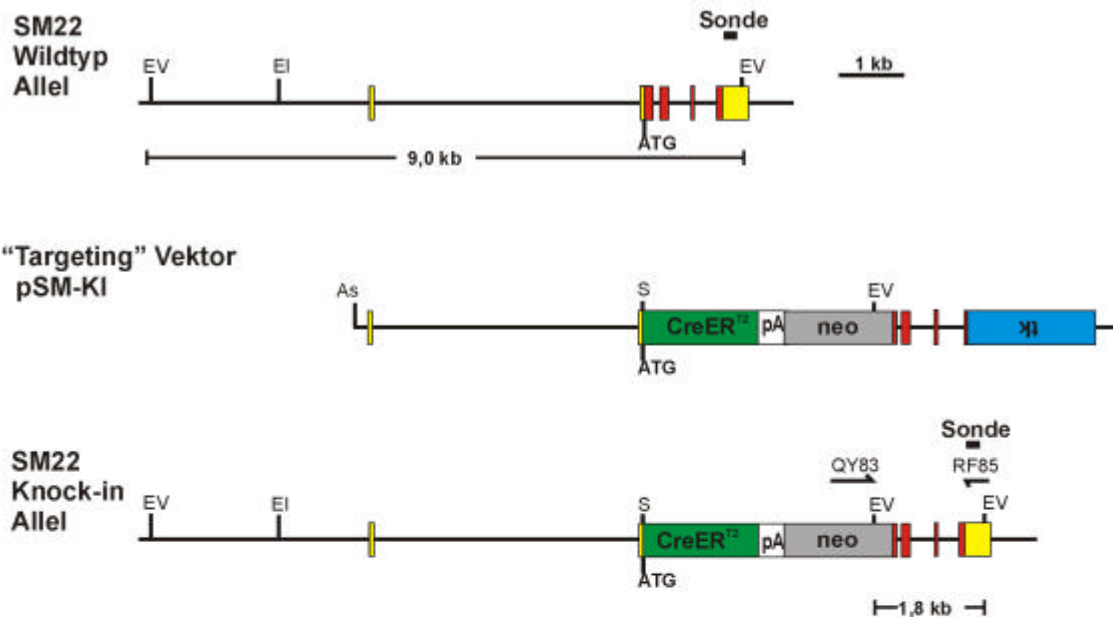
Nach Elektroporation des über AscI linearisierten „Targeting“ Vektors pSM-KI in R1 ES Zellen wurden 960 G418/Ganciclovir-resistente ES Zellklone analysiert (B.2.2, B.2.3). Mittels PCR (Abb. C-9B) und Southern Blot (Abb. C-9C) Analyse wurde ein Klon mit korrekter Integration im SM22 Genort identifiziert. Dieser ES Zellklon (#220) wurde verwendet, um SM-KI Knock-in Mäuse zu generieren (B.2.4, B.2.5, Tabelle C-3). Die SM-KI Mauslinie wurde sowohl auf reinem (129/Sv) als auch auf gemischtem (129/Sv / C57BL/6) genetischen Hintergrund gezüchtet. Für Versuche wurden i.d.R. Tiere mit gemischtem genetischen Hintergrund verwendet.

Tabelle C-3. Ausbeute bei der Etablierung der SM-KI Mauslinie

ES Zellklon	reimplantierte Blastozysten	Nachkommen	Chimären	GLT ^a	Mauslinie
#220	34	9	5	2	SM-KI 57 SM-KI 59

^a Chimären mit Keimbahntransmission („germ line transmission“)

A "Targeting" Strategie



B PCR Analyse von ES Zellklonen



C Southern Blot Analyse

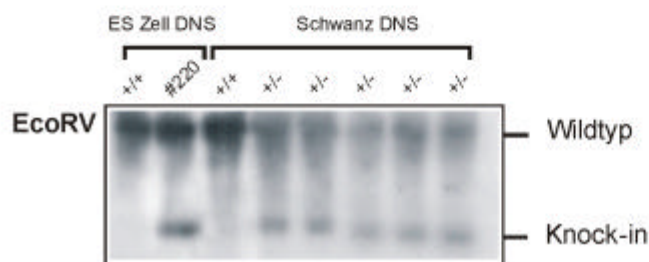


Abb. C-9. Erzeugung von SM-KI Mäusen

(A) „Targeting“ Strategie. Dargestellt ist der SM22 Wildtyp Genort, der „Targeting“ Vektor pSM-KI und der modifizierte Genort nach korrekter Integration (Knock-in Allel). Die PCR und Southern Blot Strategie zum Nachweis der korrekten Integration und einige Restriktionsenzym-Schnittstellen sind gezeigt. As, Ascl; Ei, EcoRI; EV, EcoRV; S, SphI; (B) PCR Analyse von ES Zellklonen (B.2.3.3). Mit den Primern QY83+RF85 (F.1) wurde in Pool 3 und 4 ein positives Signal (1,6 kb) erhalten (links). Das positive Signal in Pool 4 konnte auf den Klon E (entspricht #220) zurückverfolgt werden (rechts). (C) Southern Blot Analyse (B.1.5) der DNS von Wildtyp ES Zellen (+/+), von ES Zellklon #220 und von Schwänzen der SM-KI Mäuse (B.3.2.1). Als Sonde wurde ein 0,13 kb PstI Fragment des SM22 Gens verwendet. Weitere Erklärung im Text.

Die Genotypisierung der SM-KI Mäuse erfolgte mittels PCR Analyse (Abb. C-10). Nach Verpaarung heterozygoter (+/-) SM-KI Tiere wurden homozygote (+/+ und -/-) und heterozygote (+/-) Nachkommen im Mendelschen Verhältnis geboren (Daten nicht gezeigt). Die Erzeugung von homozygoten (-/-) SM-KI Tieren bestätigte, dass das CreER^{T2} Transgen im SM22 Genort integriert war. Heterozygote (+/-) und homozygote (-/-) SM-KI Tiere zeigten keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen.

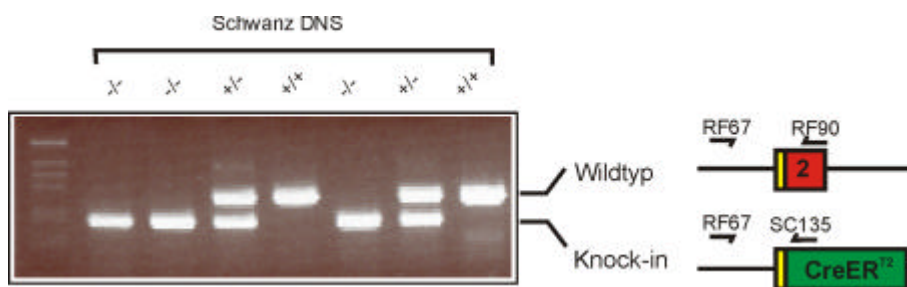


Abb. C-10. PCR Genotypisierung von SM-KI Mäusen

Die Genotypisierung der SM-KI Mäuse erfolgte mittels PCR Analyse (B.1.3) der Schwanz DNS (B.3.2.1) mit den Primern RF67+RF90+SC135 (F.1, F.2).

C.2.2. Vergleichende Analyse von SM-TG und SM-KI Mäusen

Durch RT-PCR konnte die Expression von CreER^{T2} sowohl in SM-TG als auch in SM-KI Mäusen in glattmuskulären Geweben nachgewiesen werden (Abb. C-11). In beiden Fällen wurde die Rekombinase sowohl im vaskulären (Aorta) als auch im viszeralen (Magen) glatten Muskel exprimiert. Um die relative Menge an CreER^{T2} mRNA abschätzen zu können, wurde die cDNS eines „housekeeping“ Gens, der Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase (HPRT), coamplifiziert. Die CreER^{T2} mRNA wurde in SM-KI Mäusen signifikant stärker exprimiert als in SM-TG Mäusen (Abb. C-11). Die Sequenzanalyse der Amplifikate zeigte in beiden Fällen, dass korrektes „Splicing“ von Exon 1 auf Exon 2 stattfand (Daten nicht gezeigt).

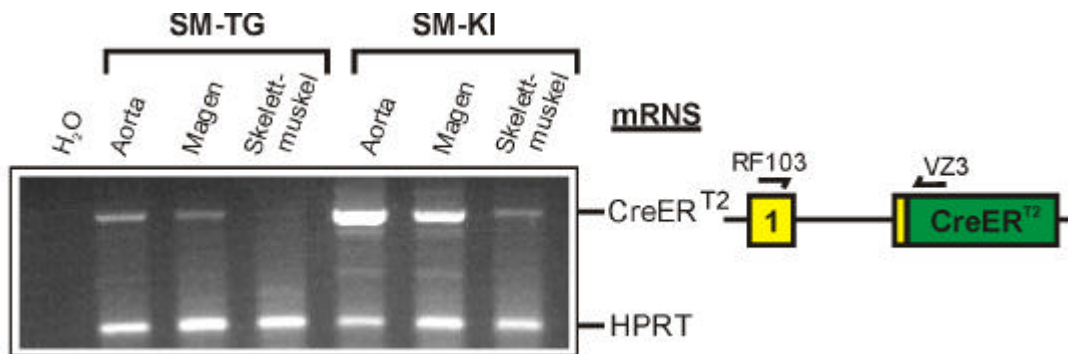


Abb. C-11. RT-PCR Analyse der Expression von CreER^{T2} in SM-TG und SM-KI Mäusen

Nachweis der CreER^{T2} mRNS in verschiedenen Organen von heterozygoten (+/-) SM-TG und SM-KI Mäusen (Primer RF103+VZ3, F.1). Als interne Kontrolle diente ein „housekeeping“ Gen (HPRT, Primer QG197+QG198, F.1). Die RNS wurde wie unter B.3.2.2 angegeben isoliert und durch RT-PCR (B.1.3) amplifiziert.

Um die Rekombination in glatten Muskelzellen von SM-TG und SM-KI Mäusen zu vergleichen, wurden diese Linien mit der ACZL Rekombinations-Reportermaus (A.3, Abb. A-4, S.6) gekreuzt. Die ACZL Maus exprimiert die β -Galaktosidase nach Cre-vermittelter Excision eines *loxP*-flankierten CAT Gens in einer großen Anzahl von Geweben inklusive dem glatten Muskel (Akagi et al., 1997). Die β -Galaktosidaseaktivität und damit indirekt die Rekombination kann durch X-Gal Färbung auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden.

Aus den Aorten von doppelt heterozygoten SM-TG/ACZL und SM-KI/ACZL Mäusen wurden Zellkulturen von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) angelegt (B.3.4). Dass es sich bei den kultivierten Zellen zu über 90% um glatte Muskelzellen handelte, wurde durch Anfärbung der Zellen mit einem Antikörper gegen das glattmuskuläre α -Aktin bestätigt (B.3.5, F.3); (Daten nicht gezeigt). Während die mit Vehikel behandelten Zellen nach X-Gal Färbung keine Blaufärbung zeigten, konnte in OHT-behandelten Zellen β -Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden (Abb. C-12A). Der Anteil blauer, d.h. „rekombinierter“ Zellen war bei SM-KI/ACZL Mäusen deutlich höher als bei SM-TG/ACZL Mäusen, was mit der stärkeren Expression von CreER^{T2} in der SM-KI Mauslinie (Abb. C-11) korrelierte.

Die Immunfärbung von VSMCs aus SM-KI Mäusen mit einem Cre-spezifischen Antikörper zeigte, dass die CreER^{T2} Rekombinase in diesen Zellen hoch exprimiert war (Abb. C-12B). Die Lokalisation der Immunfärbung wies darauf hin, dass die Rekombinase zunächst im Zytosol vorhanden war und erst nach Verabreichung des Liganden OHT in den Kern translozierte um Rekombination auszulösen (Abb. C-12A).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Aktivität der CreER^{T2} Rekombinase in den kultivierten VSMCs nicht nur durch OHT (1 μ M), sondern auch durch Tamoxifen (1 μ M), allerdings weniger effizient, induziert werden konnte. Die gleichzeitige Anwesenheit von E2 (100 nM) beeinflusste die OHT- oder Tamoxifen-induzierte Rekombination nicht. Nach Behandlung der Zellen mit E2 (100 nM) alleine wurde keine Rekombination detektiert (Daten nicht gezeigt).

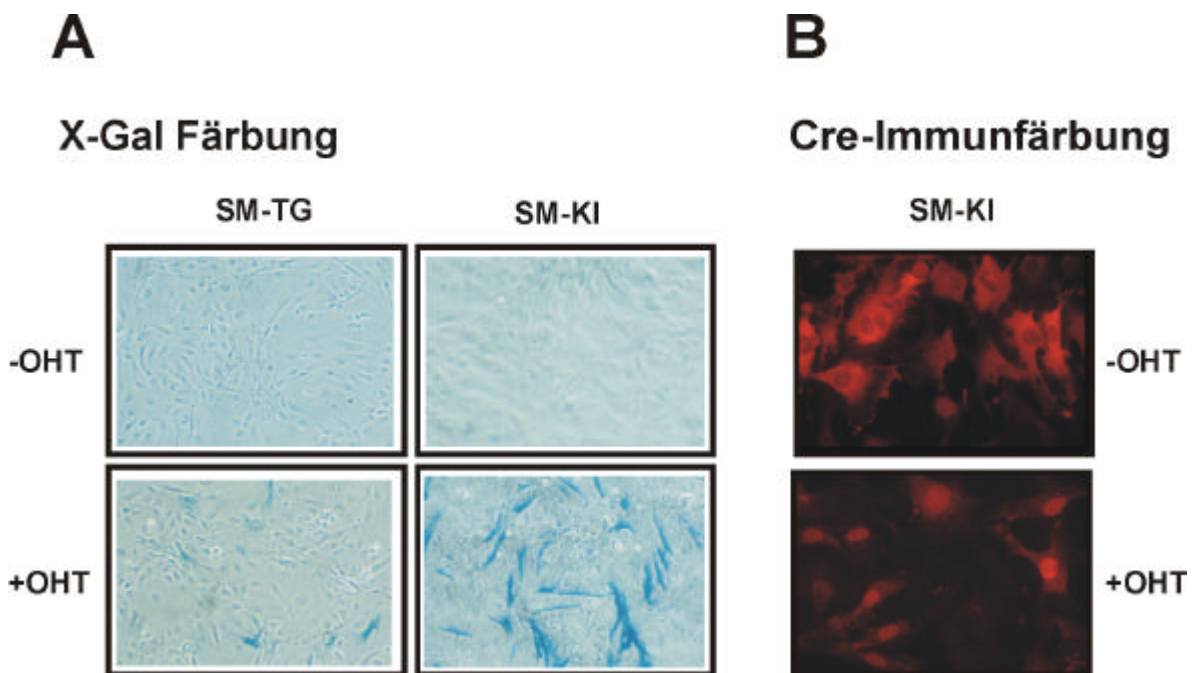


Abb. C-12. Rekombination und CreER^{T2} Expression in kultivierten VSMCs von SM-TG und SM-KI Mäusen

(A) Detektion der Rekombination in VSMCs von doppelt heterozygoten SM-TG/ACZL und SM-KI/ACZL Mäusen. Die VSMCs wurden aus Aorten von 57 Wochen alten Mäusen isoliert und kultiviert (B.3.4), für 3 Tage mit Vehikel (-OHT) oder 1 μ M OHT (+OHT) behandelt (B.3.1) und danach mit XGal gefärbt (B.3.5.2). Originalvergrößerung x100. **(B)** Nachweis des CreER^{T2} Proteins in VSMCs von SM-KI Mäusen durch Immunfärbung (B.3.5.5) mit einem Cre-spezifischen Antikörper (F.3) vor (-OHT) und 3 Stunden nach (+OHT) Zugabe von OHT. Originalvergrößerung x400.

