

Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Technischen Universität München

## **Konditionale Mutagenese des IRAG Gens in der Maus**

**Matthias Werner**

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. A. Gierl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann  
2. apl.-Prof. Dr. J. Graw  
3. Univ.-Prof. Dr. W. Staudenbauer

Die Dissertation wurde am 27.08.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.11.2002 angenommen.



Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
<b>A. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>A.1. Kalziumregulation in glatten Muskelzellen</b> .....	<b>1</b>
A.1.1. Kontraktion glatter Muskelzellen .....	1
A.1.2. cGKI-abhängige Relaxierung glatter Muskelzellen .....	2
<b>A.2. Konditionale Mutagenese durch das Cre/lox System</b> .....	<b>4</b>
<b>A.3. Zielsetzung</b> .....	<b>5</b>
<b>B. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>7</b>
<b>B.1. Bakterien und Plasmide</b> .....	<b>7</b>
B.1.1. Bakterienstämme .....	7
B.1.2. Verwendete Plasmide .....	7
B.1.3. Nährmedien und Lösungen .....	7
B.1.4. Kultivierung .....	8
B.1.5. Bestimmung der Zelldichte .....	8
B.1.6. Transformation von Bakterien .....	8
<b>B.2. Weitere molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>9</b>
B.2.1. Isolierung von Plasmid-DNS .....	9
B.2.2. Isolierung von genomischer DNS und RNS aus Mausgewebe .....	10
B.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	11
B.2.4. Restriktionsenzyme .....	11
B.2.5. Alkalische Phosphatase .....	12
B.2.6. T4-DNS-Ligase .....	12
B.2.7. Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten .....	12
B.2.8. Synthese von Oligonukleotiden .....	13
B.2.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und RT-PCR .....	13
B.2.10. Sequenzierung von DNS .....	15
B.2.11. Southern Blot Analyse .....	16
<b>B.3. Transiente Transfektion von COS Zellen</b> .....	<b>18</b>
<b>B.4. Erzeugung genetisch veränderter Mäuse</b> .....	<b>19</b>
B.4.1. Kultivierung embryonaler Stammzellen .....	20
B.4.2. Lösungen und Nährmedien .....	21
B.4.3. Gewinnung embryonaler Fibroblasten .....	23
B.4.4. Allgemeines Vorgehen bei der Kultivierung von ES Zellen .....	23
B.4.5. Homologe Rekombination in ES Zellen .....	24
B.4.6. Identifizierung genetisch modifizierter ES Zellen .....	28
B.4.7. Cre-vermittelte Rekombination in ES Zellen .....	29
B.4.8. Injektion genetisch modifizierter ES Zellen in Blastozysten .....	30
B.4.9. Testen von chimären Mäusen auf Keimbahntransmission .....	31
B.4.10. Haltung und Zucht der Mäuse .....	31

<b>C.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>33</b>
<b>C.1.</b>	<b>Charakterisierung der BAC-Klone</b> .....	<b>33</b>
C.1.1.	Long Template PCR .....	33
C.1.2.	Restriktionskarte .....	34
<b>C.2.</b>	<b>Konstruktion des Targeting Vektors</b> .....	<b>34</b>
C.2.1.	Merkmale des Targeting Vektors .....	34
C.2.2.	Gensonden zum Nachweis der homologen Rekombination in ES Zellen .....	35
<b>C.3.</b>	<b>Transiente Transfektion in COS Zellen</b> .....	<b>36</b>
<b>C.4.</b>	<b>Genetische Modifikation der ES Zellen</b> .....	<b>38</b>
C.4.1.	Homologe Rekombination (Erstes Targeting).....	38
C.4.2.	Cre-vermittelte Rekombination in ES Zellen (Zweites Targeting) .....	41
<b>C.5.</b>	<b>Injektion der ES Zellklone in Blastozysten</b> .....	<b>47</b>
<b>C.6.</b>	<b>Genotypisierung agouti-farbener Nachkommen</b> .....	<b>48</b>
C.6.1.	Genotypisierung der <i>IRAG</i> (+/L3) Mäuse .....	48
C.6.2.	Genotypisierung der „geflochten“ <i>IRAG</i> (+/L2) Mäuse.....	49
<b>C.7.</b>	<b>Verpaarung mit einer „Cre-deleter“ Maus</b> .....	<b>51</b>
C.7.1.	Genotypisierung der Nachkommen .....	52
<b>C.8.</b>	<b>RNS Analyse der genetisch modifizierten Mäuse</b> .....	<b>54</b>
<b>D.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>56</b>
<b>E.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>61</b>
<b>F.</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>62</b>
<b>F.1.</b>	<b>Verwendete Oligonukleotide (Primer)</b> .....	<b>62</b>
F.1.1.	PCR- bzw. Sequenzier-Primer .....	62
F.1.2.	Primer zur Konstruktion des Targeting Vektors.....	62
F.1.3.	Primer für die Sondenherstellung .....	63
F.1.4.	Primer zur Genotypisierung.....	63
F.1.5.	Sonstige verwendete Primer .....	63
<b>F.2.</b>	<b>Sequenzvergleich</b> .....	<b>63</b>
<b>F.3.</b>	<b>Verwendete Restriktionsenzyme</b> .....	<b>64</b>
<b>F.4.</b>	<b>Geräteverzeichnis</b> .....	<b>65</b>
<b>F.5.</b>	<b>Firmenverzeichnis</b> .....	<b>66</b>
<b>G.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>67</b>
<b>G.1.</b>	<b>Zitierte Veröffentlichungen</b> .....	<b>67</b>
<b>G.2.</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen</b> .....	<b>70</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. A-1 Kalzium-abhängige Kontraktion des glatten Gefäßmuskels.....	2
Abb. A-2 cGKI-abhängige Relaxierung des glatten Gefäßmuskels. ....	3
Abb. A-3 Das Cre/lox seitenspezifische Rekombinationssystem. ....	5
Abb. B-1 Aufbau des Southern Blots. ....	17
Abb. B-2 Herstellung genetisch veränderter Mäuse durch homologe Rekombination in ES Zellen. ....	21
Abb. B-3 Prinzip des „Gene Targeting“.....	25
Abb. B-4 Vorgehen zur Isolierung von ES Zellklonen. ....	27
Abb. C-1 Partielle Restriktionskarte des <i>IRAG</i> Gens. ....	34
Abb. C-2 Strategie des Targetings und zum Nachweis der homologen Rekombination. ....	36
Abb. C-3 PCR Strategie zur Detektion der Cre-vermittelten Rekombination. ....	37
Abb. C-4 Southern Blot Hybridisierungen mit der 5' Sonde zum Nachweis der homologen Rekombination.....	39
Abb. C-5 Southern Blot Hybridisierungen mit der 3' Sonde zum Nachweis der homologen Rekombination.....	40
Abb. C-6 Nachweis der homologen Rekombination durch Long-Range-PCR. ....	41
Abb. C-7 Strategie der Southern Blot Hybridisierung zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination.....	43
Abb. C-8 Southern Blot Hybridisierungen mit der internen Sonde zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination.....	44
Abb. C-9 Southern Blot Hybridisierungen mit der 3' Sonde zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination.....	45
Abb. C-10 PCR Analyse der Cre-vermittelten Rekombination. ....	45
Abb. C-11 Genotypisierung der <i>IRAG</i> (+/L3) Mäuse mittels Southern Blot. ....	48
Abb. C-12 Genotypisierung der <i>IRAG</i> (+/L3) Mäuse mittels PCR.....	49
Abb. C-13 Genotypisierung der „geflochten“ <i>IRAG</i> (+/L2) Mäuse mittels Southern Blot. ....	50
Abb. C-14 Genotypisierung der „geflochten“ <i>IRAG</i> (+/L2) Mäuse mittels PCR.....	51
Abb. C-15 PCR Genotypisierung der Nachkommen nach Verpaarung mit einer „Cre-deleter“ Maus. .	53
Abb. C-16 RT-PCR Analyse der mRNA der genetisch modifizierten Mäuse. ....	55
Abb. D-1 Vergleich verschiedener Modifikationsmöglichkeiten mit Hilfe des Cre/loxP Systems.....	57
Abb. D-2 Deletion des Exons 12 im <i>IRAG</i> Gen. ....	58

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle B-1 Reaktionsschritte einer Long Template Polymerase-Kettenreaktion.....	15
Tabelle B-2 Medium für die ES Zellkultur .....	22
Tabelle B-3 Gefäße für die Zellkultur.....	22
Tabelle C-1 Primerpaare mit den dazugehörigen amplifizierten Sequenzen und ihrer Größe .....	34
Tabelle C-2 Primerpaare zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination.....	37
Tabelle C-3 Ausbeute bei der Etablierung der I-L3, I-L2 und I-L1 Mauslinien .....	47
Tabelle F-1 Verwendete Restriktionsenzyme.....	64

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin	IRAG	IP <sub>3</sub> -Rezeptor assoziiertes cGKI Substrat
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen	kb	Kilobase
Ca <sub>v</sub> 1.2	porenbildende Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals	kDa	Kilodalton
BAC	bacterial artificial chromosome	+	Wildtyp
bp	Basenpaar	L1, L2,	eine, zwei,
BSA	Rinderserumalbumin	bzw. L3	bzw. drei <i>loxP</i> Seiten
C	Cytosin	l	Liter
cDNS	komplementäre DNS	LB	Luria-Bertani
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I	<i>loxP</i>	DNS-Substrat von Cre (locus of crossing over of P1)
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
CMV	Cytomegalovirus	m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
cpm	counts per minute	n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
Cre	Cre Rekombinase (cyclization recombination)	neo	Neomycinresistenzgen
d	Tag	nt	Nukleotid
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat	NO	Stickstoffmonoxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat	OD	optische Dichte
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
DMSO	Dimethylsulfoxid	p.c.	<i>post coitum</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat	PLCβ	Phospholipase C β
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RNS	Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure	rpm	Umdrehungen pro Minute
EF	embryonale Fibroblasten („Feederzellen“)	R	Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Reticulum	RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
ES Zellen	embryonale Stammzellen	RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
F	Farad (Kapazität)	s	Sekunde
FBS	fötales Rinderserum	SDS	Natriumdodecylsulfat
G	Guanin	sGC	lösliche Guanylylzyklase
gefloxt	<i>loxP</i> -flankiert	T	Thymin
G418	Geneticin <sup>R</sup>	TAE	Tris/Acetat/EDTA
GANC	Ganciclovir	TBE	Tris/Borat/EDTA
h	Stunde	tk	Thymidinkinasegen
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat	Tris	α,α,α-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
		U	Unit, Einheit
		UV	Ultraviolett
		ÜN	über Nacht





## A. Einleitung

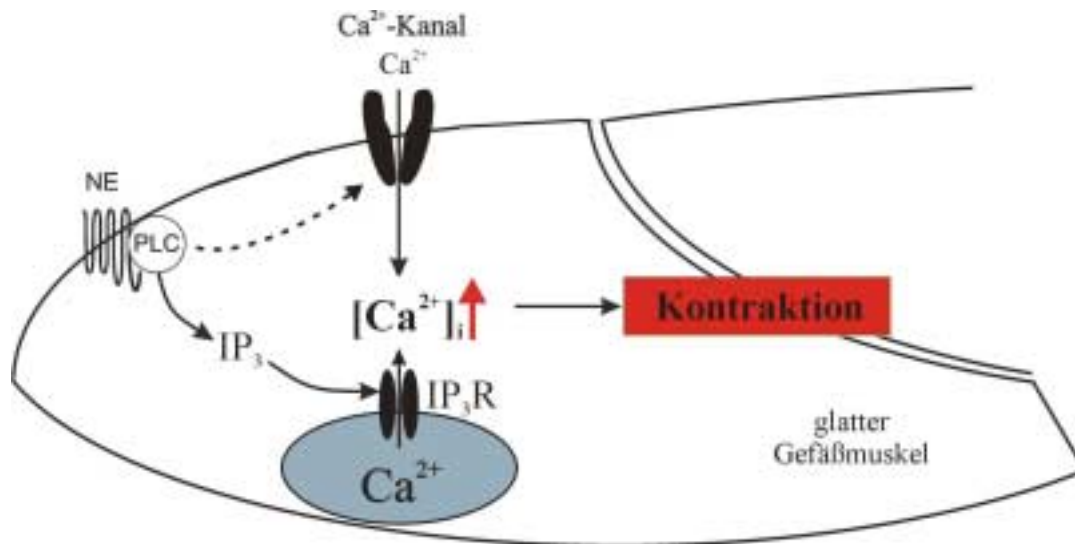
### A.1. Kalziumregulation in glatten Muskelzellen

Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) spielen bei vielen biologischen Vorgängen eine wichtige Rolle zur intrazellulären Weiterleitung von Signalen, welche von außerhalb der Zelle ankommen. Zu diesen Vorgängen gehört u.a. das Schlagen des Herzens, das Verarbeiten und Speichern von Informationen im Gehirn und die Kontraktion von Muskeln. Diese vielseitigen Steuerungsfunktionen von Kalzium werden durch die räumliche und zeitliche Verteilung sowie durch die intrazelluläre Konzentration der Kalziumionen ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) vermittelt (Übersicht: Berridge et al., 2000).