Die geringe Rekombinationseffizienz in kultivierten VSMCs der SM-TG Mauslinie wies bereits auf eine niedrige *in vivo* Effizienz der Tamoxifen-aktivierbaren Rekombination in diesen Mäusen hin. Tatsächlich wurden in X-Gal gefärbten glattmuskulären Organen von Tamoxifen-behandelten SM-TG/ACZL Mäusen weniger als 5% blaue Zellen detektiert, wobei sowohl vaskuläre als auch viszerale glatte Muskelzellen gefärbt wurden (Daten nicht gezeigt).

Es ist bekannt, dass eine hohe Kopienzahl des Transgens dessen Expression unterdrücken kann („silencing“, Garrick et al., 1998). Durch PCR und Southern Blot Analysen der DNS aus SM-TG Mäusen wurde eine mehrmalige Integration der Transgene SM-TG und LacZ(LNL) (Abb. C-8, S.49) sowie deren relative Orientierung festgestellt (Abb. C-13). Da das LacZ(LNL) Transgen *loxP* Sequenzen enthielt, konnte nun mit Hilfe des Cre/*lox* Systems die Kopienzahl reduziert und damit die Expression der CreER^{T2} Rekombinase möglicherweise verbessert werden (Garrick et al., 1998). Die Verpaarung von SM-TG Mäusen mit CMV-Cre „deleter“ Mäusen (F.5; Dupé et al., 1997) führte zum Herausschneiden *loxP*-flankierter DNS, so dass die Anzahl von Transgeneinheiten bis auf eine Einheit reduziert wurde (Abb. C-13). Das „reduzierte“ SM-TG Transgen wurde in der Keimbahn weitergegeben und damit eine SM-TG „Excisions“ Mauslinie (SM-TG-E) generiert. Jedoch konnte in SM-TG-E Mäusen nach Verpaarung mit ACZL Reporter-mäusen und Tamoxifenbehandlung keine gesteigerte Rekombinationseffizienz detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

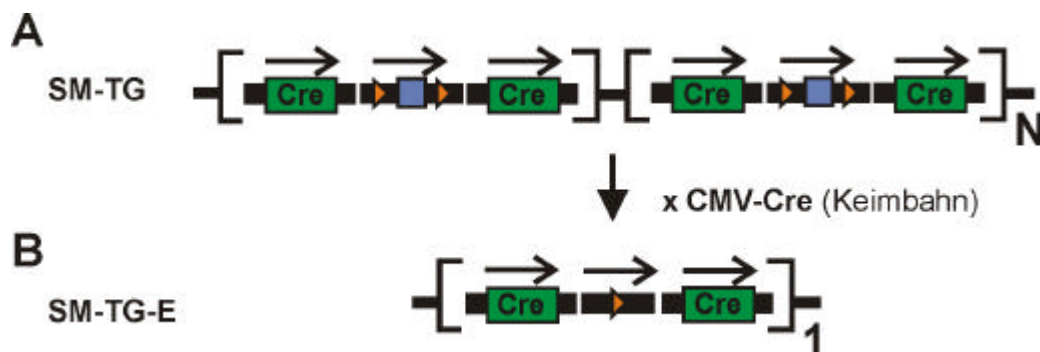


Abb. C-13. Transgen-Integrationsmuster in SM-TG Mäusen und Herstellung von SM-TG-E Mäusen

(A) Schematische Darstellung des Integrationsmusters und der Orientierung (Pfeile) der cointegrierten Transgene SM-TG (Cre in grünem Viereck) und LacZ(LNL) (blaues Viereck; Dreiecke, *loxP* Sequenzen) in SM-TG Mäusen. Die genaue Struktur der Transgene ist in Abb. C-8 (S.49) gezeigt. Die Transgeneinheit ([]) ist mehrmals hintereinander (N) integriert. (B) Die SM-TG-E Mauslinie wurde durch Transgen-Excision mittels CMV-Cre Mäusen aus SM-TG Mäusen erzeugt. SM-TG-E Mäuse enthalten nur noch eine Kopie der Transgeneinheit.

SM-TG Mäuse konnten als Rekombinations-Reportermäuse genutzt werden, da sie das LacZ(LNL) Reportertransgen (Abb. C-8B, S.49) enthielten. Die X-Gal Färbung von Organen aus SM-TG und SM-TG-E Mäusen zeigte, dass SM-TG Mäuse nach Cre-vermittelter Rekombination des LacZ(LNL) Transgens die β -Galaktosidase in verschiedenen Organen exprimierten (Kleinhirn, Herz, Skelettmuskel, Niere, Pankreas, Darmepithel, Haut), insbesondere auch in Geweben, die von ACZL Reportermäusen nicht oder nur teilweise erfasst werden, wie Pankreas, Niere und Darmepithel (Daten nicht gezeigt).

Für weitere Untersuchungen wurden die SM-KI Mäuse ausgewählt, da sie im Vergleich zu SM-TG Mäusen und SM-TG-E Mäusen eine höhere Rekombinationseffizienz in glatten Muskelzellen aufwiesen (Abb. C-12A).

C.2.3. Expression von CreER^{T2} und Rekombination in SM-KI Mäusen

Zur genaueren Charakterisierung der Expression von CreER^{T2} in verschiedenen Geweben der SM-KI Mauslinie wurde die mRNS der CreER^{T2} Rekombinase und des SM22 Gens durch RT-PCR coamplifiziert (Abb. C-14). Eine starke CreER^{T2} Expression war in Geweben mit einem großen Anteil an glatten Muskelzellen wie Aorta, Magen-Darmtrakt und Uterus zu erkennen, während in anderen Geweben eine geringere oder gar keine Expression (z.B. im Gehirn) nachzuweisen war. Dieses Expressionsmuster korrelierte gut mit der Expression des endogenen SM22 Gens (Abb. C-14), in welches das CreER^{T2} Transgen durch Knock-in integriert worden ist.

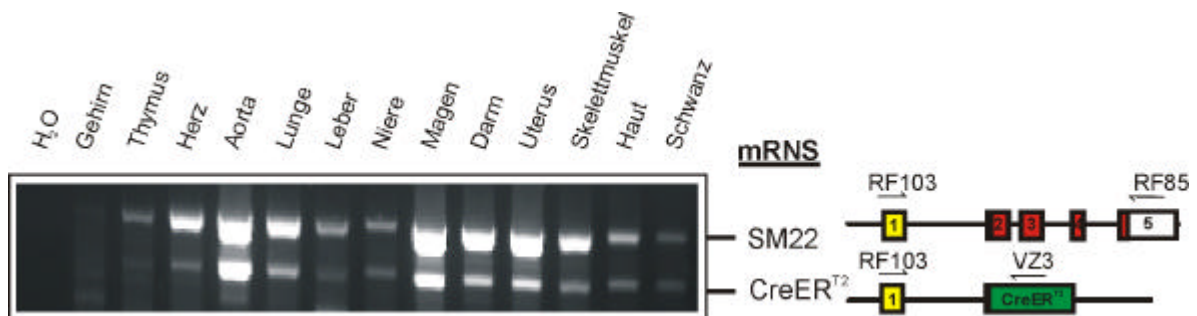


Abb. C-14. RT-PCR Analyse der Expression von CreER^{T2} und SM22 in SM-KI Mäusen

Nachweis der CreER^{T2} und SM22 mRNS in verschiedenen Organen einer heterozygoten (+/-) SM-KI Maus (Primer RF103+RF85, F.1). Die RNS wurde wie unter B.3.2.2 angegeben isoliert und durch RT-PCR (B.1.3) amplifiziert.

Zur Analyse der Rekombination wurden doppelt heterozygote SM-KI/ACZL Mäuse intraperitoneal (i.p.) entweder mit Vehikel oder mit 1 mg Tamoxifen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen injiziert (B.3.1). Nach Verabreichung von Tamoxifen konnten keine pathologischen Veränderungen an den Mäusen beobachtet werden.

Zunächst wurde die Rekombination mittels PCR in Geweben von nicht behandelten und Tamoxifen-behandelten Mäusen analysiert (Abb. C-15). Während in unbehandelten Mäusen in keinem der untersuchten Gewebe Rekombination detektiert wurde, konnte in der Aorta, dem Magen-Darmtrakt und Uterus von Tamoxifen-injizierten Mäusen eine relativ starke Rekombination nachgewiesen werden. In einigen anderen Geweben (z.B. Schwanz) wurde eine relativ schwache Rekombination detektiert, die möglicherweise auf den Anteil an vaskulären glatten Muskelzellen bzw. Gefäßen in diesen Geweben zurückzuführen war (siehe auch S.60). Die Rekombination im Schwanz konnte in derselben Maus vor Injektion von Tamoxifen nicht nachgewiesen werden (Abb. C-15, +Tam; vgl. Schwanz I und Schwanz II). Das glattmuskel-selektive Rekombinationsmuster korrelierte gut mit dem Expressionsprofil der CreER^{T2} Rekombinase (Abb. C-14).

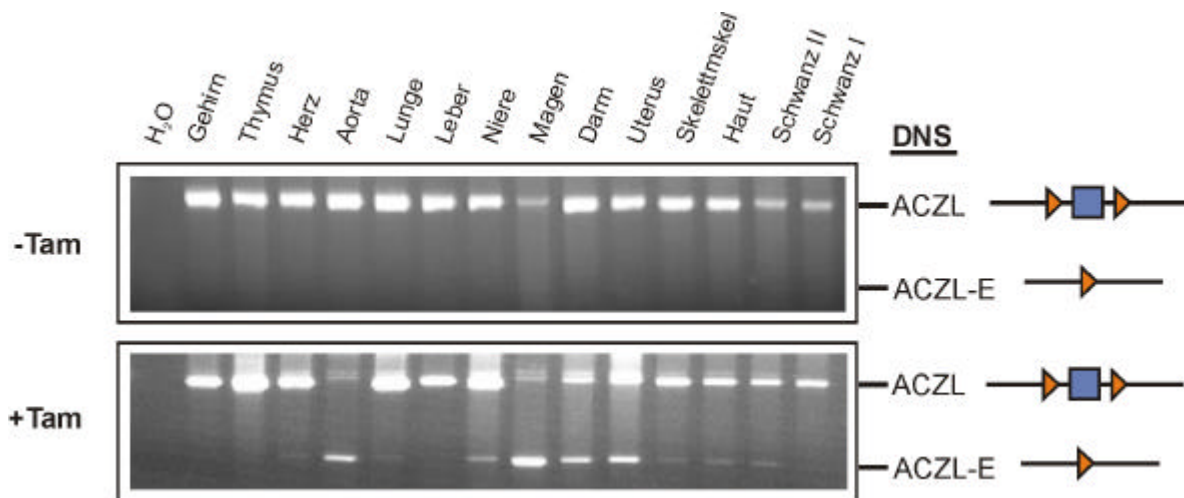


Abb. C-15. PCR Analyse der Rekombination in SM-KI Mäusen

Nachweis der nicht rekombinierten (ACZL) und rekombinierten (ACZL-E) DNS des ACZL Reportergens in verschiedenen Geweben von doppelt heterozygoten SM-KI/ACZL Mäusen. Die Mäuse wurden wie unter B.3.1 beschrieben 5 Tage mit Vehikel (Tam) oder mit 1 mg Tamoxifen (+Tam) i.p. injiziert. Die DNS von Schwanz I wurde unmittelbar vor der ersten Injektion, die DNS von Schwanz II und der anderen Gewebe 3 Tage nach der letzten Injektion isoliert (B.3.2.1) und mittels PCR (B.1.3) mit den Primern RF81+RF82 (F.1, F.2) amplifiziert.

Die Effektivität und Spezifität der Rekombination in SM-KI/ACZL Mäusen auf zellulärer Ebene wurde durch X-Gal Färbung von Organen untersucht (B.3.5.2). Um die potentielle Expression der β -Galaktosidase in ACZL Reportertermäusen abzuschätzen, wurde die ACZL-E Kontrolllinie generiert. ACZL-E Mäuse enthalten das rekombinierte Reportertransgen in allen Zellen und zeigen deshalb in welchen Organen bzw. in welchem Prozentsatz der Zellen eines Gewebes das rekombinierte ACZL Transgen (ACZL-E) exprimiert werden kann. Um die ACZL-E Linie zu erzeugen, wurden ACZL Mäuse (F.5; Akagi et al., 1997) mit CMV-Cre „deleter“ Mäusen (F.5; Dupé et al., 1997) gekreuzt, so dass durch Cre-vermittelte Excision des ACZL Transgens das ACZL-E Transgen entstand (Abb. A-4, S.6) und in der Keimbahn weitergegeben wurde. Die X-Gal Färbung von Organen der ACZL-E Mäuse zeigte, dass die β -Galaktosidase in vielen Geweben reproduzierbar exprimiert wurde, z.B. im Gehirn, in der Herz- und Skelettmuskulatur sowie in vielen vaskulären und viszeralen glatten Muskelzellen (Abb. C-16A und Daten nicht gezeigt).

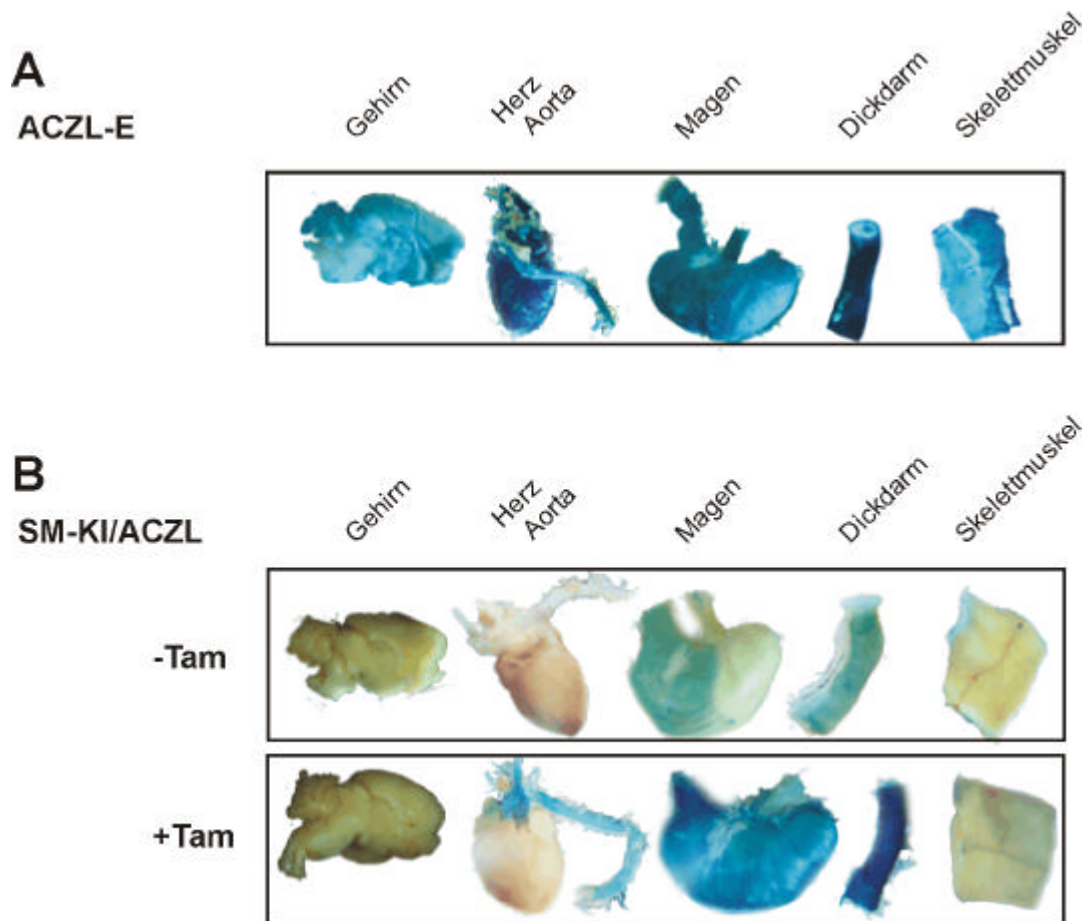


Abb. C-16. Histochemische Analyse der Rekombination in Organen von SM-KI Mäusen

X-Gal Färbung (B.3.5.2) von Organen **(A)** einer heterozygoten ACZL-E Kontrollmaus sowie **(B)** doppelt heterozygoter SM-KI/ACZL Mäuse, die mit Vehikel (-Tam) oder mit 1 mg Tamoxifen (+Tam) behandelt worden waren (B.3.1). Weitere Erklärung im Text.

Organe von SM-KI/ACZL Mäusen, die mit Vehikel behandelt worden waren, zeigten keine X-Gal Färbung (Abb. C-16B, -Tam). Die grün-blaue Farbe des Magen-Darmtrakts wurde durch endogene β -Galaktosidaseaktivität der Mukosa verursacht. Die glatten Muskelzellen waren nicht gefärbt. Dagegen wurden im Falle von Tamoxifen-behandelten SM-KI/ACZL Mäusen Aorta, Magen und Darm (Abb. C-16B, +Tam), sowie die vaskuläre und viszerale glatte Muskelschicht verschiedener anderer Gefäße und Organe (Daten nicht gezeigt) blau gefärbt. Im Gehirn, Herz- und Skelettmuskel (Abb. C-16B, +Tam) sowie in allen anderen untersuchten nicht glattmuskulären Geweben (Daten nicht gezeigt) konnte keine Blaufärbung nachgewiesen werden. Dass das ACZL Reportertransgen nach Rekombination in diesen Organen exprimiert werden kann, zeigte die Blaufärbung der Organe von ACZL-E Kontrollmäusen (Abb. C-16A). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die geringe Expression von CreER^{T2} (Abb. C-14) und die geringe Rekombinationsrate (Abb. C-15, +Tam), die in einigen Organen (z.B. Herz, Niere, Skelettmuskel) detektiert wurde, auf den Anteil an Gefäßen in diesen Organen zurückzuführen war.

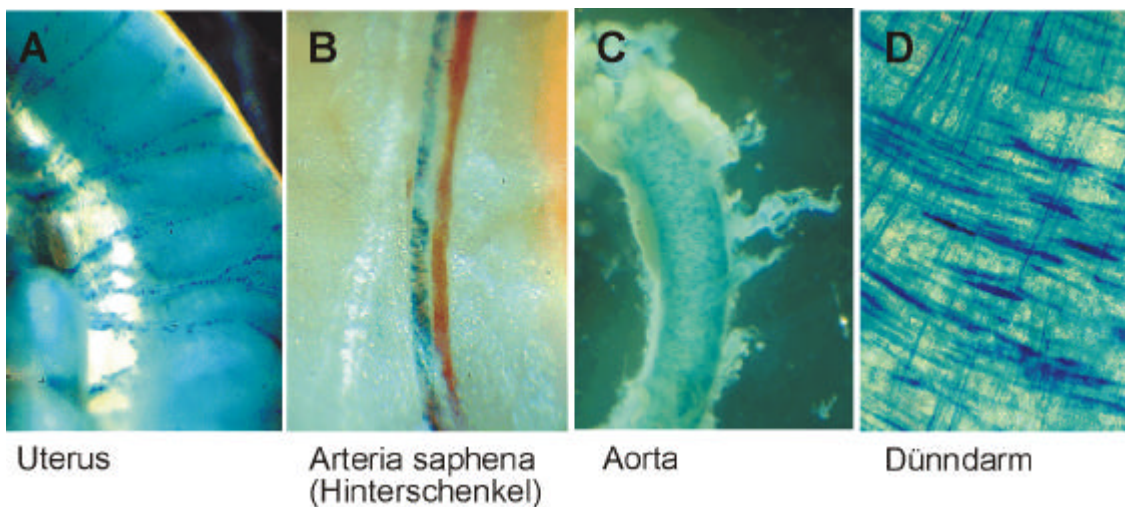


Abb. C-17. Rekombination im vaskulären und viszeralem glatten Muskel von SM-KI Mäusen

Vergrößerungen von X-Gal gefärbten (B.3.5.2) glattmuskulären Geweben doppelt heterozygoter, Tamoxifen-behandelter (B.3.1) SM-KI/ACZL Mäuse. **(A)** Uterus, **(B)** Arteria saphena des Hinterschenkels, **(C)** Aorta, **(D)** glatte Muskelschicht des Dünndarms. Originalvergrößerung x12-x32 **(A-C)** sowie x100 **(D)**

Sowohl die mikroskopische Betrachtung (Abb. C-17) als auch Paraffingewebeschnitte (Abb. C-18) der X-Gal gefärbten Organe von Tamoxifen-behandelten SM-KI/ACZL Mäusen zeigten, dass es sich bei den blau gefärbten Zellen um vaskuläre und viszerale

glatte Muskelzellen handelte. Blaufärbung konnte in den kleinen Gefäßen des Uterus, in der Arteria saphena des Hinterschenkels und in der Aorta (Abb. C-17A-C) sowie in vielen anderen Gefäßen (z.B. Herzkranzgefäße, Hirngefäße; Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden. Die viszerale glatte Muskelschicht des Darms (Abb. C-17D; sowohl die zirkuläre als auch die longitudinale glatte Muskelschicht ist blau), des Magens und der Blase (Daten nicht gezeigt) wurde deutlich mit X-Gal angefärbt.

Um die Gewebeselektivität und Effizienz der Rekombination auf zellulärer Ebene zu bestimmen, wurden Paraffinschnitte der X-Gal gefärbten Organe angefertigt (B.3.5) und analysiert (B.3.6). Gewebeschnitte von Tamoxifen-behandelten SM-KI/ACZL Mäusen wurden mit ähnlichen Schnitten aus ACZL-E Kontrollmäusen verglichen. Letztere dienten als Positivkontrolle für 100% Rekombination (siehe S.59) und zeigten, wieviel Prozent der „rekombinierten“ Zellen einer Population (z.B. glatte Muskelzellschicht des Darms) die β -Galaktosidase überhaupt exprimieren können. Die Auswertung von Schnitten der Aorta von ACZL-E Mäusen ergab, dass nur $65 \pm 6\%$ der glatten Gefäßmuskelzellen blau gefärbt waren (Abb. C-18B), obwohl 100% der Zellen „rekombiniert“ waren. Dieses Ergebnis wies auf eine mosaikartige Expression des rekombinierten ACZL Reportergens in glatten Muskelzellen hin. In Aortaschnitten von SM-KI/ACZL Mäusen waren $19 \pm 2\%$ der glatten Muskelzellen blau gefärbt (Abb. C-18A). Berücksichtigt man, dass in ACZL-E Mäusen nur ca. 65% der „rekombinierten“ Gefäßmuskelzellen blau gefärbt wurden, ergibt sich für die glatten Muskelzellen der Aorta von SM-KI/ACZL Mäusen eine tatsächliche Rekombinationseffizienz von 29% (B.3.6). Scheinbar war die durch den endogenen SM22 Promotor gesteuerte Expression von CreER^{T2} zum Zeitpunkt der Tamoxifenbehandlung in vielen Aortenzellen zu gering um Rekombination zu verursachen. Kleine Gefäße des Uterus von SM-KI/ACZL Mäusen (Abb. C-18C) waren ähnlich stark blau gefärbt wie in ACZL-E Kontrollmäusen (Abb. C-18D), was auf eine relativ hohe Rekombinationsrate in diesem Gefäßtyp hinweist. Aufgrund der geringen Größe der Uterusgefäße konnte die Fraktion gefärbter Einzelzellen und damit die genaue Rekombinationseffizienz hier nicht bestimmt werden. Die X-Gal Färbung der Schnitte von ACZL-E Mäusen (Abb. C-18D) zeigte auch, dass die β -Galaktosidase im glatten Muskel des Uterus der ACZL Reportermaus nicht exprimiert werden kann. In der glatten Muskelschicht des Darms von SM-KI/ACZL und ACZL-E Mäusen wurde eine starke und homogene Blaufärbung nachgewiesen. Der Anteil an X-Gal gefärbten glatten Muskelzellen im Dickdarm (Abb. C-18E-H) war in SM-KI/ACZL Mäusen $46 \pm 4\%$ bzw. in ACZL-E Mäusen $40 \pm 3\%$. Im Dünndarm betragen die Werte $82 \pm 8\%$ bzw. $76 \pm 10\%$. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die Verabreichung von Tamoxifen an SM-KI/ACZL Mäuse in 100% der glatten Muskelzellen des Darmtrakts eine Rekombination auslöste.

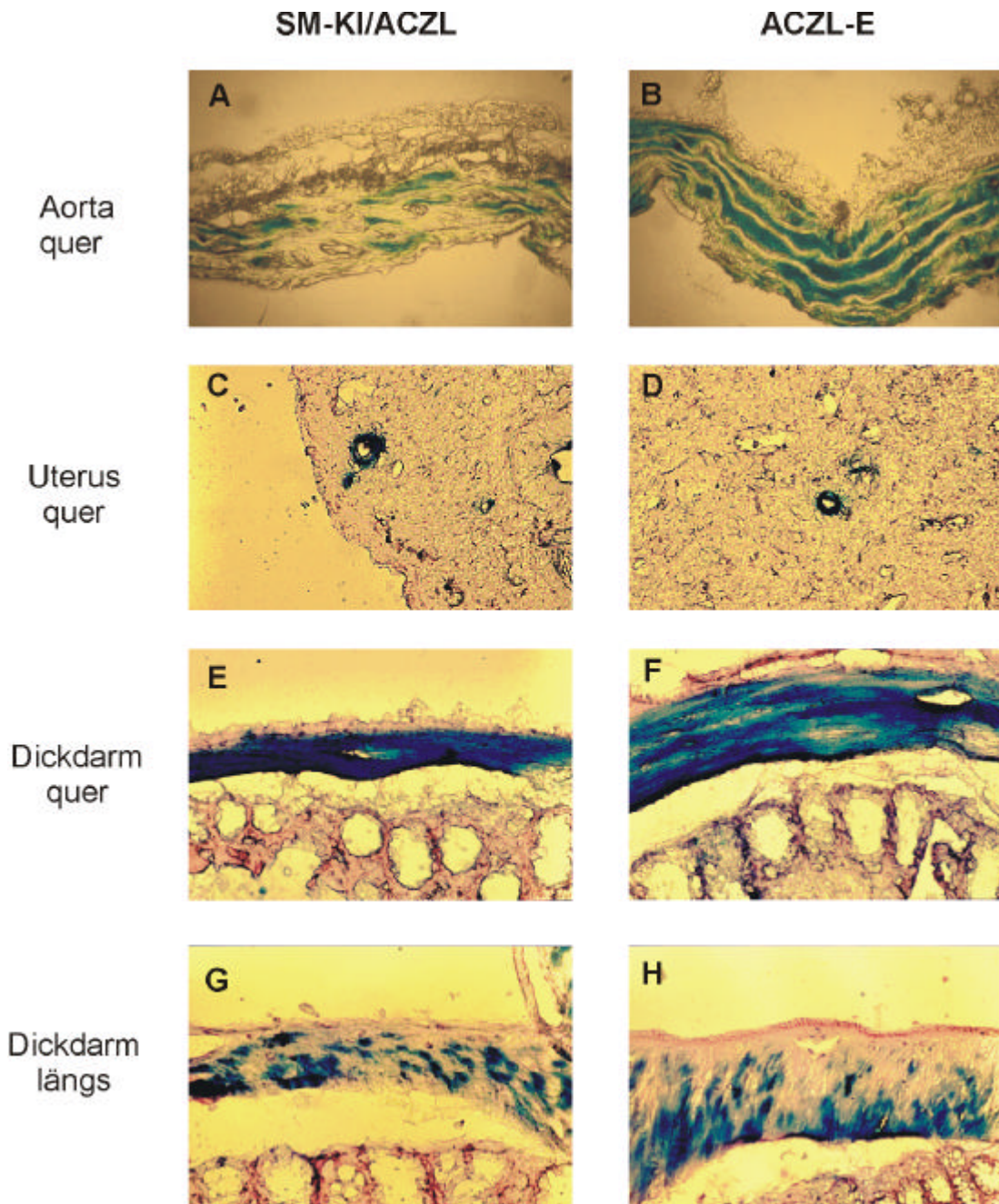


Abb. C-18. Zelluläre Spezifität und Effizienz der Rekombination in SM-KI Mäusen

Paraffingewebeschnitte (B.3.5.3) von X-Gal gefärbten Organen (B.3.5.2) einer doppelt heterozygoten, Tamoxifen-behandelten (B.3.1) SM-KI/ACZL Maus (A, C, E, G) und einer heterozygoten ACZL-E Maus (B, D, F, H). (A, B), Querschnitte durch die Aorta; (C, D), Querschnitte durch den Uterus; (E, F), Querschnitte durch den Dickdarm; (G, H), Längsschnitte durch den Dickdarm. Die Schnitte (8-12 μ m) wurden mit SafraninO gegengefärbt (B.3.5.4). Originalvergrößerung x400.