Der Anstieg und Abfall der zytosolischen Kalziumkonzentration und die damit zusammenhängende Kontraktion und Relaxierung der glatten Muskulatur ist von großer Bedeutung für den Tonus von Blutgefäßen und gastrointestinalen Organen. Außerdem spielt  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  eine wichtige Rolle bei der Proliferation und bei der Differenzierung der glatten Muskelzellen. Störungen in der Modulation des intrazellulären Kalziumspiegels sind demnach mögliche Auslöser für Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes sowie des Herz-Kreislauf-Systems (z.B. Hypertonie und Atherosklerose).

#### A.1.1. Kontraktion glatter Muskelzellen

Die Kontraktion glatter Muskelzellen kann sowohl Kalzium-abhängig als auch -unabhängig induziert werden. Aufgrund der Aufgabenstellung dieser Arbeit wird nur auf die Kalzium-abhängige Kontraktion eingegangen. Diese wird durch die Hormon-Rezeptor-vermittelte Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) durch die Phospholipase  $\text{C}\beta$  ( $\text{PLC}\beta$ ) ausgelöst.  $\text{IP}_3$  bindet an den  $\text{IP}_3$  Rezeptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) auf der Membran des Endoplasmatischen Reticulums (ER), welches einen intrazellulären Kalziumspeicher darstellt. Daraufhin kommt es zur Kalziumfreisetzung aus diesen Speichern, gefolgt von einem Einstrom extrazellulären Kalziums durch Kalziumkanäle in der Zytoplasmamembran (**Abb. A-1**). Dass v.a. dem spannungsabhängigen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal  $\text{Ca}_v1.2$  hierbei eine große Bedeutung zukommt, zeigt eine Inhibierung der Kontraktion, wenn er blockiert wird (Übersicht: Hofmann et al., 1999). Eine konventionelle Deletion des  $\text{Ca}_v1.2$  Gens in der Maus ist bereits in der Embryonalentwicklung letal (Seisenberger et al., 2000). Der aus der Öffnung der Kanäle resultierende Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führt zur Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK), damit zur Phosphorylierung der Myosin Leichten Kette (MLC) und zur Aktivierung der Myosin ATPase, was letztendlich zur Kontraktion führt (**Abb. A-1**; Übersicht: Hofmann et al., 2000).

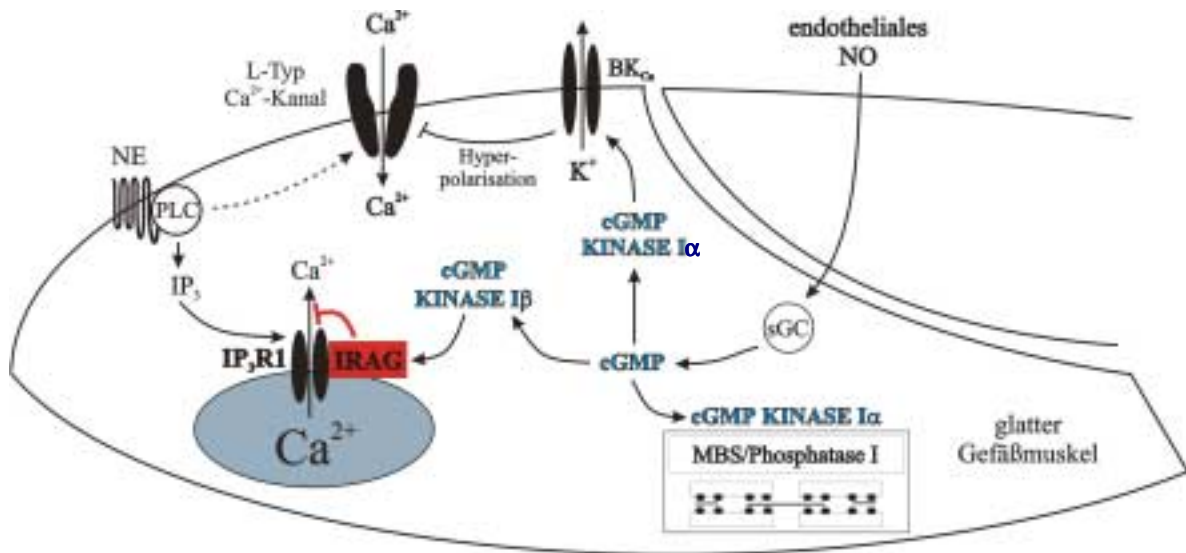


**Abb. A-1 Kalzium-abhängige Kontraktion des glatten Gefäßmuskels.**

Hormon-Rezeptor-vermittelte Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) mittels der Phospholipase C (PLC).  $IP_3$  bindet an den  $IP_3$  Rezeptor auf der Membran des ER und führt zur Kalziumfreisetzung aus dem Kalziumspeicher, gefolgt von einem Einstrom extrazellulären Kalziums durch Kalziumkanäle in der Zytoplasmamembran. Die Öffnung der Kanäle resultiert in einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  und führt letztendlich zur Kontraktion. NE, Noradrenalin; Weitere Erklärung im Text.

### A.1.2. cGKI-abhängige Relaxierung glatter Muskelzellen

Einige der bislang bekannten Mechanismen, welche zur Relaxierung glatter Muskelzellen führen, sind in **Abb. A-2** dargestellt. Stickstoffmonoxid (NO), das z.B. in den Endothelzellen von Blutgefäßen produziert wird, aktiviert in den umgebenden glatten Gefäßmuskelzellen die lösliche Guanylylzyklase (sGC) (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1999). Diese synthetisiert daraufhin zyklisches GMP (cGMP), welches wiederum weitere Effektoren aktiviert. Dazu gehören die beiden cGMP-abhängigen Proteinkinasen I und II (cGKI und II), welche in einer Vielzahl von eukaryotischen Zellen vorkommen, vom einzelligen Organismus bis hin zum Menschen (Lohmann et al., 1997, Pfeifer et al., 1999). Von der cGKI sind außerdem die zwei unterschiedlichen Isoformen cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  bekannt, welche durch alternatives Spleißen der ersten beiden Exone des cGKI Gens entstehen. Die cGKI ist hauptverantwortlich für die NO/cGMP-vermittelte Relaxierung des glatten Muskels. Wird das Gen für die cGKI in Mäusen deletiert, zeigen diese im Alter von 4 bis 6 Wochen einen hypertensiven Phänotyp. Im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen relaxieren isolierte präkontrahierte Gefäße dieser Mäuse nicht mehr nach NO Zugabe (Pfeifer et al., 1998). Auf welche Art und Weise die cGKI nun die Relaxierung bewirkt, ist noch nicht eindeutig entschlüsselt.



### Abb. A-2 cGKI-abhängige Relaxierung des glatten Gefäßmuskels.

Dephosphorylierung der MLC durch die PP1M bzw. Reduzierung von  $[Ca^{2+}]_i$  bewirkt eine Abnahme des Muskeltonus. Die Reduzierung von  $[Ca^{2+}]_i$  kommt entweder durch die Phosphorylierung und die damit verbundene Öffnung von BK<sub>Ca</sub> Kanälen zustande oder durch die Phosphorylierung von IRAG durch die cGKIβ und die damit verbundene Hemmung der Kalziumfreisetzung aus dem ER. Hofmann et al., 2000, modifiziert. Weitere Erklärung im Text.

Der Tonus glatter Muskeln nimmt bei Dephosphorylierung der MLC durch die Myosin-Phosphatase 1 (PP1M) ab. Die PP1M besteht aus drei Untereinheiten und eine davon, die Myosin-bindende Untereinheit (MBS), wird von der cGKIα phosphoryliert (Surks et al., 1999; **Abb. A-2**). Ob diese Phosphorylierung eine Relaxierung bewirkt, ist aber noch nicht eindeutig geklärt. Eine andere Möglichkeit, den Tonus zu vermindern ist die Verringerung von  $[Ca^{2+}]_i$ . Dazu werden mehrere Mechanismen diskutiert. Einer davon ist die Phosphorylierung von Kalzium-aktivierten maxi K<sup>+</sup> (BK<sub>Ca</sub>) Kanälen (Alioua et al., 1998). Die BK<sub>Ca</sub> Kanäle werden dadurch häufiger geöffnet, Kalium strömt aus der Zelle und diese wird hyperpolarisiert. Diese Hyperpolarisation führt zur Schließung von L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen und dadurch zur Reduzierung von  $[Ca^{2+}]_i$  (**Abb. A-2**). Der zweite Mechanismus, welcher auch die Grundlage für diese Arbeit bildet, ist die Phosphorylierung von IRAG (Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor assoziiertes cGKI Substrat) durch die cGKI (Schlossmann et al., 2000). Untersuchungen in COS Zellen ließen die Vermutung zu, dass IRAG in der Membran des ER lokalisiert ist. Im glatten Muskel bildet IRAG einen makromolekularen Komplex mit dem IP<sub>3</sub> Rezeptor Typ I (IP<sub>3</sub>RI) und mit der β-Isoform der cGKI. IRAG ist ein 130 kDa großes Protein und wird von der cGKIβ phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt in COS Zellen zur Inhibierung der IP<sub>3</sub>-induzierten Kalziumfreisetzung und somit zur Verringerung von  $[Ca^{2+}]_i$  (**Abb. A-2**).