Die hohe Effizienz der Rekombination in intestinalen glatten Muskelzellen Tamoxifen-behandelter SM-KI Mäuse konnte gut reproduziert werden. Durch i.p. Injektion unterschiedlicher Mengen an Tamoxifen konnte die Effizienz der Rekombination variiert werden, wobei eine Dosis von 0,1 mg bereits ausreichte um in nahezu 100% der Zellen Rekombination auszulösen (Abb. C-19, links; F.4). Bereits 3 Tage nach Tamoxifengabe war die maximale Rekombinationseffizienz erreicht und der hohe Anteil „rekombinierter“ Zellen blieb für mindestens 4 Monate erhalten (Abb. C-19, rechts; F.4). In unbehandelten oder in mit Vehikel behandelten SM-KI Mäusen konnte auch in einem Alter von 9 Monaten keine Rekombination detektiert werden (F.4).

Durch umfangreiche Untersuchungen wurden die Rekombinationseigenschaften von SM-KI Mäusen weiter analysiert. Auch eine i.p. Verabreichung von OHT oder eine perorale (p.o.) Gabe von Tamoxifen bewirkte eine effiziente Rekombination (F.4). Die Effektivität der Tamoxifen-induzierten Rekombination variierte leicht von Tier zu Tier. Der genetische Hintergrund und das Geschlecht sowie das Alter der Mäuse zum Zeitpunkt der Injektion (1-7 Monate) beeinflusste die Rekombinationsrate nicht signifikant. Durch wiederholte Tamoxifengabe (2 Injektionszyklen mit 5x1mg im Abstand von 5 Wochen) konnte die Rekombination in der Aorta leicht verbessert werden (Daten nicht gezeigt).

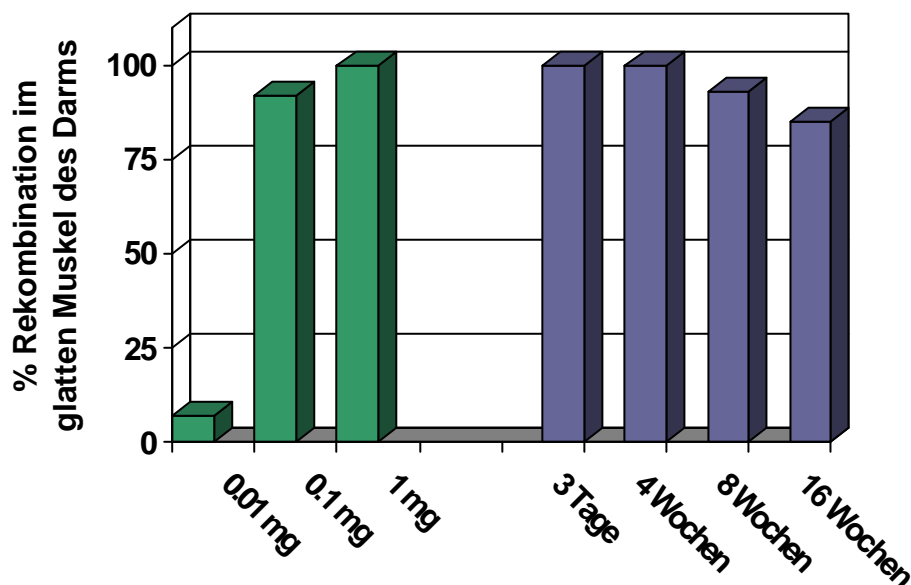


Abb. C-19. Sensitivität und Persistenz der Rekombination in SM-KI Mäusen

Die Rekombinationseffizienz in glatten Muskelzellen des Darms von Tamoxifen-behandelten (B.3.1) heterozygoten SM-KI/ACZL Mäusen wurde an XGal gefärbten Gewebeschnitten (B.3.5.2, B.3.5.3) wie unter B.3.6 beschrieben bestimmt. Grüne Säulen (links) geben die Rekombinationsrate nach i.p. Injektion unterschiedlicher Dosen von Tamoxifen an. Blaue Säulen (rechts) zeigen die Rekombinationsrate zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der i.p. Injektion von 5 x 1 mg Tamoxifen. Die Originaldaten sind im Anhang (F.4) angegeben.

C.2.4. Expression von SM22 in SM-KI Mäusen

Die Expression der SM22-RNS in verschiedenen Geweben heterozygoter (+/-) SM-KI Mäuse wurde durch RT-PCR untersucht (Abb. C-14, S.57). Das glattmuskel-spezifische Expressionsmuster des SM22 Gens wurde durch den Nachweis des SM22 Proteins mittels Western Blot Analyse bestätigt (Abb. C-20 und Daten nicht gezeigt). In Geweben aus homozygoten (-/-) SM-KI Tieren konnte im Gegensatz zu Wildtyp (+/+) Tieren kein SM22 Protein nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass die Integration der CreER^{T2}-neo Kasette in den SM22 Genort (Abb. C-9A, S.52) die korrekte Expression des SM22 Gens verhinderte und damit eine SM22-defiziente Mauslinie (SM-KI -/-) erzeugt werden konnte. Heterozygote (+/-) und homozygote (-/-) SM-KI Mäuse zeigten keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen gegenüber Wildtyp (+/+) Mäusen.

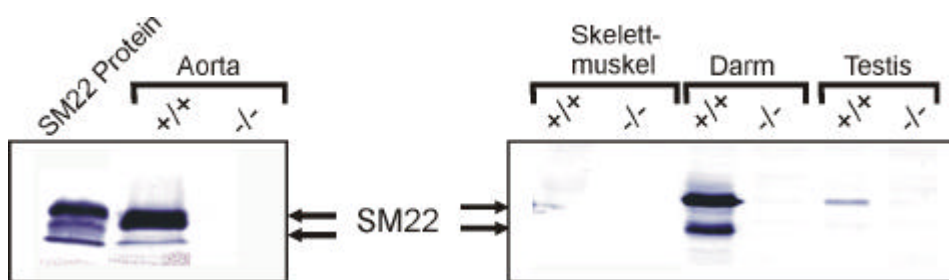


Abb. C-20. Western Blot Analyse der SM22 Expression in SM-KI Mäusen

Aufgetragen wurden 100 ng gereinigtes rekombinantes SM22 Protein (Geschenk von J.V. Small und M. Gimona, Salzburg) und jeweils 50 µg Protein aus Geweben (30 µg aus Aorta) von Wildtyp (+/+) Mäusen sowie von homozygoten (-/-) SM-KI Mäusen. Die Membranen wurden mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen das SM22 Protein (F.3) inkubiert. Die Positionen des SM22 Proteins (potentiell zwei Banden bei 20-30 kDa) sind durch Pfeile angedeutet. Zur Durchführung der Proteinisolierung und des Western Blots siehe B.3.3 und B.3.5.5.

D. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mutagenesesystem etabliert, das eine zeitlich regulierbare *Cre/lox*-vermittelte Rekombination selektiv im glatten Muskel der Maus ermöglicht. Dazu wurden unter Verwendung unterschiedlicher Expressionsstrategien und Promotoren mehrere transgene Mauslinien hergestellt, die eine Tamoxifen-aktivierbare Cre Rekombinase (CreER^T oder CreER^{T2} ; A.2) spezifisch in glatten Muskelzellen exprimieren sollten. Die Expressions- und Rekombinationseigenschaften der erzeugten Mauslinien wurden eingehend untersucht und verglichen. Eine Auflistung der verwendeten transgenen Mauslinien und deren Eigenschaften ist dem Anhang (F.5) zu entnehmen.

D.1. Expression von CreER^T unter der Kontrolle des cGKI Promotors

Ein Ansatz zur Expression der Tamoxifen-aktivierbaren CreER^T Rekombinase (A.2; Abb. A-3, S.5) in glatten Muskelzellen war der Knock-in in den cGKI Genort über homologe Rekombination in ES Zellen. Da der cGKI Promotor, d.h. die DNS Region, welche die cGKI Expression steuert, noch nicht identifiziert ist, konnte hier nicht mit einem klassischen, zufällig integrierten Transgen gearbeitet werden. Durch den Knock-in sollte CreER^T unter der Kontrolle des endogenen cGKI Promotors und somit in allen cGKI positiven Zellen exprimiert werden. Diese Strategie erschien sinnvoll, weil das cGKI Gen einerseits stark im glatten Muskel exprimiert wird (Keilbach et al., 1992) und andererseits später selbst konditional inaktiviert werden sollte. Das cGKI Gen besitzt zwei alternative 5' terminale Exons ($I\alpha$ und $I\beta$, Wernet et al., 1989) mit jeweils einem Translationsstartcodon. Es ist nicht bekannt, ob im glatten Muskel eines der beiden RNS „Spliceprodukte“ präferentiell exprimiert wird. Deshalb wurde CreER^T nicht direkt an ein ATG-Startcodon sondern an ein internes Exon (Exon 10) des cGKI Gens fusioniert. Um dennoch eine korrekte Translation der CreER^T Rekombinase zu erreichen, wurde ihr eine IRES Sequenz vorangestellt, die in Säugerzellen eine „cap“-unabhängige Translation interner ATG-Startcodons ermöglicht (C.1.1).

In der GK-KI Knock-in Mauslinie wurde CreER^T nur in sehr geringen Mengen exprimiert und verursachte keine nachweisbare Rekombination nach Tamoxifengabe (C.1.2). Eine Ursache für die geringe Expression der Rekombinase war sog. „exon skipping“, d.h. das modifizierte Exon 10 wurde mitsamt der integrierten IRES- CreER^T -neo Kasette aus der RNS „herausgespliced“ (Abb. C-3B, S.44), obwohl die native „Splice“ Akzeptorstelle des Exon 10 vorhanden war. Möglicherweise behindert die Fusion fremder DNS an ein internes

Exon das korrekte „Splicen“ der RNS eher als die direkte Fusion an ein ATG-Startcodon (siehe auch D.2).

Andererseits führte die Modifikation des Exon 10 zur Inaktivierung des cGKI Gens (C.1.3). Die offensichtlich gestörte Relaxation glattmuskulärer Organe und die geringe Lebenserwartung homozygoter (-/-) GK-KI Tiere bestätigt den Phänotyp einer anderen cGKI Mausnullmutante, die durch Integration einer neo Kasette in Exon 10 hergestellt wurde (Pfeifer et al., 1998). Die Auswertung der Genotypen von Nachkommen aus der Verkreuzung heterozygoter (+/-) GK-KI Eltern weist darauf hin, dass die cGKI möglicherweise schon während der späten Embryonalentwicklung und/oder frühen postnatalen Entwicklung (zwischen Tag 13 p.c. und Tag 10-14 p.p.) eine essentielle Funktion in der Maus hat (Abb. C-6, S.47). cGKI-defiziente GK-KI Mäuse werden derzeit für verschiedene Untersuchungen zur weiteren Aufklärung von physiologischen Funktionen der cGKI verwendet.

D.2. Expression von CreER^{T2} unter der Kontrolle des SM22 Promotors

Alternativ zum Knock-in in den cGKI Genort (D.1) wurden transgene Mäuse hergestellt, welche die CreER^{T2} Rekombinase (A.2; Abb. A-3, S.5) unter der Kontrolle des SM22 Promotors exprimieren sollten. Das SM22 Gen codiert für ein Protein mit unbekannter Funktion, das als Marker für glatte Muskelzellen gilt. SM22 wird in adulten Mäusen selektiv in vaskulären und viszeralen glatten Muskelzellen exprimiert (Solway et al., 1995; Li et al., 1996a). Es wurde bereits gezeigt, dass die Promotorregion des SM22 Gens zur glattmuskel-spezifischen Expression eines zufällig integrierten *lacZ* Transgens verwendet werden kann (Li et al., 1996b; Moessler et al., 1996). Daher erschien der SM22 Promotor gut geeignet um eine Tamoxifen-aktivierbare Cre Rekombinase selektiv im glatten Muskel zu exprimieren. Im Gegensatz zur Strategie beim cGKI Knock-in (D.1) wurde diesmal die CreER^{T2} Rekombinase verwendet und diese direkt an das ATG-Startcodon des SM22 Gens fusioniert (C.2.1). Verglichen mit CreER^T besitzt CreER^{T2} in kultivierten Säugerzellen eine etwa 5-fach höhere Tamoxifensensitivität (Feil et al., 1997). Die Herstellung transgener CreER^{T2} Mäuse sollte erstmals eine Untersuchung der Funktionsfähigkeit dieser Rekombinase *in vivo* ermöglichen. Um die Expression von CreER^{T2} unter die Kontrolle des SM22 Promotors zu stellen, wurden zwei verschiedene genetische Methoden angewendet; zum einen die zufällige Integration eines klassischen Transgens in das Mausgenom (SM-TG Mauslinien) und zum anderen der Knock-in in das endogene SM22 Gen über homologe Rekombination in ES Zellen (SM-KI Mauslinie) (C.2.1).

D.2.1. Vergleichende Analyse von SM-TG und SM-KI Mäusen

Sowohl das in SM-TG Mäusen zufällig integrierte CreER^{T2} Transgen als auch das in SM-KI Mäusen in den SM22 Genort eingebaute CreER^{T2} Transgen wurde selektiv in glatten Muskelzellen exprimiert. Die Expression und die Tamoxifen-induzierte Rekombination waren jedoch in glatten Muskelzellen von SM-TG Mäusen signifikant geringer als in SM-KI Mäusen (C.2.2). Um auszuschließen, dass die geringe Expression von CreER^{T2} in SM-TG Mäusen durch mehrmalige Integration des Transgens und damit verbundenem „repeat-induced gene silencing“ bedingt war (Garrick et al., 1998), wurde eine SM-TG „Excisions“ Mauslinie (SM-TG-E) hergestellt. Obwohl die Anzahl der integrierten Transgeneinheiten in SM-TG-E Mäusen bis auf eine Einheit reduziert war, konnte dadurch die Effizienz der Rekombination nicht verbessert werden (C.2.2). Da die SM-TG Linie auch ein co-integriertes *lacZ* Rekombinations-Reportertransgen enthält (Abb. C-8B, S.49), kann man diese Linie nutzen, um die Rekombinationseigenschaften transgener Cre Mäuse auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Die X-Gal Färbung von Organen aus SM-TG und SM-TG-E Mäusen ergab, dass das Reportertransgen [LacZ(LNL)] nach Cre-vermittelter Rekombination in einigen Geweben exprimiert wird, die von der ACZL Reportermaus nicht erfasst werden wie Pankreas, Darmepithel und Niere (C.2.2).

Trotz der geringen Expression und Rekombinationsrate in SM-TG Mäusen war der zufällig integrierte SM22 Promotor (Abb. C-8A, S.49) eindeutig im vaskulären als auch im viszeralen glatten Muskel aktiv (Abb. C-11, S.54). Dieser Befund war überraschend, da ein *lacZ* Transgen unter der Kontrolle von ähnlichen SM22 Promotorfragmenten lediglich im arteriellen Gefäßmuskel, nicht aber in viszeralen glatten Muskelzellen exprimiert wurde (Li et al., 1996b; Moessler et al., 1996). Andererseits wurde die Expression eines vergleichbaren adenoviralen SM22-*lacZ* Transgens im vaskulären und im viszeralen glatten Muskel detektiert (Kim et al., 1997). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivität des SM22 Promotors in verschiedenen Typen von glatten Muskelzellen einer komplexen Regulation unterliegt und möglicherweise stark vom Integrationsort des Transgens abhängt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Transgen, die CreER^{T2} Rekombinase, unter der Kontrolle des endogenen SM22 Promotors exprimiert (SM-KI Mäuse) und dessen Expression mit einem zufällig integrierten Transgen (SM-TG Mäuse) verglichen. Diese Analyse zeigte, dass eine Kopie des in den endogenen SM22 Genort integrierten CreER^{T2} Transgens weitaus stärker und/oder homogener im glatten Muskel exprimiert wird als das in hoher oder niedriger Kopienzahl zufällig integrierte Transgen (C.2.2). Für zukünftige Ansätze zur glattmuskel-spezifischen Expression von Transgenen wäre deshalb der Knock-in in den SM22 Genort der klassischen Transgenese vorzuziehen.

Der immuncytochemische Nachweis der CreER^{T2} Rekombinase in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen von SM-KI Mäusen zeigte nicht nur, dass die Rekombinase in diesen Zellen stark exprimiert wird, sondern gab auch wichtige Hinweise auf die Funktionsweise Liganden-aktivierbarer Cre Rekombinasen. Die Rekombinase war vor Tamoxifenbehandlung im Zytoplasma der Zellen und nach Tamoxifenbehandlung im Zellkern lokalisiert (Abb. C-12B, S.55). Demnach könnte man folgendes Modell für die Aktivierung von CreER Rekombinasen durch Tamoxifen postulieren (Abb. D-1): Die Rekombinase wird zunächst, u.U. durch Interaktion mit „heat-shock“ Proteinen (Picard et al., 1994), im Zytoplasma zurückgehalten. Die Bindung von Tamoxifen an die LBD führt zur Dissoziation des Proteinkomplexes und erlaubt damit die Translokation der Rekombinase in den Zellkern, wo sie ihr *loxP* Substrat umsetzen kann.

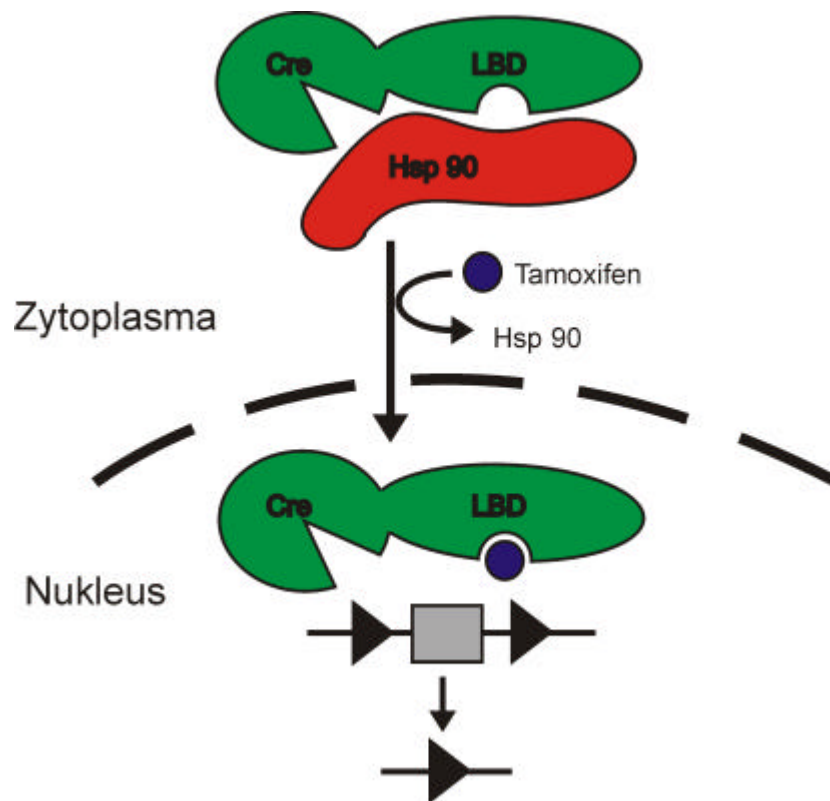


Abb. D-1. Modell der Aktivierung von CreER Rekombinasen durch Tamoxifen

Das CreER Fusionsprotein (CreLBD) wird zunächst durch Bindung eines „heat-shock“ Proteins (Hsp 90) im Zytoplasma zurückgehalten. Die Anlagerung von Tamoxifen an die Ligandenbindungsdomäne (LBD) der Rekombinase führt zur Dissoziation des Proteinkomplexes. Die „freigesetzte“ Rekombinase kann nun in den Zellkern gelangen, wo sie ihr DNS-Substrat, die *loxP* Sequenzen (Dreiecke) umsetzen kann.

D.2.2. Gewebeselektivität und Effizienz der Rekombination in SM-KI Mäusen

Die ausführliche Charakterisierung der SM-KI Mäuse (C.2.3) zeigte, dass das Expressionsmuster der CreER^{T2} Rekombinase gut mit dem des endogenen SM22 Gens übereinstimmt und dass durch die kurzzeitige Behandlung der Mäuse mit Tamoxifen (i.p. Injektion von bis zu 1 mg Tamoxifen täglich für 5 Tage) reproduzierbar eine Rekombination in glatten Muskelzellen induziert werden kann. Dabei korrelierte die Gewebeselektivität der Rekombination gut mit dem Expressionsprofil von CreER^{T2}. In unbehandelten SM-KI/ACZL Mäusen konnte keine Hintergrund-Rekombination detektiert werden. Dagegen wurde nach Verabreichung von Tamoxifen an die Mäuse sowohl durch PCR Analyse der DNS (Abb. C-15, S.58) als auch durch X-Gal Färbung der Gewebe (Abb. C-16, S.59; Abb. C-17, S.60; Abb. C-18, S.62) eine effektive Rekombination des ACZL Reporter gens in Organen mit einem hohen Anteil an glatten Muskelzellen nachgewiesen. Die histologische Analyse der X-Gal Färbungen ergab, dass Tamoxifen die Rekombination in den glatten Muskelzellen der Aorta und verschiedener anderer größerer und kleinerer Gefäße sowie im glatten Muskel des Magen-Darm- und Urogenital-Trakts induzierte, nicht aber im Herzmuskel, Skelettmuskel und allen anderen untersuchten nicht glattmuskulären Geweben. In einigen nicht glattmuskulären Organen wurde durch RT-PCR Analyse eine niedrige Expression von CreER^{T2} (Abb. C-14, S.57) und durch PCR Analyse eine sehr geringe Rekombination nach Tamoxifengabe (Abb. C-15 +Tam, S.58) detektiert. Diese Befunde sind angesichts der negativen X-Gal Färbung dieser Organe (siehe oben) sowie der gut dokumentierten glattmuskel-spezifischen Expression des SM22 Gens (Solway et al., 1995, Li et al., 1996a) höchstwahrscheinlich auf den Anteil von Gefäßen in den untersuchten Gewebeproben zurückzuführen. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Rekombination in SM-KI Mäusen durch Tamoxifen induzierbar ist und selektiv im vaskulären und viszeralen glatten Muskel stattfindet. Da das rekombinierte ACZL Reportertransgen zwar in vielen aber nicht in allen Geweben und glatten Muskeltypen exprimiert wird (C.2.3), könnte man durch die Verwendung anderer Reportermauslinien (Lobe et al., 1999; Mao et al., 1999; Soriano, 1999) das glattmuskel-selektive Rekombinationsmuster der SM-KI Mauslinie bestätigen und bezüglich der Spezifität für verschiedene Typen von glatten Muskelzellen (z.B. arteriell, arteriolär, venös) weiter aufklären.

Durch den Vergleich der Fraktion X-Gal gefärbter Zellen auf Gewebeschnitten von SM-KI Mäusen und ACZL-E Kontrollmäusen wurde die Effizienz der Rekombination in SM-KI Mäusen bestimmt (B.3.6; Abb. C-18, S.62). Nach Tamoxifenbehandlung waren etwa 29% der glatten Muskelzellen in der Aorta und etwa 100% der glatten Muskelzellen im Darm „rekombiniert“. Dosis-Wirkungs-Versuche zeigten, dass die Rekombinationsrate durch Variation der Tamoxifendosis reguliert werden kann und dass bereits mit einer relativ geringen Dosis von 0,1 mg Tamoxifen die maximale Effizienz erreicht wird (Abb. C-19

links, S.63; F.4). Eine effektive Rekombination konnte sowohl durch intraperitoneale (i.p.) als auch perorale Gabe von Tamoxifen oder durch i.p. Injektion von OHT ausgelöst werden (F.4). Ähnliche Befunde wurden von Indra und Kollegen beschrieben, die CreER^{T2} selektiv in Keratinozyten exprimierten (Indra et al., 1999). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die CreER^{T2} Rekombinase *in vivo* durch etwa 10-fach geringere Dosen von Tamoxifen (0,1 mg) aktiviert werden kann als CreER^T, wodurch potentielle Nebenwirkungen der Tamoxifenbehandlung limitiert werden sollten. In der hier vorgelegten Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass in SM-KI Mäusen die maximale Rekombinationseffizienz bereits 3 Tage nach Tamoxifenbehandlung erreicht wird und der hohe Anteil „rekombinierter“ glatter Muskelzellen mindestens vier Monate erhalten bleibt (Abb. C-19 rechts, S.63; F.4). Eine lange Persistenz der Rekombination ist überaus wichtig wenn man gefloxe Zielgene mit Hilfe einer Liganden-aktivierbaren Cre Rekombinase ausschalten will. Man nimmt an, dass „rekombinierte“ Zellen nur während der kurzzeitigen Gabe des Liganden (z.B. Tamoxifen) entstehen. Ein Effekt der Rekombination bzw. Gendeletion ist aber erst zu erwarten, nachdem die mRNS sowie das entsprechende Protein abgebaut wurden. Erfolgt die Rekombination nicht oder nur teilweise in den Stammzellen des Gewebes, so werden die „rekombinierten“ Zellen durch nachwachsende Wildtyp Zellen erneuert, bevor der Phänotyp der Gendeletion ausgeprägt ist. Dieses Problem wird in einem rasch proliferierenden Gewebe wie der Haut besonders deutlich (Brocard et al., 1997).

D.2.3. Vergleich von SM-KI Mäusen mit konventionellen „glattmuskel-spezifischen“ Cre Mäusen

Mittlerweile wurden von anderen Arbeitsgruppen transgene Cre Mauslinien hergestellt, welche die „normale“, d.h. konstitutiv aktive Cre Rekombinase unter der Kontrolle des „smooth muscle myosin heavy chain“ (SMMHC) Promotors (Regan et al., 2000) oder des SM22 Promotors (M. Gotthardt, J. Herz, Dallas; persönliche Mitteilung) exprimieren. Im Gegensatz zu SM-KI Mäusen wurde in adulten SMMHC-Cre und SM22-Cre Mäusen Rekombination nicht nur in glatten Muskelzellen, sondern auch in Herzmuskelzellen festgestellt. Die unerwünschte ektopische Rekombination im Herzen dieser konventionellen Cre Mäuse ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass die zur Cre Expression verwendeten Promotoren während der Embryonalentwicklung transient im Herzen aktiv sind (Madsen et al., 1998; Franz et al., 1999; Li et al., 1996a). Die kurzzeitige Cre Aktivität führt zu rekombinierter DNS, die an alle Tochterzellen weitergegeben wird und deshalb auch im adulten Herzen vorhanden ist, obwohl Cre im Herzen adulter Tiere nicht mehr exprimiert wird (Abb. D-2A). Da noch kein „glattmuskel-spezifischer“ Promotor bekannt ist, der während der Embryogenese nicht auch im Herz-, und/oder Skelettmuskel aktiv ist, kann man das Problem der ektopischen Rekombination in „glattmuskel-spezifischen“ Cre

Mäusen nur durch die Verwendung einer Liganden-aktivierbaren Cre Rekombinase umgehen. In dieser Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass weder im Herzmuskel noch im Skelettmuskel adulter Tamoxifen-behandelter SM-KI Mäuse Rekombination stattfindet (Abb. C-16B, S.59). Da die CreER^{T2} Rekombinase in Abwesenheit von Tamoxifen inaktiv ist, wird während ihrer Expression im embryonalen Herzen keine Rekombination ausgelöst (Abb. D-2B). Dass CreER^{T2} im Herzen von SM-KI Embryos exprimiert wird, wurde durch Behandlung schwangerer Mäuse mit Tamoxifen gezeigt. Tatsächlich konnten in den Nachkommen „rekombinierte“ Herzmuskelzellen nachgewiesen werden (S.K., F. Hofmann, R. Feil; unveröffentlichte Daten). Dies zeigt auch, dass SM-KI Mäuse zur zeitlich kontrollierten Mutagenese von Embryonen *in utero* verwendet werden können.