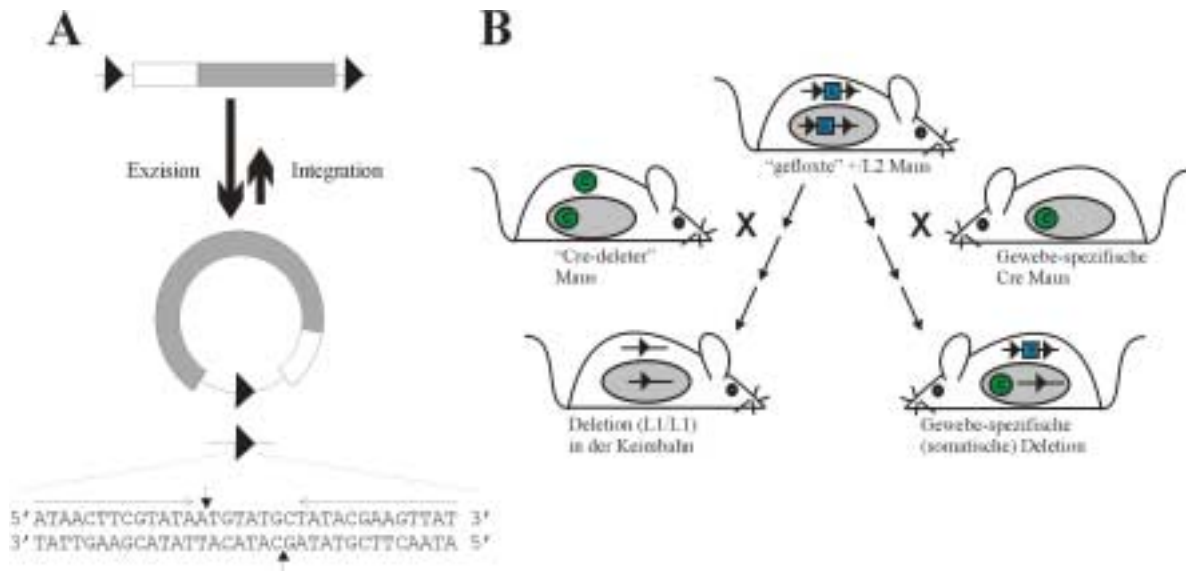
## A.2. Konditionale Mutagenese durch das Cre/lox System

Unser Verständnis von Genen und deren Funktionen wurde Ende des 20. Jahrhunderts erweitert, als es möglich wurde, das Genom der Maus mittels zufälliger Integration von Transgenen oder an vorbestimmten Stellen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES Zellen) zu modifizieren (Jaenisch, 1988; Capecchi, 1989). Letztere Technik ermöglicht eine gezielte und permanente Veränderung eines Gens bereits in der Keimbahn der Maus und wird somit auch an die Nachkommen weitervererbt. Diese Technik erlaubt allerdings nicht, das Genom sowohl gewebe- als auch zeitspezifisch zu verändern. Dies führt einige Nachteile mit sich. So kann sich ein verändertes Gen oder die Deletion eines Gens („Knockout“) in den verschiedensten Geweben auswirken, da in jeder einzelnen Zelle des Tiers das Gen modifiziert vorliegt. Außerdem können nur sehr begrenzt Aussagen über die zeitliche Aktivität des Gens gemacht werden, da sich die Veränderung bereits in der embryonalen Entwicklung bemerkbar machen kann. Häufig führt die Deletion eines Gens auch zu embryonaler Letalität, so dass die Funktion des Gens in adulten Mäusen nicht untersucht werden kann. Dies alles erschwert eine eindeutige Analyse des Phänotyps der genetisch modifizierten Maus. Um diese Nachteile zu überwinden, wurde die konventionelle Technik der Genommodifikation mit einem weiteren System, der Sequenz-spezifischen Rekombination, kombiniert. Dabei vermittelt eine Rekombinase den Austausch von Genabschnitten, die zwischen zwei kurzen DNS Erkennungssequenzen liegen. Das Rekombinationssystem, das heute am häufigsten verwendet wird, um das Genom von Mäusen zu modifizieren, ist das sogenannte Cre/lox System (Übersicht: Rajewsky et al., 1996; Sauer, 1998).

Die Cre („cyclization recombination“) Rekombinase ist ein 38 kDa Protein aus dem Bakteriophagen P1 und katalysiert die Rekombination zwischen zwei *loxP* („locus of crossing-over of P1“) Erkennungssequenzen. Aus dieser Cre-vermittelten seitenspezifischen Rekombination resultiert, je nach Ort und Orientierung der *loxP* Seiten, eine Inversion, Exzision bzw. Integration oder Translokation. Die Exzision von *loxP* flankierten („gefloxten“) DNS Bereichen wird am häufigsten für die *in vivo* Genommodifikation verwendet (**Abb. A-3A**) (Sauer, 1998; Metzger & Feil, 1999).

Um das Genom zu modifizieren, werden *loxP* Seiten gezielt in den gewünschten Genort mittels homologer Rekombination in ES Zellen eingebaut und dann durch Expression von *Cre* eine Rekombination verursacht. Rekombination zwischen *loxP* Sequenzen kann man *in vitro* in ES Zellen (Gu et al., 1993) oder *in vivo* in *Cre*-transgenen Mäusen (Lakso et al., 1992; Orban et al., 1992) erhalten. Nach Kreuzung mit einer sog. „Cre-deleter“ Maus, die *Cre* in allen Zellen, v.a. aber auch in den Keimzellen exprimiert, kann die rekombinierte DNS über die Keimbahn weitergegeben werden (**Abb. A-3B** links). „Cre-deleter“ Mäuse (z.B. CMV-Cre; Dupé et al., 1997; Schwenk et al., 1995) werden hauptsächlich verwendet, um „gefloxte“ Markergene zu entfernen oder Nullmutanten („Knockouts“) zu erzeugen

(Übersicht: Rajewsky et al., 1996). In manchen Fällen ist die Erzeugung eines Nullallels letal. Oft wäre eine Modifikation des Genoms (z.B. ein Gen-Knockout) aufschlussreicher, wenn man sie konditional, d.h. nur in einem bestimmten Zell- oder Gewebetyp und zu einem gewählten Zeitpunkt während des Lebens des Tieres induzieren könnte. Die meisten Strategien zur konditionalen somatischen Mutagenese in der Maus basieren heutzutage auf der gewebespezifischen Expression von *Cre* durch geeignete Promotoren (Abb. A-3B rechts).



**Abb. A-3 Das Cre/lox sequenzspezifische Rekombinationssystem.**

**A** Cre verursacht die Rekombination zwischen zwei 34 bp langen *loxP* Erkennungssequenzen (Dreiecke). 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** Rekombination zwischen *loxP* Sequenzen *in vivo* mittels *Cre*-transgenen Mäusen. Links: Durch Kreuzungen mit einer „Cre-deleter“ Maus und mehreren Verpaarungsschritten lässt sich ein Nullallel oder eine Deletion bereits in der Keimbahn erzeugen. Rechts: Durch Kreuzungen mit Mäusen mit gewebespezifischer Expression von *Cre* (graues Oval) lassen sich gewebespezifische (somatische) Deletionen erzeugen. +, Wildtyp Allel; L2, „gefloxtes“ Allel mit zwei *loxP* Stellen; L1, deletiertes Allel mit einer *loxP* Stelle.

### A.3. Zielsetzung

Die Gene für den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal und die cGMP-abhängige Kinase I wurden bereits durch konventionelle und konditionale (somatische) Mutagenese modifiziert (Seisenberger et al., 2000; Pfeifer et al., 1998) (siehe A.1). Dadurch konnten deren physiologische Funktionen bei der Kontraktion und Relaxierung glatter Muskelzellen untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit war es, das Gen für *IRAG* sowohl konventionell als auch konditional mit Hilfe des Cre/lox Systems (siehe A.2) zu modifizieren, um dessen Funktion *in vivo* untersuchen zu können. Die Strategie für diese Modifikation sah es vor, das Exon 12 des *IRAG* Gens mit zwei *loxP* Seiten zu flankieren. Dieses Exon codiert für den vorderen Bereich der sog. „coiled-coil“ Domäne des Proteins. Untersuchungen anderer Proteine

haben gezeigt, dass solche Domänen eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Proteinen untereinander spielen (Übersicht: Lupas, 1996; Burkhard et al., 2001). Da IRAG spezifisch sowohl mit der cGKI $\beta$  als auch mit dem IP<sub>3</sub> Rezeptor Typ I interagiert (Schlossmann et al., 2000), wurde angenommen, dass die „coiled-coil“ Domäne an wenigstens einer dieser Interaktionen beteiligt ist. Darum sollte zunächst das Exon 12 konventionell deletiert werden, um die Funktion der „coiled-coil“ Domäne im IRAG Protein untersuchen zu können. Zusätzlich sollte ein konditionales *IRAG* Allel, also ein „gefloxtes“ Exon erzeugt werden, um später die Möglichkeit zu haben, das Gen zeit- und gewebespezifisch (somatisch) modifizieren zu können.

## B. Material und Methoden

### B.1. Bakterien und Plasmide

#### B.1.1. Bakterienstämme

Die Amplifikation von Plasmiden erfolgte in den *Escherichia coli* Stämmen XL1-blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>d</sup>ZDM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*) und XL-1-blue MRF' ( $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>d</sup>ZDM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]$ ) (Stratagene)

#### B.1.2. Verwendete Plasmide

##### **pBluescript II KS +/-**

Das Plasmid pBluescript (Stratagene) wurde zur Subklonierung und Sequenzierung von DNS- Fragmenten verwendet. Es enthält das Ampicillinresistenzgen (*Amp<sup>r</sup>*) und den *E. coli* Replikationsursprung für eine hohe Kopienzahl.

##### **pBSloxPneotkloxP**

Das Plasmid stammt von pBluescript ab und enthält ein Neomycinresistenzgen (*neo*) und das Thymidinkinasegen (*tk*) aus dem Herpes simplex Virus Typ I. Der Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Fässler (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt und wurde für die Konstruktion des Targeting Vektors verwendet.

##### **pBSII SK + lox2**

Dieses Plasmid basiert ebenfalls auf pBluescript und enthält die *loxP* Rekombinationssequenz (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Robert Feil, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TU München). Mittels Restriktionsenzymen (B.2.4) wurde die *loxP* Sequenz ausgeschnitten, um sie in den Targeting Vektor einzusetzen.

##### **pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO (Invitrogen)**

Dieses Plasmid wurde zur Subklonierung von PCR-Produkten verwendet. Es enthält das Kanamycinresistenzgen (*Kan<sup>r</sup>*).

#### B.1.3. Nährmedien und Lösungen

Die Züchtung von Bakterien erfolgte in dem Vollmedium Luria-Bertani (LB). LB- und SOC-Medium wurden zur Sterilisation für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert, das LB-Medium bei Raumtemperatur und das SOC(-)-Medium bei -20°C gelagert. SOC-Medium wurde unter Zugabe von 50 µl MgCl<sub>2</sub> (1 M), 50 µl MgSO<sub>4</sub> (1 M) und 100 µl Glucoselösung (20%) zu 4,8 ml SOC(-)-Medium verwendet, um die mit pCR2.1 TOPO (Invitrogen) transformierten Bakterien nach der Elektroporation zu resuspendieren.

<b>Luria-Bertani- (LB-) Medium</b>		<b>SOC-Medium (-)</b>	
Trypton	10 g	Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g	NaCl	0,5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
± 15 g Agar		pH 7,0	
autoklavieren			
± 100 µg/ml Ampicillin			
bei 4°C lagern			

#### **1000x Ampicillin bzw. 500x Kanamycin**

100 mg/ml Ampicillin bzw. 50 mg/ml Kanamycin; sterilfiltrieren und portioniert bei -20°C lagern

Endkonzentration: 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin in LB-Medium

Zugabe zu LB-Flüssigmedium kurz vor dem Animpfen

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

### **B.1.4. Kultivierung**

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

### **B.1.5. Bestimmung der Zelldichte**

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

### **B.1.6. Transformation von Bakterien**

#### **B.1.6.1. Elektroporation**

Die Zellmembran von Bakterien wurde durch Anlegen von Hochspannung für DNS-Moleküle durchlässig gemacht. Die elektrokompenten Zellen wurden mit etwa 10 ng der rekombinanten Plasmid-DNS (B.2.6) gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser und Gene Controller von BioRad mit folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt:

Spannung: 2,5 kV; Kapazität: 25 µF; Widerstand: 200 Ω

Nach der Transformation wurden die Bakterien in LB-Medium (B.1.3), bzw. bei Verwendung des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kits (B.1.6.2) in SOC-Medium für 60 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde ein Aliquot auf LB-Platten, die ein der Resistenz



entsprechendes Antibiotikum enthielten, ausplattiert um die transformierten Bakterienklone zu selektieren.

### **B.1.6.2. Klonierung von PCR Produkten**

Zur Klonierung von PCR Produkten (B.2.9) wurde außerdem das TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen) verwendet. Der in diesem Kit enthaltene linearisierte Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 besitzt 3'-terminale Thymidinüberhänge. So ist eine effiziente Ligation eines PCR Produktes möglich, das einen 5'-terminalen Adeninüberhang enthält. Alternativ dazu gibt es einen TOPO TA Blunt Cloning<sup>®</sup> Kit für die Ligation von PCR Produkten ohne Adeninüberhänge. Bei der Ligasereaktion wird die Ligaseaktivität der im Kit enthaltenen Topoisomerase ausgenutzt, und so kann die Ligation innerhalb von 5 Min bei RT erfolgen.

#### Durchführung:

Etwa 10 ng PCR Produkt wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 4 µl gebracht und 1 µl pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO Vektor dazugegeben. Dieser Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Auf Eis wurde ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,5 M β-Mercaptoethanol und pro Transformation ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit "one shot<sup>™</sup> kompetenten Zellen" (Invitrogen) aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol zu den kompetenten Zellen wurde der Transformationsansatz vorsichtig durch Rühren mit der Pipettenspitze gemischt. 2 µl des Ligationsansatzes wurden zu den kompetenten Zellen pipettiert und diese dann 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für genau 30 s bei 42°C im Wasserbad wurde der Transformationsansatz weitere 2 min auf Eis inkubiert. Zur phänotypischen Expression und Selektion wurde der Ansatz nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium, bei 37°C für 30 min in horizontaler Lage auf einem Rundschtüttler inkubiert. Nach Beendigung der phänotypischen Expression wurden 100 µl und 200 µl des Transformationsansatzes auf die vorbereiteten Kanamycin-LB-Platten ausplattiert und diese dann bei 37°C ÜN inkubiert. Aus den Kanamycin-resistenten Bakterien wurde die Plasmid-DNS isoliert (B.2.1) und diese sequenziert (B.2.10).

## **B.2. Weitere molekularbiologische Methoden**

### **B.2.1. Isolierung von Plasmid-DNS**

Die Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birboim & Doly, 1979). Die Bakterien wurden in NaOH/SDS lysiert, wobei Proteine und DNS-Moleküle denaturieren. RNase A verdaut die freigesetzten RNS-Moleküle. Durch anschließende Neutralisation mit Natriumacetat renaturiert die relativ kleine Plasmid-DNS wieder und bleibt deshalb in Lösung, während das viel größere Bakterienchromosom denaturiert mit den übrigen Zelltrümmern, ausgefallenen Salzen und SDS abgetrennt werden kann. Nach Zentrifugation

wurde die Plasmid-DNS gefällt, getrocknet, in 50 µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Mit Aliquots der DNS wurde eine Restriktionsanalyse (B.2.4) durchgeführt.

Die Isolierung der BAC DNS erfolgte mit der gleichen Methode, jedoch unter Zugabe von Lysozym (1 µl einer 2,5 mg/ml Lösung) zur Bakteriensuspension vor deren Lyse.

Die Gewinnung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNS (mg Bereich) erfolgte ebenfalls durch alkalische Lyse, jedoch mit anschließender Säulenreinigung („Nucleobond AX“ Säulen, Macherey-Nagel).

## B.2.2. Isolierung von genomischer DNS und RNS aus Mausgewebe

### B.2.2.1. Isolierung von DNS

#### Lösungen:

##### Lysepuffer für Mausgewebe und ES Zellen

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

bei RT lagern

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

##### Proteinase K (Roche):

50 mg/ml TE (B.2.11)  
Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

Etwa 2 mm des Schwanzes von 10-14 Tage alten Mäusen (zur Genotypisierung) oder 50-100 mg Gewebe adulter Mäuse oder ES Zellen eines konfluent bewachsenen Lochs einer 96 Loch Platte wurden über Nacht in Lysepuffer (0,5-0,7 ml) bei 55°C inkubiert. Danach mit einem Volumen Phenol:Chloroform (1:1) extrahiert und zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm bei RT; Eppendorf Zentrifuge 5417C; Rotor: F 45-30-11). Die obere wässrige Phase wurde abgehoben, mit 100% Ethanol (1 ml) 5 min bei RT gefällt und 2x mit 70% Ethanol (1 ml) gewaschen. Die DNS wurde bei 37°C luftgetrocknet und in 50 µl (Schwanzbiopsien, kleinere Gewebeproben, ES Zellen) bis 300 µl (größere Gewebeproben) H<sub>2</sub>O gelöst. Die DNS wurde bei -20°C gelagert. Eine ca. 1:100 Verdünnung wurde für die Konzentrationsbestimmung eingesetzt (B.2.3). Je nach Gewebe konnten 0,5-10 µg DNS pro mg eingesetzten Gewebes gewonnen werden.

Alternativ dazu wurden die DNS wie folgt isoliert:

##### Lysepuffer:

10x <i>Taq</i> -Polymerase Puffer	5 µl
Proteinase K	1 µl
H <sub>2</sub> O	44 µl

Die Schwanzbiopsien wurden in 50 µl Lysepuffer für vier Stunden bei 55°C lysiert und anschließend 15 min bei 95°C die Proteinase inaktiviert. Von diesem Lysat wurde 1 µl für die PCR (B.2.9) eingesetzt.

### **B.2.2.2. Isolierung von RNS**

Alle benötigten Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> (0,05% Diethylpyrocarbonat in H<sub>2</sub>O; gut schütteln, 1 h bei RT inkubieren und autoklavieren) hergestellt.

Die Gewebe (50-100 mg) wurden in 1 ml „peqGold RNAPure™“ (Peqlab) mit einem UltraTurrax (IKA Werk) homogenisiert, 0,2 ml Chloroform zugegeben, geschüttelt, zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, RT; Eppendorf Zentrifuge 5417C; Rotor: F 45-30-11). Die obere wässrige Phase wurde danach abgehoben und die RNS mit 0,5 ml Isopropanol 5 min bei RT gefällt und anschließend zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde 2x mit 1 ml 75% Ethanol waschen, die RNS kurz luftgetrocknet, in 50-300 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gelöst und bei -80°C gelagert.

Zur Quantifizierung wurde eine ca. 1:100 Verdünnung eingesetzt (B.2.3).

Für die RT-PCR (B.2.9) wurde eine Verdünnung von 0,1 µg/µl hergestellt und davon 5 µl eingesetzt.

Je nach Gewebe konnten 0,5-10 µg RNS pro mg eingesetzten Gewebes gewonnen werden.

### **B.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD<sub>260</sub> von 1,0:

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

Die Reinheit von DNS und RNS kann aus dem Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> abgeschätzt werden. Dieser Quotient soll über 1,7 liegen.

### **B.2.4. Restriktionsenzyme**

Restriktionsendonukleasen bilden eine Klasse von bakteriellen Enzymen, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNS erkennen und spalten können. Die hier verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme spalten ihr DNS-Substrat innerhalb oder unmittelbar neben der meist palindromischen Erkennungssequenz. Bei der Spaltung entstehen entweder glatte Enden (blunt ends) oder einander komplementäre, 5'- bzw. 3'-überhängende Enden (sticky ends). Die DNS-Enden besitzen immer eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe, was die spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden ermöglicht. Der Restriktionsansatz wurde bei optimaler Temperatur für 1,5 h (analytischer Ansatz) bzw. 3-8 h (präparativer Ansatz) inkubiert und danach gelelektrophoretisch untersucht. Eine Einheit (1 U) Restriktionsendonukleaseaktivität entspricht der Menge an Enzym, die nötig ist, um 1 µg Test-DNS in einer Stunde unter optimalen Bedingungen vollständig zu schneiden. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind im Anhang (F.3) aufgelistet.

### B.2.5. Alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = calf intestine phosphatase) spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen von DNS-Molekülen ab. Linearisierte Vektoren wurden dephosphoryliert, um einen intramolekularen Ringschluss während der Ligation zu verhindern und so die Klonierungseffizienz von Fremd-DNS zu erhöhen. Das linearisierte Plasmid (etwa 5 pmol) wurde in 50 mM Tris pH 8,0 mit 1 U CIP (Roche) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms (10 min, 75°C) konnte die Vektor-DNS isoliert werden.

### B.2.6. T4-DNS-Ligase

Die T4-DNS-Ligase (NEB) katalysiert ATP-abhängig die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende von doppelsträngiger DNS oder RNS. Als Substrat dienen sowohl überhängende als auch glatte Enden. Ligase, linearisierter Vektor und Fremd-DNS wurden in Ligasepuffer gemischt und für 3-16 h bei RT inkubiert. Anschließend konnte das rekombinante Plasmid durch Transformation in *E. coli* (B.1.6) eingeschleust werden.

### B.2.7. Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten

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

#### Lösungen:

<b>10x TBE</b>		<b>Elektrophoresepuffer</b>
Tris-HCl, pH 8,0	0,5 M	1x TBE (1 Teil 10x TBE + 9 Teile H <sub>2</sub> O)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,5 M	
EDTA, pH 8,0	0,01 M	
bei RT lagern		
<b>Auftragspuffer (6x dye)</b>		<b>Ethidiumbromidstammlösung</b>
Ficoll Typ 400 (Sigma)	18%	10 mg/ml (Sigma) wässrig
EDTA, pH 8,0	0,12 mM	
TBE	6x	
Bromphenolblau (IBI)	0,1%	
Xylencyanol FF (Sigma)	0,1%	

### **B.2.7.1. Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten im Bereich von 0,2 bis 12 kb wurde die horizontale Gelelektrophorese in Agarosegelen (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. 1-2% (g/v) Agarose (Seakem LE, Biozym) wurden in 1x TBE im Mikrowellenherd aufgeschmolzen. Der Gellösung wurde vor dem Ausgießen in eine horizontale Kammer Ethidiumbromid zugegeben (finale Konzentration im Gel: 800 ng/ml). Die Elektrophorese erfolgte für 1-3 h bei konstanter Spannung von 100 V in einer Elektrophoresekammer mit 1x TBE als Laufpuffer.

### **B.2.7.2. Isolierung von DNS Fragmenten aus Agarosegelen**

Die DNS wurde mittels Ethidiumbromid im Agarosegel und durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert, die DNS-haltigen Gelstücke mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die DNS mit dem Reinigungskit „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert.

### **B.2.8. Synthese von Oligonukleotiden**

Die Herstellung von einzelsträngigen DNS Oligonukleotiden erfolgte durch die Firma MWG-Biotech, Grafing. 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.2.9. 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 Mausgeweben 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/ $\mu$ l, Roche)für RT-PCR vor Gebrauch 1+9 in H<sub>2</sub>O verdünnen**„Expand™ Long Template PCR System“**(3,5 U/ $\mu$ l, Roche; Gemisch aus Taq und Pwo DNS Polymerase)**M-MLV-Reverse Transkriptase** (200 U/ $\mu$ l, Gibco-BRL)vor Gebrauch 1+19 in H<sub>2</sub>O verdünnen

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

**Durchführung der PCR:**

Ansatz:	DNS (ca. 10 ng Plasmid oder 500 ng genomische DNS)	2,0 $\mu$ l
	Primer A (25 pmol/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
	Primer B (25 pmol/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
	10x PCR-Puffer (mit dNTPs)	2,0 $\mu$ l
	Taq-DNS Polymerase (5U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	15,4 $\mu$ l

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	

Die Standardbedingungen wurden je nach Größe der zu amplifizierenden DNS-Fragmente und Primersequenzen optimiert. Bei DNS-Fragmenten bis zu 2 kb konnte die Taq DNS Polymerase verwendet werden, für DNS-Fragmente über 2 kb sollte ein spezielles Gemisch aus Polymerasen („Expand™ Long Template PCR System“) benutzt und das Protokoll und die Puffer nach Angaben des Herstellers angepasst werden (B.2.9.1).

Die amplifizierten DNS-Fragmente, die für die Konstruktion von Plasmiden eingesetzt wurden, wurden nach ihrer Klonierung sequenziert (B.2.10), um mögliche Fehler der Polymerasen zu erkennen.