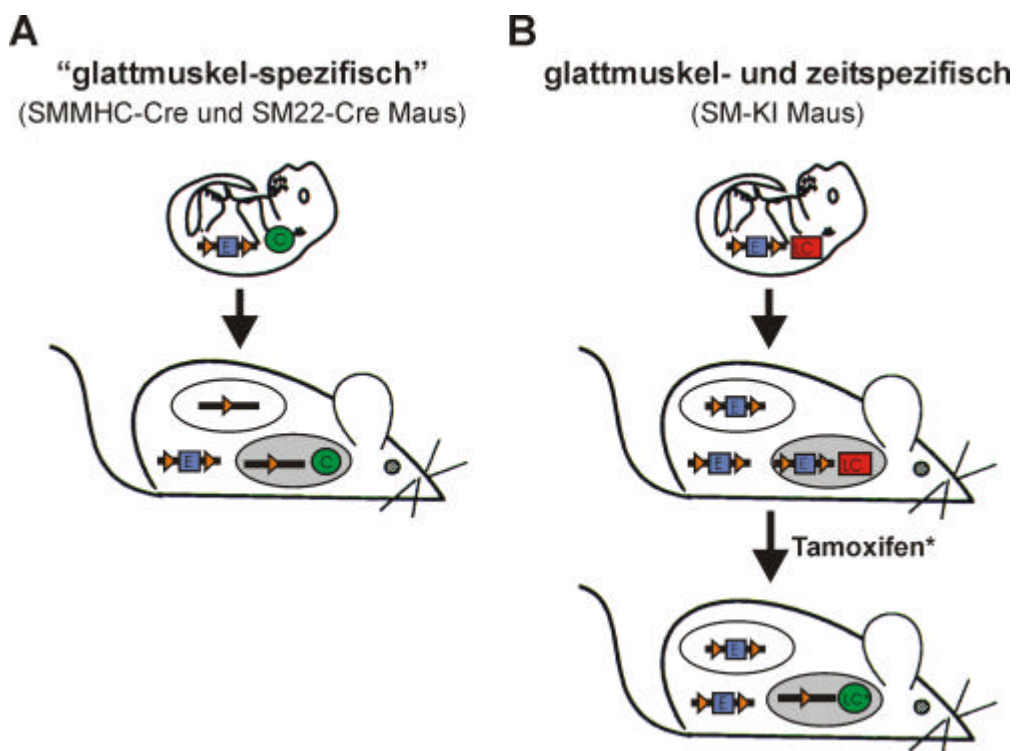


Abb. D-2. Konditionale Mutagenese im glatten Muskel der Maus

(A) Konventionelle „glattmuskel-spezifische“ Cre Mäuse exprimieren Cre (C im grünen Kreis) während der Embryogenese auch transient im Herzmuskel. Demnach ist in adulten Tieren die Excision eines *loxP*-flankierten (Dreiecke) Exons (E) nicht nur im glatten Muskel (graues Oval), sondern auch im Herz (weißes Oval) nachweisbar. (B) SM-KI Mäuse erlauben eine zeitlich kontrollierbare Gendelektion selektiv im glatten Muskel adulter Tiere. Die Liganden-aktivierbare CreER^{T2} Rekombinase ist zunächst inaktiv (LC im roten Quadrat), so dass trotz ihrer Expression während der Entwicklung (z.B. im Herz) und im adulten Tier keine Rekombination ausgelöst wird. Die Rekombinase wird erst durch Behandlung der Maus mit Tamoxifen (*) aktiviert (LC* im grünen Kreis). Da CreER^{T2} im adulten Tier nur im glatten Muskel exprimiert wird, findet die Gendelektion selektiv im glatten Muskel (graues Oval), nicht aber im Herzmuskel (weißes Oval) statt. Im Gegensatz zu konventionellen Cre Mäusen, in denen Cre kontinuierlich aktiv ist (A), kommt es in SM-KI Mäusen nur in denjenigen Zellen zur Rekombination, die CreER^{T2} zum Zeitpunkt der Tamoxifengabe exprimieren (B).

Die zeitliche Regulierbarkeit der Rekombination in SM-KI Mäusen hat wichtige Vorteile gegenüber konventionellen gewebespezifischen Cre Mäusen, insbesondere wenn man gefloxe Zielgene ausschalten will. Viele transgene Cre Mäuse exprimieren Cre bereits während der Embryogenese, so dass es bereits früh zur Geninaktivierung kommt, und zwar je nach Expressionsmuster von Cre im gewünschten und/oder ungewünschten Gewebe (siehe oben). Dies kann zur prä- oder perinatalen Letalität oder zur Kompensation der Genfunktion durch die Hochregulation anderer Gene im adulten Tier führen. Die Interpretation des Phänotyps solcher gewebespezifischer Knockout Mäuse wird auch dadurch erschwert, dass die zum Zeitpunkt der Analyse „rekombinierten“ Zellen eine Summierung der zeitlich-räumlichen Cre Aktivität über den gesamten Lebenszeitraum des Tieres darstellen; d.h. es ist *a priori* unbekannt „wann und wo“ das Zielgen in jeder Zelle ausgeschaltet worden ist. Dagegen kann man mit Hilfe Liganden-aktivierbarer Cre Rekombinasen das zeitlich-räumliche Fenster, in dem das Gen ausgeschaltet wird, relativ exakt durch den Zeitpunkt der Gabe des Liganden (z.B. Tamoxifen) festlegen.

Der Preis für diese Kontrollmöglichkeit ist u.U. eine im Vergleich zu konventionellen Cre Mäusen geringere Rekombinationseffizienz, da die Rekombination nur während des kurzen Zeitraums der Ligandengabe stattfinden kann. Möglicherweise ist die relativ geringe Rekombinationsrate in der Aorta von SM-KI Mäusen (ca. 29%) darauf zurückzuführen, dass die Expression von CreER^{T2} zum Zeitpunkt der Tamoxifeninjektion in den meisten Gefäßmuskeln zu schwach war um eine Rekombination auszulösen. Es ist von verschiedenen Genen bekannt, dass sie im Gefäßmuskel heterogen exprimiert werden (Bochaton-Piallat et al., 1998). Dies könnte auch für das SM22 Gen gelten, in das die CreER^{T2} Rekombinase integriert wurde.

Auch wenn die Rekombination in der Aorta adulter SM22-Cre Mäuse nicht genau quantifiziert wurde (M. Gotthardt, J. Herz, Dallas; persönliche Mitteilung), so erscheint die Rekombinationsrate in dieser Linie höher als in der Aorta von SM-KI Mäusen. Dies widerspricht nicht der Hypothese von einer heterogenen Expression des SM22 Promotors, da sich die Rekombinationseffizienz in SM22-Cre Mäusen aus der über die gesamte Lebenszeit der Tiere integrierten Expression von Cre ergibt (siehe oben). Vielmehr weisen diese Ergebnisse auf eine stochastische Aktivität des SM22 Promotors im Gefäßmuskel hin, d.h. der Promotor ist zu jedem beliebigen Zeitpunkt nur in einer kleinen Fraktion der Zellen, über einen längeren Zeitraum gesehen aber statistisch in fast allen Zellen aktiv. Diese These wird durch den Befund unterstützt, dass sich die Rekombination in der Aorta von SM-KI Mäusen durch mehrmalige Tamoxifeninjektion im Abstand von einigen Wochen verbessern lässt (C.2.3). Ob man die Rekombinationsrate im Gefäß durch die lokale Applikation von Tamoxifen erhöhen kann, muss noch untersucht werden. Momentan ist davon auszugehen, dass man mit Hilfe der SM-KI Maus in bis zu 100% der viszeralen

glatten Muskelzellen (z.B. im Darm) genetische Modifikationen induzieren kann, während man in vaskulären glatten Muskelzellen (z.B. in der Aorta) ein mosaik Rekombinationsmuster erhält. Mosaik-Mutanten könnten sich aber gut dafür eignen, die pathophysiologischen Eigenschaften von sporadisch auftretenden Krankheiten wie etwa Krebs und Atherosklerose zu simulieren.

D.2.4. Vergleich von SM-KI Mäusen mit anderen Liganden-aktivierbaren Cre Mäusen

Vor etwa 4 Jahren wurde erstmals gezeigt, dass Liganden-aktivierbare Cre Rekombinasen zur zeitlich kontrollierbaren somatischen Mutagenese in der Maus verwendet werden können (Feil et al., 1996). Inzwischen wurden mehrere transgene Mauslinien beschrieben, welche eine Tamoxifen-aktivierbare CreER^T oder eine CreER^T ähnliche Rekombinase spezifisch in B-Zellen (Schwenk et al., 1998), Keratinozyten (Vasioukhin et al., 1999; Indra et al., 1999) oder Hepatozyten (Imai et al., 2000) exprimieren. Eine RU486-aktivierte Cre Rekombinase wurde im Gehirn (Kellendonk et al., 1999; Tsuijta et al., 1999) und in der Haut (Berton et al., 2000) transgener Mäuse exprimiert. Diese Studien bestätigten die Eignung von Liganden-aktivierbaren Cre Rekombinasen zur konditionalen Mutagenese in der Maus, zeigten aber auch, dass die Methode bezüglich der Ligandensensitivität und Rekombinationseffizienz noch verbesserungswürdig ist. Zum einen mussten die Mäuse zur Auslösung der Rekombination mit hohen Dosen (Milligramm Mengen) von Tamoxifen oder RU486 behandelt werden, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führen könnte. Zum anderen konnte selbst durch die maximale Ligandendosis keine komplette Rekombination in einer ausgesuchten Zellpopulation erreicht werden, wahrscheinlich weil die Rekombinase zu schwach und/oder mosaik exprimiert wurde. Interessanterweise wurden alle diese Mauslinien durch Vorkerninjektion befruchteter Oozyten und anschließende zufällige Integration des Rekombinase Transgens in das Genom hergestellt. Es ist bekannt, dass diese Methode häufig zu einer variablen und heterogenen Expression des Transgens führt (Dobie et al., 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein gewebe- und zeitspezifisches Rekombinationssystem für den glatten Muskel etabliert und untersucht, ob sich dazu der gezielte Knock-in oder die zufällige Integration des Rekombinase Transgens besser eignet. Die Ergebnisse zeigen klar, dass die Expression von CreER^{T2} unter der Kontrolle des SM22 Promotors nach Knock-in stärker und/oder homogener ist als nach zufälliger Integration des Transgens und dementsprechend zu einer höheren Rekombinationseffizienz führt (C.2.2; F.4). Weiterhin erwies sich die CreER^{T2} Rekombinase in ihrer Tamoxifensensitivität der „klassischen“ CreER^T Rekombinase überlegen (C.2.3; F.4). Zur Herstellung

gewebespezifischer, Tamoxifen-induzierbarer Cre Mäuse sollte demnach ein Knock-in der CreER^{T2} Rekombinase als Alternative zur Oozyteninjektion des CreER^T Transgens in Betracht gezogen werden. Ein Vorteil von Knock-in Mäusen wie der SM-KI Linie gegenüber klassischen transgenen Mäusen ist, dass man erstere leicht auf dem gleichen genetischen Hintergrund züchten kann wie die Mauslinien mit geflochten Zielgenen. Sowohl Knock-in als auch geflochte Mäuse werden durch homologe Rekombination in ES Zellen aus 129/Sv Mäusen erzeugt, während klassische transgene Mäuse meist durch Injektion von Oozyten aus Mäusen anderer Stämme etabliert werden. Somit bleibt der reine genetische Hintergrund auch nach Verkreuzung einer Knock-in Cre Maus mit einer geflochten Maus erhalten, was die Analyse des Phänotyps konditionaler Mausmutanten erleichtert.

D.3. Zukunftsperspektive

Mit Hilfe der SM-KI Mauslinie kann man zeitlich kontrolliert somatische Mutationen selektiv im glatten Muskel erzeugen. Durch kurzzeitige Behandlung der Mäuse mit einer relativ geringen Dosis von Tamoxifen (täglich 0,1 mg für 5 Tage) lassen sich in bis zu 100% der glatten Muskelzellen vorbestimmte genetische Modifikationen induzieren, die über mehrere Monate und möglicherweise auch länger anhalten. Aufgrund dieser Eigenschaften sollte sich die SM-KI Mauslinie gut eignen, um geflochte Zielgene zu definierten Zeitpunkten während der prä- und postnatalen Entwicklung selektiv im glatten Muskel auszuschalten. Dadurch könnte die glattemuskelspezifische Funktion verschiedener Gene aufgeklärt werden, deren „chronische“ Deletion zu embryonaler Letalität (z.B. α_{1C} Kalziumkanal, Seisenberger et al., 2000) oder zu einer stark reduzierten Lebenserwartung (z.B. cGKI, Pfeifer et al., 1998) führt. Erste Versuche mit geflochten cGKI Mäusen weisen darauf hin, dass das cGKI Gen nach Tamoxifeninjektion selektiv und effektiv im glatten Muskel inaktiviert wird (W. Wolfgruber, S.K., R. Feil, F. Hofmann; unveröffentlichte Daten). Die SM-KI Maus sollte auch entscheidend zur Aufklärung der Funktion des α_{1C} Kalziumkanalgens im glatten Muskel beitragen. Es ist anzunehmen, dass die Verkreuzung gefloxter α_{1C} Mäuse mit konventionellen „glattemuskelspezifischen“ Cre Mäusen (z.B. SMMHC-Cre, SM22-Cre) auch zur Gendelektion im embryonalen Herzen führt (D.2.3), so dass diese Mausmutanten möglicherweise nicht lebensfähig sind (Seisenberger et al., 2000). Dass man durch Tamoxifen-induzierbare Mutagenese die Funktion „echter“ Gene untersuchen kann, wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe um Pierre Chambon erstmals demonstriert (Li et al., 2000).

Die Anwendungsmöglichkeiten der SM-KI Maus beschränken sich aber nicht nur auf die konditionale Inaktivierung von Genen. Prinzipiell können mit dieser Mauslinie alle Genommodifikationen, die das *Cre/lox* Rekombinationssystem erlaubt, im glatten Muskel induziert werden, wie die Inversion, Excision/Integration und Translokation von DNS (Abb. A-1, S.2; Übersicht: Metzger & Feil, 1999).

Eine interessante Anwendung der SM-KI Maus wäre das sog. „cell fate mapping“ (Zinyk et al., 1998). Die Expression des SM22 Gens gilt als einer der frühesten Marker während der Embryonalentwicklung aller glatter Muskeltypen (Li et al., 1996a). Da die $\text{CreER}^{\text{T}2}$ Rekombinase in SM-KI Mäusen ein ähnliches Expressionsprofil wie das endogene SM22 Gen aufweist (Abb. C-14, S.57), könnte man durch Tamoxifen-induzierte Rekombination in Embryos (D.2.3) SM22 exprimierende Zellen und deren Tochterzellen permanent genetisch markieren. Durch Tamoxifeninjektion tragender Mütter zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Embryogenese kann man unterschiedliche Zeitfenster der SM22 Expression untersuchen. Wird als Rekombinationssubstrat ein *lacZ* Reportergen verwendet, so lässt sich später durch X-Gal Färbung von Geweben der Nachkommen leicht erkennen, in welchen Zellen der SM22 Promotor im jeweiligen Zeitfenster der Embryonalentwicklung aktiv war bzw. welche Typen von glatten Muskelzellen sich aus den markierten Vorläuferzellen entwickelt haben. Derartige Untersuchungen könnten dazu beitragen, die komplizierte und weitgehend unverstandene Genese des glatten Muskels näher aufzuklären (Carmeliet, 2000).