**Durchführung der RT-PCR:**

Ansatz:	RNS (0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	5,0 $\mu$ l
	Primer A (25 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
	Primer B (25 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
	10x PCR-Puffer (mit dNTPs)	5,0 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	34 $\mu$ l

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.2.9.1. Long Template PCR

Zur Aufklärung der genomischen Organisation des *IRAG*-Gens wurden lange DNS-Fragmente, die komplette Introns enthielten, amplifiziert und analysiert. Für diese PCR, bei der genomische DNS der Maus als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde, wurde das „Expand™ Long Template PCR System“ von Roche verwendet. Mit diesem Kit, der die thermostabile *Taq* und *Pwo* DNS-Polymerase enthielt, konnten DNS-Fragmente bis zu einer Größe von 27 kb aus genomischer DNS amplifiziert werden. Die Vorgehensweise entsprach der Standard-PCR.

Ansatz:	Primer A (25 pmol/µl)	1 µl
	Primer B (25 pmol/µl)	1 µl
	10x PCR-Puffer (1, 2, 3)	4,0 µl
	dNTPs (je 1,25 mM)	14,0 µl
	DNS (200 ng)	2,0 µl
	H <sub>2</sub> O	ad 40,0 µl
Enzymmix:	<i>Taq</i> + <i>Pwo</i> (3,5 U/µl)	0,75 µl
	10x PCR-Puffer 2	1,0 µl
	H <sub>2</sub> O	8,25 µl

**Tabelle B-1 Reaktionsschritte einer Long Template Polymerase-Kettenreaktion**

Phase	Initiale Denaturierung	Zyklus Nr.1-10	Zyklus Nr.11-35	Verlängerung (Extension)
Denaturierung	94°C, 2 min	93°C, 0,5 min	93°C, 0,5 min	72°C, 5 min
Primer-Anlagerung		57°C, 1 min	57°C, 1 min	
Polymerisation		68°C, 4 min	68°C, 4 min + 10 sec zusätzlich pro Zyklus	

### B.2.10. 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 Kapillar-

elektrophorese 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“ <sup>a</sup>	4 µl
	Primer (0,8 pmol/µl)	4 µl
	H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

<sup>a</sup>enthält „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	

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

Die getrocknete DNS wurde in 20 µl „Template Suppression Reagent“ (Perkin-Elmer Applied Biosystems) suspendiert und vor Analyse im Sequenzierautomaten 3 min bei 95°C denaturiert.

## B.2.11. 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 <sup>32</sup>P-markierten DNS-Sonde können DNS-Fragmente lokalisiert werden, die eine zur Sonde komplementäre Region enthalten.

### Lösungen:

#### Hybridisierungslösung (Church-Puffer)

1% BSA	5 g
0,5 M NaPhosphat-Puffer, pH 7,4	250 ml (1 M)
7% SDS	175 ml (20%)
1 mM EDTA pH 8,0	1 ml (0,5 M)
0,1 (mg/ml) ssDNA (Sigma)	5 ml (10 mg/ml)
bei RT lagern	ad 500 ml H <sub>2</sub> O

#### 10x TE

0,1 M Tris-HCl, 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 <sub>2</sub> O

#### Waschlösung

2 x SSC	50 ml (20x)
0,1% SDS	5 ml (10%)
bei RT lagern	ad 500 ml H <sub>2</sub> O

#### 20x SSC

3 M NaCl	175 g
0,3 M Natriumcitrat	88 g
bei RT lagern	ad 1 l H <sub>2</sub> O



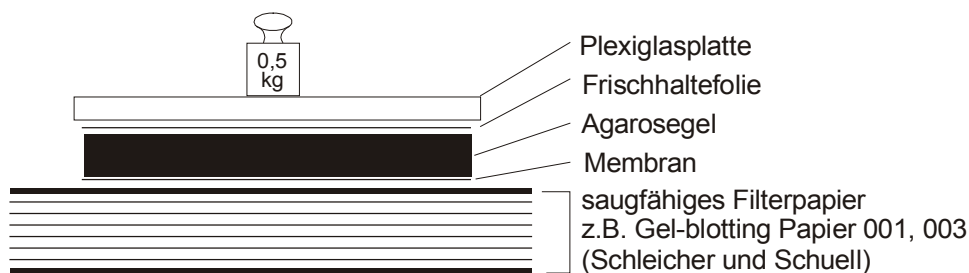
**50x TAE**

2 M Tris-HCl, pH 8,0	242 g
2 M HAc (Eisessig)	57,1 ml
100 mM EDTA, pH 8,0	37,2 g
bei RT lagern	ad 1 l H <sub>2</sub> O

**Durchführung:**

Die DNS wurde mit Restriktionsenzymen fragmentiert, durch Agarosegelelektrophorese (i.d.R. 0,8% Agarose in 1xTAE) aufgetrennt, mit Ethidiumbromid (1 mg/l H<sub>2</sub>O, Sigma, Deisenhofen) gefärbt und mit angelegtem Lineal fotografiert.

Zur Depurinierung wurde anschließend ca. 30 min in 0,1 N HCl (20 ml HCl<sub>konz.</sub> ad 1 l H<sub>2</sub>O) geschwenkt (Verfärbung des Farbmarkers Bromphenolblau nach gelb) und kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Denaturierung der DNS erfolgte durch Schwenken ca. 30 min in 0,5 N NaOH (50 ml 10 N NaOH ad 1 l H<sub>2</sub>O) (Verfärbung des Farbmarkers von gelb nach blau). Sofort danach wurde die DNS über Nacht auf die Trägermembran („Nytran-Plus“, Schleicher & Schuell) transferiert (**Abb. B-1**).



**Abb. B-1 Aufbau des Southern Blots.**

**Prähybridisierung:**

Nach dem Transferieren wurde der Blot abgebaut, die Geltaschen mit Bleistift markiert und die Membran wie gewünscht zugeschnitten. Zur Immobilisierung der DNS auf der Membran, wurde diese mit UV-Licht bestrahlt (Stratalinker, Stratagene) und 1 h bei 80°C getrocknet. Es wurden zwei Hybridisierungsverfahren angewendet: Hybridisierung im Hybridisierungsbeutel (Gibco-BRL) und Hybridisierung im Hybridisierungssofen (Mini Oven MKII; MWG-Biotech). Die Membran mit der immobilisierten DNS wurde mit 50 ml auf 60°C vorgewärmte Hybridisierungslösung in einem Hybridisierungsbeutel (Gibco-BRL) eingeschweißt und im Wasserbad für 3 h bei 60°C prähybridisiert. Die Hybridisierung der ES-Zell DNS erfolgte auch alternativ in Hybridisierungsrollen im Hybridisierungssofen. Die Vorteile dieses Verfahrens sind der Einsatz einer geringeren Menge Hybridisierungslösung und dementsprechend auch weniger Sonde. Die Membranen wurden ebenfalls 3 h bei 60°C prähybridisiert.

### **Herstellung $^{32}\text{P}$ -markierter DNS-Sonden durch „Random-Primed Labeling“:**

Die DNS-Sonde (ca. 100-1000 bp) wurde durch Restriktionsverdau aus einem Plasmid oder durch PCR gewonnen und über Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion („Qiaquick Gel Extraction Kit“, Qiagen) gereinigt. Etwa 200-400 ng DNS diente als Matrize zur Markierung mit dem „NEBlot™ Kit“ (New England Biolabs) nach Vorschrift des Herstellers mit  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ , Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH). Anschließend wurde die DNS durch Säulenchromatographie über eine „Nick™ Column“ (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH) nach Herstellerangaben von nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt und mit 400  $\mu\text{l}$  1xTE eluiert. Die Messung der spezifischen Aktivität der  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde erfolgte durch Szintillationszählung (ca.  $1 \times 10^5$  cpm/ $\mu\text{l}$ ).

### **Hybridisierung:**

Für die Hybridisierung wurde die  $^{32}\text{P}$ -markierte DNS-Sonde 5 min aufgekocht, sofort zu den prähybridisierten Membranen in die Hybridisierungstasche bzw. Hybridisierungsrolle gegeben (ca.  $8 \times 10^5$  cpm/ml Hybridisierungslösung) und über Nacht bei 60°C geschwenkt. Am nächsten Tag wurden die Membranen aus der Tasche bzw. Rolle genommen und mehrmals mit Waschlösung gewaschen. Dabei wurde die Temperatur solange gesteigert (auf 60-70°C), bis die Membranen nur noch wenig radioaktiv waren (Handmonitor unter 50 „Einheiten“ bzw. Raten pro Sekunde). Die Membranen wurden auf Filterpapier getrocknet und in Plastikfolie eingeschlagen. Die Detektion radioaktiver Signale erfolgte durch „Phosphoimaging“ (Raytest GmbH) (Exposition 4-24 h bei RT) und/oder durch Autoradiographie („Hyperfilm“, Amersham Pharmacia Biotech; Exposition 1-14 d bei -80°C mit Verstärkerfolie).

## **B.3. Transiente Transfektion von COS Zellen**

Zur Überprüfung der Funktionalität der in den Targeting Vektor eingesetzten *loxP* Sequenzen wurde der Targeting Vektor zusammen mit einem Cre-exprimierenden Plasmid in COS-7 Zellen (Kidney, African green monkey) transfiziert. Anschließend wurde aus den COS Zellen die Plasmid-DNS isoliert und mittels PCR (B.2.9) analysiert.

### **Medium:**

**DMEM** (siehe B.4.2)  
vor Gebrauch 10% FBS dazugeben  
**FBS** (siehe B.4.2)

### **Lösungen:**

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

### **Durchführung:**

COS-7 Zellen wurden ungefähr 24 Stunden vor der Transfektion auf Petrischalen verteilt (ungefähr  $3 \times 10^5$  Zellen pro Petrischale). Für zwei Transfektionsansätze wurden in zwei 4,8 ml Kryoröhrchen (Nunc) je 480  $\mu\text{l}$  2 x HBS vorgelegt. In einem 1,8 ml Kryoröhrchen

wurden für den Kontrollansatz 5 µg des Targeting Vektors und 10 µg Carrier-DNS (pUC18) zusammenpipettiert, für den zweiten Ansatz 5 µg des Targeting Vektors, 5 µg pUC18 und 5 µg eines Cre-exprimierenden Plasmids. Beide Ansätze wurden mit Wasser ad 420 µl aufgefüllt, anschließend wurden 60 µl CaCl<sub>2</sub> tröpfchenweise zu den DNS-Lösungen zugegeben. Beide Lösungen wurden dann ebenfalls tröpfchenweise zu dem vorgelegten HBS dazugegeben und zwischendurch vorsichtig gemischt. Die Lösungen wurden 15 min bei RT inkubiert, durch Vortexen gemischt und weitere 15 min bei RT inkubiert, bevor sie zu den COS Zellen in die Petrischalen getropft wurden. Die Zellen wurden ÜN bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 17 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und in frischem Medium zwei weitere Tage bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> inkubiert.

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

2 ml Trypsin/EDTA (Gibco-BRL) wurden auf den Zellrasen in einer Petrischale pipettiert und bis zum Ablösen der Zellen 5-10 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 4 ml Medium hinzugegeben, die Zellsuspension in ein Kunststoffröhrchen überführt und mit 1000 rpm 5 min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge; Rotor: Hermle Z320). Der Überstand wurde bis auf ca. 200 µl verworfen und das Pellet darin resuspendiert. 20 µl Quick Digest Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS, ProteinaseK 1 mg/ml) wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 5 µl der Zellsuspension dazugegeben. Die Lösung wurde zweimal 15 min bei 55°C inkubiert und zwischendurch durch Vortexen gemischt. Zum Schluss wurden 180 µl H<sub>2</sub>O dazugegeben und die Lösung 5 min bei 95°C gekocht. 1 µl der Lösung wurde für die PCR eingesetzt.

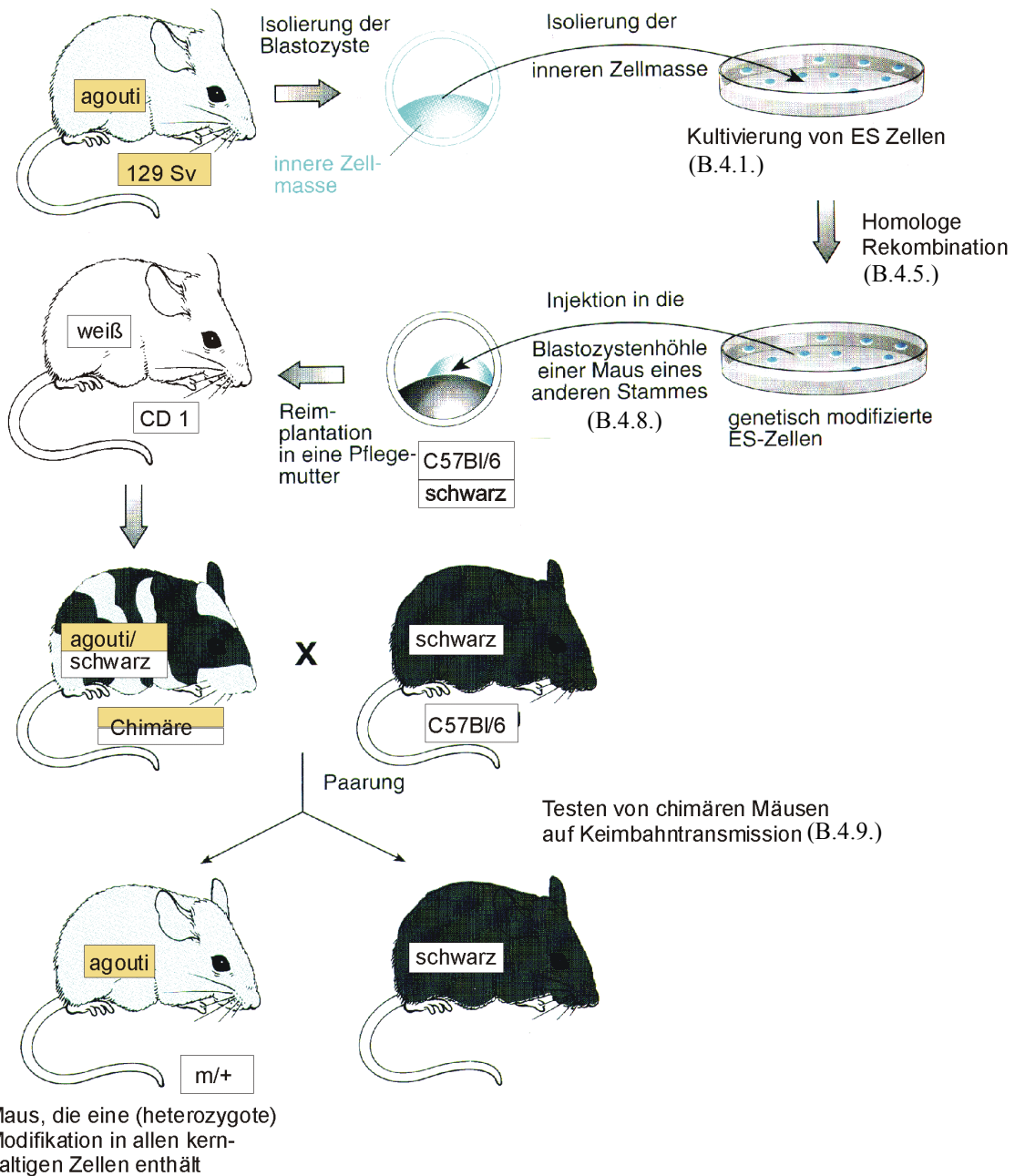
## **B.4. Erzeugung genetisch veränderter Mäuse**

Seit etwa 10 Jahren ist es möglich, durch „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 (Wassarmann & DePamphilis, 1993; Hogan et al., 1994; Schenkel, 1995; Torres & Kühn, 1997).

### **B.4.1. Kultivierung embryonaler 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-farbenen 129/Sv 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 durch homologe Rekombination in ES Zellen.**

modifiziert nach Strachan & Read, 1996; Weitere Erklärung im Text.

**B.4.2. Lösungen und Nährmedien**

**PBS**

- 135 mM NaCl                    4 g
- 3 mM KCl                        100 mg
- 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O        710 mg
- 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                 120 mg
- ad 500 ml H<sub>2</sub>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 (Gibco-BRL, Bestell-Nr. 31966), mit GlutamaxITM (Dipeptid L-Alanyl-L-Glutamin), 4500 mg/l D-Glukose und Natriumpyruvat, Lagerung bei 4°C

**FBS**

fötales bovines Serum (Gibco-BRL, 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

**LIF**

Maus Leukämie-inhibierender Faktor („ESGRO<sup>TM</sup>“, Gibco-BRL, 1x10<sup>7</sup> U/ml)

**500x LIF**

0,5x10<sup>6</sup> 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 (Gibco-BRL Bestell-Nr. 11811-064)

**100x G418**

40 mg/ml PBS, Aliquots à 5 ml bei -20°C lagern

**GANC**

Cymeven®/Ganciclovir-Natrium (Roche)

**10<sup>4</sup>x GANC**

20 mM (50 mg/10 ml H<sub>2</sub>O), Aliquots à 50 µl bei -20°C lagern

**Tabelle B-2 Medium für die ES Zellkultur**

Medium	Komponente	Volumen	Endkonzentration
<b>EF-Medium<sup>a</sup></b> (für Feederzellen) (bei 4°C max. 1 Monat lagern)	DMEM	450 ml	90%
	FBS	50 ml	10%
<b>ES-Medium<sup>a</sup></b> (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	0,4 mg/ml
	10 <sup>4</sup> x GANC	50 µl	2 µM

<sup>a</sup> keine Antibiotika/Antimykotika zusetzen

**Tabelle B-3 Gefäße für die Zellkultur**

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

### **B.4.3. 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<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet (freundlicherweise von Herrn Prof. M. Biel, Department Pharmazie, LMU München zur Verfügung gestellt). Aus einem Embryo konnten Feederzellen für die Kultivierung in 2 Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) 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 cm<sup>2</sup>) auf 150-300 cm<sup>2</sup> ausgesät werden.

### **B.4.4. Allgemeines Vorgehen bei der Kultivierung von ES Zellen**

#### **B.4.4.1. Auftauen und Aussäen von Gefrierkulturen**

Das Auftauen der Kulturen in den Kryoröhrchen erfolgte im 37°C Wasserbad und der Inhalt (1 ml) wurde in 4 ml ES-Medium aufgenommen, zentrifugiert (5 min, 1000 rpm; Eppendorf Zentrifuge; Rotor: Hermle Z320) und die Zellen in ES-Medium suspendiert. Der Inhalt eines Kryoröhrchens (entsprach 12,5 cm<sup>2</sup> der geernteten 75 cm<sup>2</sup> Flasche) konnte i.d.R. auf 25 cm<sup>2</sup> ausgesät werden.

#### **B.4.4.2. Kultivierung**

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> in ES-Medium. Am Abend vor dem Aussäen der ES Zellen wurden Feederzellen aufgetaut (B.4.4.1) und in ES-Medium ausgesät. Am nächsten Morgen wurden ES Zellen in ES-Medium auf die Feederzellen ausgesät. Jeden Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

Bei 60-80% Konfluenz wurden die Zellen passagiert: Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst (5-10 min bei 37°C), 1-2 Volumen ES-Medium zugegeben, suspendiert, zentrifugiert (5 min, 1000 rpm) und auf das 3-fache der „abgeernteten“ Fläche ausgesät (1:3 „Splitting“). Bei jedem Ablösen mit Trypsin stieg die Passagenzahl.

Je nach Kulturgefäß bzw. Fläche wurden verschiedene Volumina an Medium und Trypsin benötigt (**Tabelle B-3**).

#### **B.4.4.3. Anlegen von Gefrierkulturen**

Die Zellen einer ca. 80% konfluenten Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) wurden mit 3 ml Trypsin abgelöst (5-10 min bei 37°C), 3 ml ES-Medium zugegeben, suspendiert, zentrifugiert

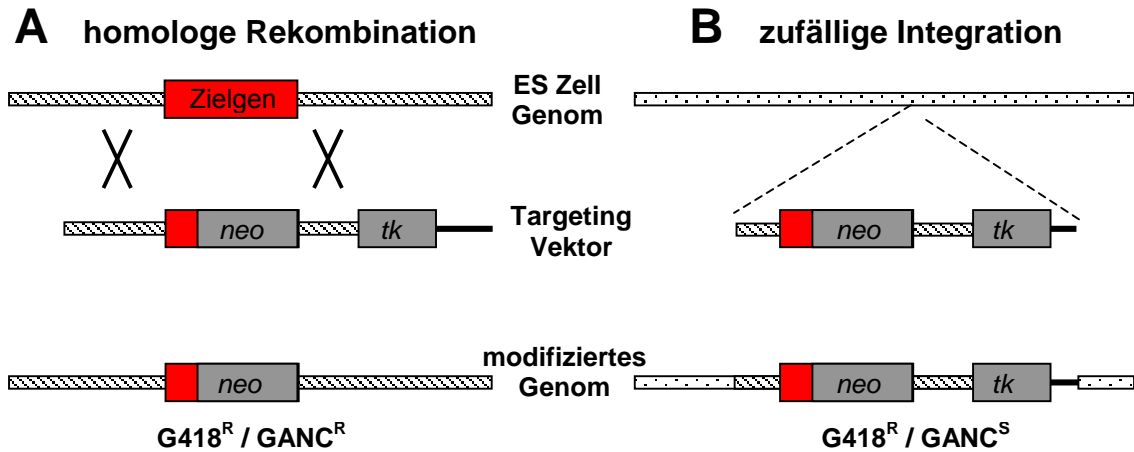
(5 min, 1000 rpm; Eppendorf Zentrifuge 5804 R, Rotor: Hermle Z320). Die Zellen wurden dann in 6 ml Einfriermedium (90% ES-Medium + 10% DMSO) aufgenommen, Aliquots à 1 ml in Kryoröhrchen abgefüllt, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren (ca. 24h) und in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### **B.4.5. 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  $\geq 3$  kb; kurzer Arm  $\geq 1$  kb).

Für das „Targeting“ von ES Zellen muss ein Zeitraum von 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 500 bis 1000 Klone isolieren (siehe unten) und analysieren (B.4.6).





**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<sup>R</sup>, resistent gegenüber G418; GANC<sup>R</sup>, resistent gegenüber GANC; GANC<sup>S</sup>, sensitiv gegenüber GANC. Weitere Erklärung im Text.

#### B.4.5.1. Vorbereitung der DNS

25-50 µg der Targeting Vektor DNS wurden durch Restriktionsverdau mit *NotI* linearisiert, mit Ethanol gefällt, unter einer Sterilbank getrocknet, in 100 µl PBS gelöst (konnte bei -20°C gelagert werden), mit Hilfe eines Agarosegels DNS-Konzentration abgeschätzt. 2-5 pmol (entspricht ca. 20-50 µg eines 15 kb Konstrukts) linearisierte DNS wurde für die Elektroporation (B.4.5.3) eingesetzt.