Weiterhin kann die SM-KI Maus zur Gewinnung von Primärkulturen glatter Muskelzellen genutzt werden. Da auch in den kultivierten Zellen durch Tamoxifenbehandlung Rekombination ausgelöst werden kann (Abb. C-12A, S.55), eignen sie sich zur zeitlich kontrollierten Durchführung *Cre/lox*-vermittelter Reaktionen *in vitro*, z.B. zur Aktivierung von Transgenen oder zur Inaktivierung von endogenen Genen. Schließlich kann in homozygoten (-/-) SM-KI Mäusen die noch unverstandene physiologische Funktion des SM22 Gens selbst untersucht werden, da der Knock-in der $\text{CreER}^{\text{T}2}$ Rekombinase zur Inaktivierung des SM22 Gens führte (C.2.4).

Insgesamt haben die Ergebnisse dieser Arbeit demonstriert, dass es allgemein schwieriger ist eine genetisch veränderte Mauslinie herzustellen, die ein Transgen selektiv in einem gewünschten Gewebe exprimiert, als eine Mauslinie zu erzeugen, die „nur“ ein integriertes Transgen trägt, ohne dass dieses exprimiert werden muss, was z.B. zur Inaktivierung eines Gens ausreicht. So führte der Knock-in der CreER^{T} Rekombinase in den cGKI Genort zwar zur Inaktivierung des cGKI Gens, nicht aber zur gewünschten Expression der Rekombinase (C.1). Nur durch die Verwendung verschiedener genetischer Methoden und Expressionsstrategien konnte schließlich eine Mauslinie etabliert werden, die SM-KI Linie, die das Rekombinase Transgen in ausreichender Menge exprimiert um eine effiziente Tamoxifen-

induzierte Rekombination zu erreichen. Im Vergleich zu konventionellen Cre Mäusen scheinen die Anforderungen an die Expressionseigenschaften von Liganden-aktivierbaren Cre Rekombinasen besonders hoch zu sein. Dies könnte daran liegen, dass die Rekombination nur während der kurzen Phase möglich ist, in der die Maus mit dem aktivierenden Liganden behandelt wird (ca. 5 Tage). Dagegen findet die Rekombination in konventionellen Cre Mäusen zeitlebens, also sozusagen „kontinuierlich“ statt (D.2.3). Die Liganden-aktivierte Rekombination könnte möglicherweise weiter verbessert werden, indem man die Rekombinasen mit sog. Translokationspeptiden ausstattet, die einen interzellulären Transport von Proteinen ermöglichen (Schwarze et al., 1999; Übersicht: Schwarze & Dowdy, 2000). In transgenen Mäusen, die eine solche modifizierte Rekombinase mosaik exprimieren, würden dann die Rekombinaseproteine aus den exprimierenden Zellen auch in benachbarte nicht exprimierende Zellen gelangen, was die Effizienz der Rekombination erhöhen könnte.

Abschließend ist anzumerken, dass ein Knock-in in den SM22 Genort generell zur glattmuskel-spezifischen Expression von Transgenen geeignet sein sollte, zumal heterozygote (+/-) SM22 Knock-in Mäuse keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen zeigen (C.2.4). Beispielsweise könnte man ein cGKI Transgen unter die Kontrolle des endogenen SM22 Promotors stellen und so die cGKI Expression selektiv nur im glatten Muskel von cGKI Knockout Mäusen wiederherstellen. Dadurch könnte untersucht werden, welche Defekte der cGKI Nullmutante auf einer zellautonomen Funktion der cGKI im glatten Muskel beruhen.

E. Zusammenfassung

In einer konventionellen Knockout Maus ist das Zielgen bereits in der Keimbahn zerstört, was häufig zu embryonaler Letalität oder stark eingeschränkter Lebensfähigkeit der Mausmutante führt. Aber selbst wenn man lebensfähige Nullmutanten erhält, so ist das Zielgen in diesen Mäusen „chronisch“, d.h. in jeder Körperzelle bereits von Beginn der Embryonalentwicklung an inaktiviert, so dass die spezifische Funktion des Gens in einem bestimmten Gewebe nicht untersucht werden kann. Die Probleme der „chronischen“ Gendeletion können durch die Methode der konditionalen somatischen Mutagenese unter Einsatz des *Cre/lox* Rekombinationssystems umgangen werden. Mittels transgener Mauslinien, die die Cre Rekombinase gewebespezifisch exprimieren, können *loxP*-flankierte („gefloxt“) Zielgene selektiv nur in einem bestimmten Zelltyp aus dem Chromosom herausgeschnitten und damit inaktiviert werden. Die Verwendung von Liganden-aktivierbaren Cre Rekombinasen ermöglicht zusätzlich eine zeitliche Kontrolle der Rekombination bzw. Gendeletion.

Ziel dieser Arbeit war es, transgene Mauslinien herzustellen, die eine Tamoxifen-aktivierbare Cre Rekombinase (CreER^T oder CreER^{T2}) selektiv in glatten Muskelzellen exprimieren. So könnte die Rekombination und damit die Inaktivierung von geflochten Zielgenen zeit- und gewebespezifisch durch Verabreichung von Tamoxifen an die Mäuse selektiv im glatten Muskel induziert werden. Zur Expression der Rekombinasen in transgenen Mäusen wurden verschiedene Strategien (klassisches, zufällig integriertes Transgen bzw. gezielte Integration des Transgens durch „Knock-in“) und Promotoren, die im glatten Muskel aktiv sind (cGKI bzw. SM22), verwendet. Die erzeugten Mauslinien wurden mit Reportermäusen verkreuzt und ihre Expressions- und Rekombinations-eigenschaften eingehend untersucht.

Sowohl der Knock-in von CreER^T in den cGKI Genort (GK-KI Mauslinie) als auch die zufällige Integration eines SM22- CreER^{T2} Transgens (SM-TG Mauslinien) führten nur zu einer geringen Expression der Rekombinase, so dass die Effizienz der Tamoxifen-induzierten Rekombination in diesen Mauslinien erwartungsgemäß nicht befriedigend war. Dagegen konnte durch den Knock-in von CreER^{T2} in den SM22 Genort (SM-KI Mauslinie) eine relativ starke Expression der Rekombinase und Tamoxifen-induzierte Rekombination in glattmuskulären Geweben erreicht werden. Daher wurde die SM-KI Mauslinie ausführlich charakterisiert.

Während in unbehandelten SM-KI Mäusen keine Hintergrund-Rekombination detektierbar war, konnte durch kurzzeitige Behandlung adulter Mäuse mit einer relativ niedrigen Dosis von Tamoxifen (täglich 0,1 mg für 5 Tage) eine effiziente und persistente Rekombination selektiv in glatten Muskelzellen ausgelöst werden. Rekombination wurde sowohl im vaskulären als auch im viszeralen glatten Muskel nachgewiesen, nicht aber im Herz- und Skelettmuskel sowie in allen anderen untersuchten nicht glattmuskulären Geweben. Durch Tamoxifengabe ließ sich die Rekombinaseaktivität in 100% der glatten Muskelzellen des Darms und in etwa 30% der Gefäßmuskelzellen der Aorta induzieren. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass man mit Hilfe der SM-KI Mauslinie somatische Mutationen

- durch kurzzeitige Verabreichung geringer Dosen von Tamoxifen
- selektiv im glatten Muskel
- mit bis zu 100% Effizienz und
- langer Persistenz

induzieren kann. Daher sollte sich diese Mauslinie gut eignen, um gefloxt Zielgene zu definierten Zeitpunkten spezifisch in glatten Muskelzellen auszuschalten. Insbesondere kann die Funktion des L-Typ Kalziumkanals und der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I, deren „chronischer“ Gen-Knockout zu embryonaler Letalität bzw. stark reduzierter Lebenserwartung führt, in adulten Tieren untersucht werden. Ein wichtiger Vorteil der Liganden-aktivierbaren Rekombination gegenüber herkömmlichen „glattmuskel-spezifischen“ Cre Mäusen ist, dass erstere eine wirklich selektive Gendeletion nur im glatten Muskel ermöglicht. Da die „glattmuskel-spezifischen“ Promotoren während der Embryonalentwicklung auch im Herz- und/oder Skelettmuskel aktiv sind, kommt es in konventionellen Cre Mäusen auch in diesen Muskeltypen zur Gendeletion, was zu Letalität oder schwierig zu interpretierenden Phänotypen führen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein gewebe- und zeitspezifisches Mutagenesesystem für den glatten Muskel entwickelt. Die SM-KI Mauslinie sollte sehr hilfreich sein, um die Funktion bestimmter Gene im glatten Muskel zu untersuchen und um Mausmodelle für wichtige Krankheiten des Menschen, z.B. Atherosklerose und Hypertonie, zu etablieren. Eine weitere Anwendung dieser Mauslinie wäre das sog. „cell fate mapping“ zur Aufklärung der komplizierten Genese verschiedener Typen des glatten Muskels. Schließlich wurden sozusagen als Nebenprodukte dieser Arbeit auch Knockout Mauslinien generiert, die eine Funktionsanalyse des cGKI Gens (GK-KI Mauslinie) und des SM22 Gens (SM-KI Mauslinie) ermöglichen.

F. Anhang

F.1. Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz in 5'-3' Richtung	Gen/Bindungsstelle ^a
796	GTGAATGTTACTCGAGAAGACT	cGKI Exon 7 v
1108	CAGCTCTACTCGTCCGAAACC	cGKI Exon 10 r
1248	CTCACAATGAAGTCAGAATGA	cGKI Exon 11 r
QG197	GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC	HPRT v
QG198	CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA	HPRT r
QY83	ATTCGCAGCGCATCGCCTTC	neo v
RF53	CCTGGCTGTGATTTCACTCCA	cGKI Intron 10 v
RF57	CTAGAATGCCTCCCCCTTTC	SM22 vor Exon 1 v
RF58	TTGTTAT <u>GCATGC</u> TTGAGGCAGAGCTAAAG	SM22 Intron 1 Exon 2 r (SphI)
RF59	TAAACATGTGACCCTTGCTCC	SM22 vor Exon 1 v
RF60	ACATAGCCCATACACCTATGGG	SM22 Intron 2 r
RF61	TGTCAAATAGTCCACAGGCC	SM22 Intron 2 v
RF62	GGAAAAGATGTAGAGGCTGGG	SM22 pA r
RF67	CTCAGAGTGAAGGCCTGCTT	SM22 Intron 1 v
RF79	CGCCGACGGCAGCTGATTG	<i>lacZ</i> v
RF80	GTTTCAATATTGGCTTCATC	<i>lacZ</i> r
RF81	CTGCTAACCATGTTTCATGCC	P _{CAG} v
RF82	GGCCTCTTCGCTATTACG	<i>lacZ</i> r
RF85	TCGCCCATAGCCTGTTCAT	SM22 Exon 5 r
RF88	ACACATTCCACAGCTGGTTCT	"IRES" r
RF90	CACACCATTCTTCAGCCACA	SM22 Exon 2 r
RF103	GACACCGAAGCTACTCTCCTT	SM22 Exon 1 v
SC135	GGCGATCCCTGAACATGTCC	Cre r
TK140	ATCCGAAAAGAAAACGTTGA	Cre v
TK142	ATCCAGGTTACGGATATAGT	Cre r
TS78	GGGCGGTAGGCGTGTACGGT	P _{CMV} v
VI58	CGCCATTCAGGCTGCGCAAC	<i>lacZ</i> r
VZ3	ATTGAACGAACCTGGTCGAA	Cre r

^a v, vorwärts; r, rückwärts

F.2. PCR Genotypisierung

Mauslinie	Primer	Größe des Amplifikats
ACZL	RF79+RF80	0,30 kb
	RF81+RF82	~ 2 kb
ACZL-E	RF81+RF82	0,58 kb
CMV-Cre	TK140+TK142	0,63 kb
CMV-CreER ^T	TK140+TK142	0,63 kb
GK-KI	RF53+RF88+1108	0,60 KI
		0,55 WT
SM-TG	RF79+RF80	0,30 kb <i>lacZ</i>
	TK140+TK142	0,63 kb Cre
SM-TG-E	VI58+TS78	0,35 kb
SM-KI	RF67+SC135+RF90	0,22 kb KI
		0,30 kb WT

F.3. Verwendete Antikörper

Antikörper	Herkunft	Anwendung / Verdünnung	Referenz
cGKIcommon	Kaninchen polyklonal	Western Blot / 1:1000	P. Ruth, F. Hofmann, München
Cre	Kaninchen polyklonal	Immuncytochemie / 1:1000	F. Tronche, G. Schütz, Heidelberg
SM22	Kaninchen polyklonal	Western Blot / 1:1000	V.J. Small, M. Gimona, Salzburg
α Smooth Muscle Actin	Maus monoklonal	Immuncytochemie / 1:400	Sigma #A-2547
Anti-Kaninchen / Alkalische Phosphatase	Schaf polyklonal	Western Blot / 1:5000	Boehringer #1214632
Anti-Kaninchen / Cy3	Ziege polyklonal	Immuncytochemie / 1:300	Dianova #111-165-144
Anti-Maus / FITC	Ziege polyklonal	Immuncytochemie / 1:300	Dianova #115-095-146

F.4. Analyse der Rekombination in SM-KI Mäusen

Verabreichungsform des Liganden	Zeit zwischen der letzten Verabreichung des Liganden und der Analyse	Effizienz der Rekombination ^a (untersuchte Tiere)
5 x 0.01 mg Tam ^b i.p.	3 Tage	≈7% (2)
5 x 0.1 mg Tam i.p.	3 Tage	≈92% (3)
5 x 1 mg Tam i.p.	3 Tage	≈100% (9)
5 x 1 mg Tam p.o.	3 Tage	≈96% (2)
5 x 0.1 mg OHT i.p.	3 Tage	≈88% (2)
5 x 1 mg OHT i.p.	3 Tage	≈99% (2)
5 x 1 mg Tam i.p.	2 Wochen	≈96% (2)
5 x 1 mg Tam i.p.	4 Wochen	≈100% (2)
5 x 1 mg Tam i.p.	8 Wochen	≈93% (11)
5 x 1 mg Tam i.p.	16 Wochen	≈85% (2)
5 x Vehikel i.p.	32 Wochen	0% (2)