#### B.4.5.2. Vorbereitung der ES Zellen

Wie unter B.4.4.1 beschrieben, wurden die ES Zellen aufgetaut, auf 25 cm<sup>2</sup> Flasche ausgesät (Passagenzahl notiert), auf eine 75 cm<sup>2</sup> Flasche passagiert und bis 60-80% Konfluenz wachsen gelassen (dauert 3-6 Tage). Die Zellen einer 75 cm<sup>2</sup> Flasche waren für 1-2 Elektroporationen ausreichend. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin abgelöst (5-10 min bei 37°C), suspendiert, nach Zugabe von 7 ml ES-Medium erneut zentrifugiert (5 min, 1000 rpm) und in 10 ml PBS resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Gesamtzellzahl betrug etwa 1x10<sup>7</sup> Zellen. Die Zellsuspension wurde ein letztes Mal zentrifugiert (5 min, 1000 rpm). Das Pellet wurde in 0,9 ml PBS resuspendiert.

#### B.4.5.3. Elektroporation

Der linearisierte, in 0,1 ml PBS gelöste Targeting Vektor wurde der Zellsuspension zugegeben. Die Suspension wurde gemischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben.

Elektroporationsbedingungen („Gene Pulser<sup>TM</sup>“ ohne „Pulse Controller“, BIO-RAD):

Spannung: 0,23 kV

Kapazität: 500  $\mu$ F

es sollte sich eine Zeitkonstante von ca. 5 ms ergeben

Anschließend wurden die Zellen 5 min bei RT stehen gelassen, in 9 ml ES-Medium übergeführt, suspendiert und je 1 ml auf 10 Petrischalen (55 cm<sup>2</sup>) mit Feederzellen in ES-Medium verteilt.

#### **B.4.5.4. Selektion mit G418**

24 h nach der Elektroporation wurde mit der Neomycinselektion begonnen. Zur Selektion wurde G418 mit einer finalen Konzentration von 400  $\mu$ g/ml dem Nährmedium zugesetzt. Das Medium wurde bei allen Petrischalen täglich gewechselt.

Massives Absterben der nicht resistenten Zellen setzte i.d.R. 4-6 Tage nach der Elektroporation ein. G418 resistente Zellklone waren leicht an ihren klaren Umrissen zu erkennen.

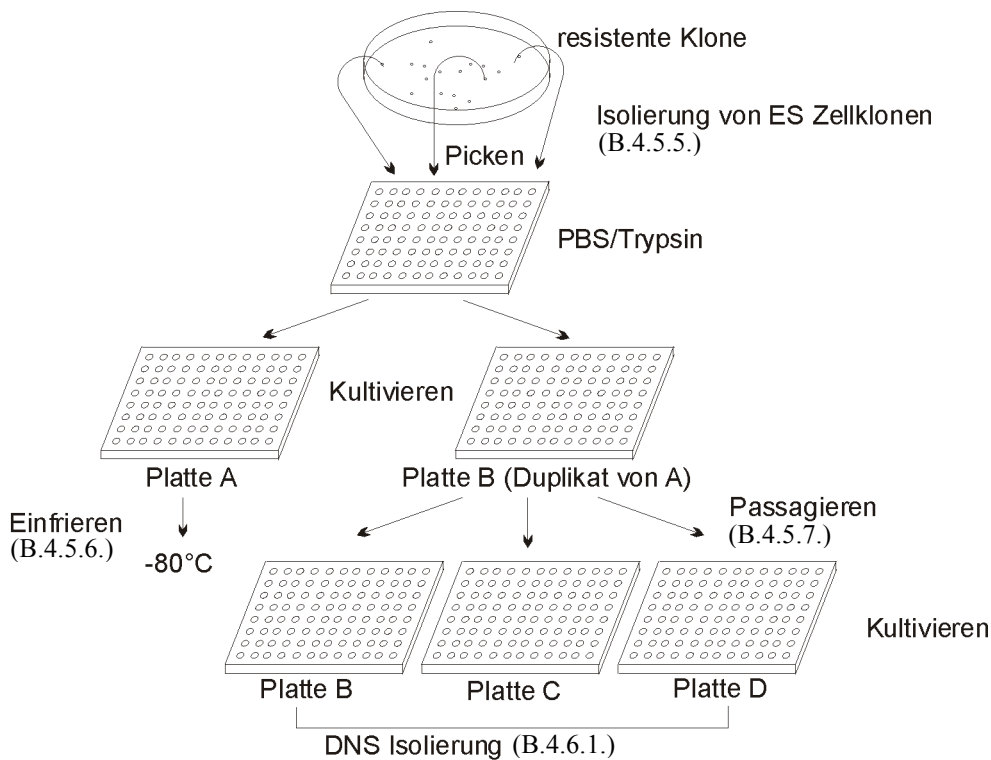
#### **B.4.5.5. Isolierung von ES Zellklonen**

Je nach Zielgen und Konstrukt erhält man 500-1500 G418 resistente Klone. Das Vorgehen zur Isolierung von ES Zellklonen ist in **Abb. B-4** gezeigt. Die Klone werden isoliert und auf zwei 96 Loch Platten (A, B) dupliziert. Platte A wird bei 70-80% Konfluenz eingefroren (in Nährmedium + 10% DMSO), 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.4.6). Die gewünschten ES Zellklone werden schließlich aus der eingefrorenen Platte A wieder in Kultur genommen und für die Injektion in Blastozysten (B.4.8) bzw. für die Cre-vermittelte Rekombination (B.4.7) verwendet.

Die ersten Klone konnten 7-9 Tage nach der Elektroporation gepickt werden. Je nach Wachstum der Zellen konnte man das Picken alle 1-2 Tage wiederholen werden (bis zu 3 Mal). Die Klone waren mit bloßem Auge auf dem Boden der Petrischalen zu erkennen. Pro Tag konnten 100-300 Klone isoliert werden. Am Morgen wurden Feederzellen in ES/G418-Medium in 96 Loch Platten ausgesät (150  $\mu$ l) und 2 Platten pro 96 gepickte Klone vorbereitet (Platte A und B). Zum Picken der Klone wurden 96 Loch Platten mit PBS (30  $\mu$ l) vorbereitet. Das Picken der Klone erfolgte mit einer 20  $\mu$ l Pipette (auf 2  $\mu$ l eingestellt) durch Ablösen vom Boden der Petrischalen und Überführen in je ein Loch der Platte mit PBS bis die Platte voll ist (**Abb. B-4**). 30  $\mu$ l 2x Trypsin wurden dazugegeben, 10 min bei 37°C inkubiert, suspendiert, 60  $\mu$ l ES/G418-Medium zugegeben und nochmals suspendiert. Je 60  $\mu$ l suspendierte Zellen wurden auf die zwei Platten mit Feederzellen (Platte A und B) verteilt und wachsen gelassen (**Abb. B-4**), am nächsten Tag Medium gewechselt. Bei 60-80% Konfluenz (3-4 Tage nach dem Picken) wurde die Platte A eingefroren (B.4.5.6) und Platte B auf 3 weitere 96 Loch Platten (B, C, D) passagiert (B.4.5.7 und **Abb. B-4**).

Beim Picken wurde außerdem auf folgendes geachtet:

Das verwendete Stereomikroskop („Stemi SV6“, Zeiss) wurde unter einer Sterilbank aufgebaut, wobei Klone am besten im Dunkelfeld bei etwa 25-facher Vergrößerung gepickt werden konnten. Die ausgewählten Klone waren mit bloßem Auge erkennbar, mit klar umrissenem, hellem Rand, nicht ausgefranst (differenziert) und deutlich vereinzelt (keine Mischklone). Um jeden Klon wurde mit der Pipettenspitze ein Kreis gezogen und möglichst die gesamten Zellen eines Klons mit der Pipette aufgenommen, sonst wuchs der gleiche Klon erneut an. Für jeden Klon wurde eine neue Pipettenspitze verwendet.



#### Abb. B-4 Vorgehen zur Isolierung von ES Zellklonen.

Resistente ES Zellklone werden isoliert und auf zwei 96 Loch Platten (A, B) dupliziert. Platte A wird bei 70-80% Konfluenz eingefroren (in Nährmedium + 10% DMSO) und Platte B wird zur DNS Isolierung vervielfältigt (Platten B, C, D). Weitere Erklärung im Text.

#### B.4.5.6. Einfrieren

Das Medium von Platte A wurde abgekippt, die Zellen mit PBS gewaschen ( $180\ \mu\text{l}$ ), mit  $30\ \mu\text{l}$  Trypsin abgelöst (10 min bei  $37^{\circ}\text{C}$ ),  $180\ \mu\text{l}$  Einfriermedium (90% ES-Medium + 10% DMSO, frisch angesetzt) zugegeben und suspendiert. Anschließend wurde die Platte mit Autoklavierband verschlossen, langsam eingefroren (1-3 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### B.4.5.7. Passagieren

In zwei 96 Loch Platten (Platte C und D, ohne Feederzellen) wurden je 150 µl ES-Medium vorgelegt, das Medium von Platte B abgekippt, die Zellen mit PBS gewaschen (180 µl), mit 30 µl Trypsin abgelöst (10 min bei 37°C), 120 µl ES-Medium zugegeben und suspendiert. Danach wurde je 50 µl aus Platte B in Platte C und D zugegeben. Die Platte B wurde mit 150 µl ES-Medium aufgefüllt (**Abb. B-4**) und die Zellen bis zu 100% Konfluenz wachsen gelassen (3-4 Tage). Das Medium von Platten B, C und D wurde dann abgekippt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und getrocknet. Die DNS Isolierung erfolgte sofort (B.4.6.1) oder die Platten wurden bei -20°C gelagert.

### B.4.6. Identifizierung genetisch modifizierter ES Zellen

Die korrekte Integration des DNS Konstrukts wurde mit Hilfe von Southern Blot (B.4.6.2) oder PCR Analyse (B.2.9) überprüft. Der Zeitaufwand von der Isolierung der DNS (B.4.6.1) bis zur Identifizierung der korrekt modifizierten ES Zellklone betrug je nach Anzahl der gepickten Klone 2-4 Wochen.

#### B.4.6.1. Isolierung von DNS aus 96 Loch Platten

##### Lösungen:

##### Lysepuffer für 96 Loch Platten

10 mM NaCl	1 ml (5 M)
10 mM Tris-HCl, 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 <sub>2</sub> O
+ 0,25 mg/ml Proteinase K (immer frisch zugeben)	

##### EtOH/NaCl

pro Platte 10 ml 100% EtOH (eiskalt) + 150 µl 5M NaCl

##### Proteinase K (Roche)

50 mg/ml 1xTE (B.2.11)  
Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

##### Durchführung:

Die 96 Loch Platte wurde mit 50 µl Lysepuffer über Nacht bei 55°C inkubiert und mit Parafilm und Frischhaltefolie verschlossen (Verdunstungsgefahr). Am nächsten Tag wurde die Platte nach dem Abkühlen auf RT geöffnet, die DNS durch Zugabe von 100 µl EtOH/NaCl 1h bei RT gefällt (DNS haftet an der Plastikoberfläche) und danach die Platte vorsichtig aber zügig über eine Ecke abgekippt. Nach 2-3x waschen mit 70% Ethanol (100 µl), wurde die Platte schräg mit der Öffnung nach unten aufgestellt und ca. 1h bei RT getrocknet. Für die Southern Blot Analyse wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt bzw. für die PCR Analyse die DNS in H<sub>2</sub>O gelöst (B.2.9). Die getrocknete oder gelöste DNS konnte bei -20°C gelagert werden.

### B.4.6.2. Southern Blot Hybridisierung

Der Restriktionsverdau erfolgte direkt in den 96 Loch Platten (B.4.6.1). Dazu wurde der Enzymmix auf die getrocknete DNS gegeben und über Nacht inkubiert.

<b>Enzymmix</b> (pro Loch):	Puffer	5,0 µl
	100x BSA	0,5 µl
	Restriktionsenzym (10-50 U/µl)	1,0 µl
	H <sub>2</sub> O	43,5 µl

Der Southern Blot und die Hybridisierung wurde wie unter B.2.11 beschrieben durchgeführt.