^a an Schnitten des Dünndarms und Dickdarms bestimmt (B.3.6); ^b Tamoxifen

F.5. Verwendete transgene Mauslinien

Mauslinie	Promotor	Eigenschaften	Verwendung	genetischer Hintergrund	Referenz
ACZL	CAG	Transgen exprimiert β -Galaktosidase nach Cre-vermittelter Rekombination	<i>lacZ</i> Rekombinationsreporter (Gehirn, Herz, Skelettmuskel, glatter Muskel, Haut)	gemischt	Akagi et al., 1997
ACZL-E	CAG	Transgen enthält das rekombinierte ACZL Transgen in allen Zellen	Positivkontrolle für die Expression der β -Galaktosidase in ACZL Mäusen	gemischt	diese Arbeit
CMV-Cre	CMV	Transgen exprimiert Cre in vielen Geweben	Positivkontrolle für Rekombination, Generierung von ACZL-E und SM-TG-E Linien	gemischt	Dupé et al., 1997
CMV-CreER^T	CMV	Transgen exprimiert CreER ^T in vielen Geweben	Positivkontrolle für Tamoxifen-induzierte Rekombination	gemischt	Feil et al., 1996
GK-KI	cGKI	Knock-in exprimiert CreER ^T sehr schwach im glatten Muskel; keine Tamoxifen-induzierte Rekombination nachweisbar; cGKI-defizient	cGKI Knockout Linie	C57BL/6 / 129/Sv, 129/Sv	diese Arbeit (C.1)
SM-TG	SM22	Transgen exprimiert CreER ^{T2} schwach im glatten Muskel; geringe Rekombination nachweisbar; exprimiert β -Galaktosidase nach Cre-vermittelter Rekombination, da LacZ(LNL) Reportertransgen co-integriert ist	<i>lacZ</i> Rekombinationsreporter (z.B. Kleinhirn, Herz, Skelettmuskel, Niere, Pankreas, Darmepithel, Haut)	C57BL/6 / 129/Sv	diese Arbeit (C.2); Kühbandner et al., 2000
SM-TG-E	SM22	Transgen enthält das rekombinierte LacZ(LNL) Transgen in allen Zellen	Positivkontrolle für die Expression der β -Galaktosidase in SM-TG Mäusen	C57BL/6 / 129/Sv	diese Arbeit (C.2)
SM-KI	SM22	Knock-in exprimiert CreER ^{T2} im glatten Muskel; SM22-defizient	Tamoxifen-induzierte Rekombination in glatten Muskelzellen; SM22 Knockout Linie	C57BL/6 / 129/Sv, 129/Sv	diese Arbeit (C.2); Kühbandner et al., 2000

G. Literaturverzeichnis

G.1. Zitierte Veröffentlichungen

- Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., Van der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M., and Berns, A. (1997). Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res* **25**, 1766-73.
- Araki, K., Araki, M., Miyazaki, J., and Vassalli, P. (1995). Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 160-4.
- Berton, T. R., Wang, X. J., Zhou, Z., Kellendonk, C., Schutz, G., Tsai, S., and Roop, D. R. (2000). Characterization of an inducible, epidermal-specific knockout system: differential expression of lacZ in different Cre reporter mouse strains. *Genesis* **26**, 160-1.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Blank, R. S., Swartz, E. A., Thompson, M. M., Olson, E. N., and Owens, G. K. (1995). A retinoic acid-induced clonal cell line derived from multipotential P19 embryonal carcinoma cells expresses smooth muscle characteristics. *Circ Res* **76**, 742-9.
- Bochaton-Piallat, M. L., Gabbiani, G., and Pepper, M. S. (1998). Plasminogen activator expression in rat arterial smooth muscle cells depends on their phenotype and is modulated by cytokines. *Circ Res* **82**, 1086-93.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Chambon, P., and Metzger, D. (1997). Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14559-63.
- Bruning, J. C., Michael, M. D., Winnay, J. N., Hayashi, T., Horsch, D., Accili, D., Goodyear, L. J., and Kahn, C. R. (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* **2**, 559-69.
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288-92.
- Carmeliet, P. (2000). Developmental biology. One cell, two fates [news] [In Process Citation]. *Nature* **408**, 43, 45.
- Chen, J., Kubalak, S. W., and Chien, K. R. (1998). Ventricular muscle-restricted targeting of the RXRalpha gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis. *Development* **125**, 1943-9.
- Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K., and McMahon, A. P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol* **8**, 1323-6.
- Dobie, K., Mehtali, M., McClenaghan, M., and Lathe, R. (1997). Variegated gene expression in mice. *Trends Genet* **13**, 127-30.

- Drab, M., Haller, H., Bychkov, R., Erdmann, B., Lindschau, C., Haase, H., Morano, I., Luft, F. C., and Wobus, A. M. (1997). From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *Faseb J* **11**, 905-15.
- Dupe, V., Davenne, M., Brocard, J., Dolle, P., Mark, M., Dierich, A., Chambon, P., and Rijli, F. M. (1997). In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* **124**, 399-410.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10887-90.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 752-7.
- Franz, W. M., Mueller, O. J., Fleischmann, M., Babij, P., Frey, N., Mueller, M., Besenfelder, U., Moorman, A. F., Brem, G., and Katus, H. A. (1999). The 2.3 kb smooth muscle myosin heavy chain promoter directs gene expression into the vascular system of transgenic mice and rabbits. *Cardiovasc Res* **43**, 1040-8.
- Garrick, D., Fiering, S., Martin, D. I., and Whitelaw, E. (1998). Repeat-induced gene silencing in mammals [see comments]. *Nat Genet* **18**, 56-9.
- Gu, H., Zou, Y. R., and Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**, 1155-64.
- Hirota, H., Chen, J., Betz, U. A., Rajewsky, K., Gu, Y., Ross, J., Jr., Muller, W., and Chien, K. R. (1999). Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* **97**, 189-98.
- Hofmann, F., Ammendola, A., and Schlossmann, J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* **113**, 1671-6.
- Hofmann, F., Lacinova, L., and Klugbauer, N. (1999). Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **139**, 33-87.
- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F., and Lacy, E. (1994). Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Ibelgaufts, H. (1990). Gentechnologie von A bis Z. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Imai, T., Chambon, P., and Metzger, D. (2000). Inducible site-specific somatic mutagenesis in mouse hepatocytes. *Genesis* **26**, 147-8.
- Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J. M., Xiao, J. H., Chambon, P., and Metzger, D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* **27**, 4324-7.
- Jaenisch, R. (1988). Transgenic animals. *Science* **240**, 1468-74.
- Keilbach, A., Ruth, P., and Hofmann, F. (1992). Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem* **208**, 467-73.

- Kellendonk, C., Tronche, F., Casanova, E., Anlag, K., Opherk, C., and Schutz, G. (1999). Inducible site-specific recombination in the brain. *J Mol Biol* **285**, 175-82.
- Kim, S., Lin, H., Barr, E., Chu, L., Leiden, J. M., and Parmacek, M. S. (1997). Transcriptional targeting of replication-defective adenovirus transgene expression to smooth muscle cells in vivo. *J Clin Invest* **100**, 1006-14.
- Kleppisch, T., and Nelson, M. T. (1995). Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A2 receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 12441-5.
- Kulkarni, R. N., Bruning, J. C., Winnay, J. N., Postic, C., Magnuson, M. A., and Kahn, C. 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**, 329-39.
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L., and Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6232-6.
- Li, L., Miano, J. M., Cserjesi, P., and Olson, E. N. (1996a). SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res* **78**, 188-95.
- Li, L., Miano, J. M., Mercer, B., and Olson, E. N. (1996b). Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells. *J Cell Biol* **132**, 849-59.
- Li, M., Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D., and Chambon, P. (2000). Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis. *Nature* **407**, 633-6.
- Lobe, C. G., Koop, K. E., Kreppner, W., Lomeli, H., Gertsenstein, M., and Nagy, A. (1999). Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Dev Biol* **208**, 281-92.
- Madsen, C. S., Regan, C. P., Hungerford, J. E., White, S. L., Manabe, I., and Owens, G. K. (1998). Smooth muscle-specific expression of the smooth muscle myosin heavy chain gene in transgenic mice requires 5'-flanking and first intronic DNA sequence. *Circ Res* **82**, 908-17.
- Mao, X., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (1999). Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5037-42.
- Metzger, D., and Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 470-6.
- Moessler, H., Mericskay, M., Li, Z., Nagl, S., Paulin, D., and Small, J. V. (1996). The SM 22 promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice. *Development* **122**, 2415-25.
- Mountford, P., Zevnik, B., Duwel, A., Nichols, J., Li, M., Dani, C., Robertson, M., Chambers, I., and Smith, A. (1994). Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4303-7.
- Mountford, P. S., and Smith, A. G. (1995). Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. *Trends Genet* **11**, 179-84.

- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* **26**, 99-109.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8424-8.
- Orban, P. C., Chui, D., and Marth, J. D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6861-5.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R., and Hofmann, F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J* **17**, 3045-51.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P., and Hofmann, F. (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**, 105-49.
- Picard, D. (1994). Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins. *Curr Opin Biotechnol* **5**, 511-5.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U. A., Muller, W., Roes, J., and Schwenk, F. (1996). Conditional gene targeting. *J Clin Invest* **98**, 600-3.
- Regan, C. P., Manabe, I., and Owens, G. K. (2000). Development of a smooth muscle-targeted cre recombinase mouse reveals novel insights regarding smooth muscle myosin heavy chain promoter regulation. *Circ Res* **87**, 363-9.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sauer, B. (1994). Site-specific recombination: developments and applications. *Curr Opin Biotechnol* **5**, 521-7.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* **14**, 381-92.
- Schenkel J. (1995). Transgene Tiere. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse [see comments]. *Science* **285**, 1569-72.
- Schwarze, S. R., and Dowdy, S. F. (2000). In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 45-8.
- Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP- flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* **23**, 5080-1.

- Schwenk, F., Kuhn, R., Angrand, P. O., Rajewsky, K., and Stewart, A. F. (1998). Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* **26**, 1427-32.
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A., Kuhbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R., and Hofmann, F. (2000). Functional Embryonic Cardiomyocytes after Disruption of the L-type alpha 1C (Cav1.2) Calcium Channel Gene in the Mouse. *J Biol Chem* **275**, 39193-39199.
- Solway, J., Seltzer, J., Samaha, F. F., Kim, S., Alger, L. E., Niu, Q., Morrissey, E. E., Ip, H. S., and Parmacek, M. S. (1995). Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *J Biol Chem* **270**, 13460-9.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain [letter]. *Nat Genet* **21**, 70-1.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.
- Specht, V. (2000). Genetische Modifikation des α_{1C} L-Typ Kalziumkanals der Maus mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems. Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München
- Strachan, T., and Read, AP. (1996). Molekulare Humangenetik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Torres, R. M., and Kühn, R. (1997). Laboratory protocols for conditional gene targeting. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Tsujita, M., Mori, H., Watanabe, M., Suzuki, M., Miyazaki, J., and Mishina, M. (1999). Cerebellar granule cell-specific and inducible expression of Cre recombinase in the mouse. *J Neurosci* **19**, 10318-23.
- Vasioukhin, V., Degenstein, L., Wise, B., and Fuchs, E. (1999). The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8551-6.
- Wassarman, P. M., and DePamphilis, M. L. (1993). Methods in Enzymology. Volume 225. Guide to techniques in mouse development. Academic Press, San Diego, California.
- Wernet, W., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1989). The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* **251**, 191-6.
- Zinyk, D. L., Mercer, E. H., Harris, E., Anderson, D. J., and Joyner, A. L. (1998). Fate mapping of the mouse midbrain-hindbrain constriction using a site-specific recombination system. *Curr Biol* **8**, 665-8.

G.2. Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten

- Kuhbandner, S., Brummer, S., Metzger, D., Chambon, P., Hofmann, F., and Feil, R. (2000). Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis* **28**, 15-22.
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzter, J., Pfeifer, A., Kuhbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R., and Hofmann, F. (2000). Functional Embryonic Cardiomyocytes after Disruption of the L-type alpha 1C (Cav1.2) Calcium Channel Gene in the Mouse. *J Biol Chem* **275**, 39193-39199.

Abstracts

- Kuhbandner, S., Feil, R., and Hofmann, F. (1999). A mouse strain carrying a tamoxifen-inducible Cre recombinase „knocked in“ into the cGKI gene. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* **359** R13
- Feil, R., Kuhbandner, S., Stief, S., and Hofmann, F. (1999). Regulated somatic mutagenesis in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* **359** R9
- Specht, V., Klugbauer, N., Kuhbandner, S., Feil, R., and Hofmann, F. (1999). Construction of a vector for conditional gene targeting of the α_{1C} subunit of the L-type calcium channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* **359** R67
- Kuhbandner, S., Brummer, S., Hofmann, F., and Feil, R. (2000). Conditional gene targeting in smooth muscle of mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* **361** R9
- Specht, V., Welling, A., Seisenberger, C., Klugbauer, N., Kuhbandner, S., Feil, R., and Hofmann, F. (2000). Characterization of cardiac myocytes from embryos at day 12,5 p.c. with a disrupted α_{1C} L-type calcium channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* **361** R70
- Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Brummer, S., Feil, R., and Hofmann, F. (2000). Generation of mice allowing the conditional inactivation of the cGMP-dependent protein kinase I gene. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* **361** R69
- Feil, R., Kuhbandner, S., Brummer, S., Metzger, D., Chambon, P., and Hofmann, F. (2000). Inducible gene targeting in smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* **362** R36
- Feil, R., Kuhbandner, S., and Hofmann, F. (2000). Temporally-controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. VW-Symposium on „Conditional Mutagenesis“, Berlin, 9.-10.10.2000
- Kuhbandner, S., Hofmann, F., and Feil, R. (2000). Zeit- und gewebespezifische Mutagenese im glatten Muskel der Maus. „Biolog 2000“, 2. Münchner Kongress für Biowissenschaften, München, 18.11.2000

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlichst danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann für die Aufnahme in seinen Mitarbeiterkreis, für sein Interesse und für die stetige Bereitschaft zur Lösung kleinerer und größerer Probleme.

Herrn Prof. Dr. Ruedi Fries für die Übernahme der Berichterstattung vor der Fakultät.

Dr. Robert Feil für die Betreuung dieser Arbeit, seine fachliche Unterstützung und besonders für sein persönliches Engagement.

Sabine Brummer, unserem guten Geist im Labor, besonders für die unermüdliche Hilfe bei der Genotypisierung der Mäuse.

Wiebke und Matthias für die tatkräftige Unterstützung sowie Aldo, Gigi, Kleppi, Mark, Oliver und allen anderen „Erdgeschosslern“ für das gute Arbeitsklima und die musikalische Untermalung bei der Arbeit.

Frau Günther und Herrn Pavel für die Betreuung der Mäuse im Tierstall.

Prof. Dr. Pierre Chambon für die Möglichkeit in seinem Labor einen Einblick in Techniken der Mausgenetik zu gewinnen und für die Bereitstellung verschiedener Mauslinien.

Prof. Dr. A. Berns für die ACZL Reportermauslinie, Prof. Dr. M. Biel für die Mäuse zur Erzeugung von Feederzellen, Dr. A. Pfeifer für die genomische cGKI DNS, Prof. Dr. P. Ruth für den cGKI Antikörper, Prof. Dr. G. Schütz und Dr. F. Tronche für den Cre Antikörper sowie Prof. Dr. J.V. Small und Dr. M. Gimona für den SM22 Antikörper.

Ein Dankeschön an alle Mitarbeiter des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.