### B.4.7. Cre-vermittelte Rekombination in ES Zellen

Zur Cre-vermittelten Rekombination wurde in den ES Zellen, welche das Neomycinresistenzgen und das Thymidinkinasegen nach erfolgter homologer Rekombination enthielten, die Cre Rekombinase exprimiert. Ziel dieser Rekombination war es, die beiden „geflochten“ Selektionsmarkergene (siehe A.2 und **Abb. C-2**) zu entfernen. Eine Selektion auf dieses Rekombinationsereignis war durch die Zugabe von Ganciclovir zum Nährmedium möglich. Ganciclovir ist ein Nukleosid-Analogon, das zum Kettenabbruch bei der DNS Replikation führt. Es wird nur von der Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus phosphoryliert und führt nur bei den Zellen zum Absterben, die das Thymidinkinasegen enthalten.

ES Zellklone, bei denen die homologe Rekombination (siehe B.4.5 „erstes ES Zell Targeting“) erfolgreich war, wurden aufgetaut und in einem Loch einer 6 Loch Platte in ES Medium kultiviert. Dazu wurden die 96 Loch Platten mit den positiven Klonen bei 37°C inkubiert, bis alle Löcher aufgetaut waren und die Klone in je ein Loch einer 6 Loch Platte mit Medium überführt. In die 6 Loch Platte wurden, wiederum vor dem Aussäen der ES Zell Klone, Feederzellen ausgesät. Der Klon wurde mehrere Tage inkubiert und mehrmals aufgeteilt (B.4.4.2), bis eine 75 cm<sup>2</sup> Flasche für die Elektroporation ausreichend bewachsen war. Vor der Elektroporation wurden Petrischalen vorbereitet und Feederzellen darin ausgesät (B.4.5.2). Insgesamt wurden 1x10<sup>7</sup> Zellen mit dem *Cre*-exprimierenden Plasmid pIC-*Cre* (20 µg) wie in B.4.5.3 elektroporiert. Mit dem Plasmid pIC-*Cre* wurde die Cre Rekombinase unter der Kontrolle des Herpes simplex Virus Thymidinkinase (HSV *tk*) Promotors exprimiert (freundlicherweise von Herrn Dr. Robert Feil zur Verfügung gestellt). Nach der Elektroporation wurden Petrischalen mit unterschiedlicher Zellkonzentrationen ausgesät (1 x 10<sup>6</sup> Zellen, 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen 0,1 x 10<sup>6</sup> Zellen, 1 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Petrischale). 48 h nach der Elektroporation wurde mit der Ganciclovir Selektion begonnen. Dazu wurde das Medium gewechselt, und die Zellen mit Ganciclovir-haltigem Medium (0,2 µM im Medium) kultiviert. 10 bzw. 11 Tage nach der Elektroporation wurden Ganciclovir resistente ES Zellklone, wie unter B.4.5.5 beschrieben, isoliert und in 96 Loch Platten kultiviert. Weitere 4 Tage später wurden die ES Zellklone eingefroren (B.4.5.6) bzw.

passagiert (B.4.5.7). Nach der DNS Isolierung (B.4.6.1) wurden die ES Zell Klone mittels Southern Blot (B.4.6.2) analysiert.

#### **B.4.8. Injektion genetisch modifizierter ES Zellen in Blastozysten**

Die in dieser Arbeit verwendeten ES Zellen stammten aus dem Mausstamm 129/Sv (*agouti*). Das Fell dieser Mäuse ist agouti-farben („gelb“). Diese 129/Sv ES Zellen wurden in die Blastozysten schwarzer C57BL/6 Mäuse injiziert. In **Abb. B-2** ist die Vorgehensweise der Herstellung genetisch modifizierter Mäuse dargestellt. Die Blastozysten wurden am Tag 3,5 *post coitum* aus den Weibchen isoliert. Die C57BL/6 Weibchen wurden deshalb mit C57BL/6 Männchen verpaart. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf einen sichtbaren vaginalen Pfropf (plug) hin untersucht. War dieser Pfropf vorhanden, befand sich das Weibchen im Falle einer Befruchtung am Tag 0,5 der Schwangerschaft. 3 Tage später wurden aus diesen positiven Weibchen die Blastozysten isoliert. Die genetisch modifizierten ES Zellen wurden jetzt in diese Blastozysten injiziert.

Anschließend wurden diese Blastozysten in scheinchwangere Weibchen, die als Leihmütter (foster) fungierten, reimplantiert. Die scheinchwangeren Weibchen erhielt man durch Verpaarung mit vasktomierten Männchen. Sowohl die Blastozysteninjektion als auch die Reimplantation wurde von Frau Dr. Susanne Kühbandner durchgeführt (Kühbandner, 2001: Induzierbare Cre-vermittelte Rekombination im glatten Muskel der Maus; Hogan et al., 1994). Als Leihmütter wurde der Mausstamm CD-1 verwendet. Da auch die Leihmütter vor der Reimplantation der Blastozysten im richtigen Schwangerschaftsstadium sein mussten, wurden sie mit vasktomierten FVB Männchen verpaart. Am nächsten Morgen wurden auch diese Weibchen dem „plug check“ unterzogen. „Plug-positiven“ Weibchen wurden ungefähr 2,5 Tage später die Blastozysten in den Uterus eingesetzt. Befanden sich unter den Nachkommen chimäre Tiere, deren Fellfarbe gelb und schwarz gemischt war, so war die Injektion der modifizierten ES Zellen und die Reimplantation der Blastozysten erfolgreich.

##### **B.4.8.1. Vorbereitung der ES Zellen für die Injektion**

Die ES Zellen wurden 7-9 Tage vor Injektion in Kultur genommen (B.4.4). Dazu wurden die eingefrorenen 96 Loch Platten mit ES Zellklonen (**Abb. B-4**, Platte A) bei 37°C aufgetaut, der Inhalt aus jedem Loch, das einen korrekten ES Zellklon enthielt, direkt in ein Loch einer 24 Loch Platte ausgesät und in ES-Medium auf Feederzellen wachsen gelassen. Nach 1-2 Tagen wurde das Medium gewechselt. Bei 60-80% Konfluenz (nach 3-5 Tagen) wurden die Zellen in 6 Loch Platten passagiert (B.4.4.2), bei 60-80% Konfluenz der 6 Loch Platten (nach ca. 3 Tagen) wurden die Zellen in unterschiedlicher Dichte (1:3 und 1:10 „Splitting“) in 6 Loch Platten passagiert (B.4.4.2), um sicher zu gehen, dass zum Zeitpunkt der Injektion genügend Zellen zur Verfügung standen. Von den restlichen Zellen wurden

Gefrierkulturen angelegt (pro Loch einer 60-80% konfluenten 6 Loch Platte 2-3 Kryoröhrchen, B.4.4.3).

Am Injektionstag wurden die Zellen aus einem Loch einer 6 Loch Platte (ca. 60% konfluent, nicht differenziert) mit Trypsin abgelöst und in 3-5 ml ES-Medium aufgenommen. 1-1,5 ml davon wurde für die Injektion benötigt (B.4.8), den Rest für DNS Präparation verwendet (B.2.2.1) um den Genotyp der ES Zellen nochmals überprüfen zu können.

Die ES Zellen für die Injektion (1-1,5 ml) wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (2 min, 1000 rpm; Eppendorf Zentrifuge; Rotor: F 45-30-11), der Überstand bis auf ca. 50 µl abgehoben und die Zellen in den verbleibenden 50 µl gut suspendiert. Die Zellen sollten am besten sofort injiziert werden, wenn nötig für maximal 1-2 h bei 4°C gelagert werden.

#### **B.4.9. 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. Da die ES Zellen von agouti-farbenen 129/Sv Mäusen abstammen, kann deren Anteil leicht am Fell abgelesen werden. 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-farbenem 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-farbene Nachkommen bezüglich ihres Genoms heterozygot (129/Sv/C57BL/6), d.h. je ein Allel stammt aus dem 129/Sv bzw. C57BL/6 Genom. Das Genom jeder agouti-farbenen Maus muss daraufhin analysiert werden, ob bezüglich der eingeführten genetischen Veränderung das Wildtyp (+) oder das mutierte (m) Allel von der Chimäre weitergegeben wurde.

Für diese Analyse wurden Schwanzbiopsien von agouti-farbenen Tieren entnommen und DNS isoliert (B.2.2.1). Anschließend wurden mittels PCR (B.2.9) und/oder Southern Blot Analyse (B.2.11) die Tiere identifiziert, die auf einem Allel die genetische Mutation enthielten (+/m). Die heterozygoten (+/m) Tiere wurden untereinander verpaart, um zu homozygoten (m/m) Tieren zu gelangen .

#### **B.4.10. 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; Tierversuchsgenehmigung AZ: 211-2531-120/99 vom 15.03.00). 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<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Jahre) gesetzt. Die Nachkommen wurden mit 10-14 Tagen durch PCR Analyse (B.2.9) von Schwanzbiopsien genotypisiert, im Alter von 3-4 Wochen von der Mutter abgesetzt und dabei Männchen und Weibchen getrennt.

Die Inzuchtstämme C57BL/6 (C57BL/6N Crl BR) und FVB/N (FVB/N Crl BR) sowie der Auszuchtstamm CD-1 [Crl:CD<sup>®</sup>-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).



## C. Ergebnisse

Im Verlauf dieser Arbeit wurden genetische Modifikationen schrittweise in das Genom von ES Zellen bzw. Mäusen eingeführt. Um einen geeigneten Targeting Vektor konstruieren zu können, der die gewünschten Veränderungen im *IRAG* Gen trägt, wurde zunächst eine Restriktionskarte im Bereich des Zielexons des *IRAG* Gens erstellt (**Abb. C-1**).

### C.1. Charakterisierung der BAC-Klone

Exon 12 des *IRAG* Gens sollte mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems deletiert werden. Dieses Exon codiert für den vorderen Bereich der „coiled-coil“ Domäne (**Abb. C-2**). Um eine Cre/loxP-vermittelte Deletion zu ermöglichen, musste das Exon von zwei, in derselben Orientierung vorliegenden, *loxP* Sequenzen flankiert werden. Die Insertion beider *loxP* Sequenzen erfolgte innerhalb der Introns 5' und 3' des Zielexons, um das Exon/Intron Spleißen möglichst nicht zu beeinflussen. Deshalb war eine genaue Kenntnis der genomischen Exon/Intron Organisation im Bereich von Exon 12 und der benachbarten Exons notwendig. Bei der Firma *Genome Systems* wurden BAC-Klone bestellt, die das *IRAG* Gen enthielten. Durch partielle Restriktion von genomischer DNS erhielt man DNS Fragmente von 50-240 kb, welche in einem sog. BAC (Bacterial Artificial Chromosome) eingebaut und in *E. coli* vervielfacht wurden. Auf diese Art und Weise erhielt man eine BAC Bibliothek, die das gesamte Genom auf viele BAC-Klone aufgeteilt hatte. Je nach Restriktion und Fragmentgröße war ein Gen 1-3 Mal in dieser Bibliothek vorhanden. Das Screening einer solchen BAC Bibliothek erfolgte über PCR. Ein geeignetes Protokoll zur Amplifizierung des Exons 10 aus genomischer DNS wurde ausgearbeitet und der Firma zusammen mit den Primern zugesandt. Eine genomische BAC Bibliothek aus 129/Sv ES Zellen wurde mit diesen Exon Primern durchsucht. *Genome Systems* fand zwei verschiedene BAC-Klone mit unterschiedlich großen Inserts des *IRAG* Gens. Die DNS wurde aus den Bakterien wie unter B.2.1 beschrieben isoliert. Zunächst wurde mittels PCR aus gereinigter BAC-DNS das Vorhandensein verschiedener Exons auf den Inserts der Plasmide überprüft. Beide BAC-Klone enthielten mindestens die Exons 1 bis einschließlich 15 auf ihren Inserts.

#### C.1.1. Long Template PCR

Zur Aufklärung der Exon/Intron Struktur in der Region um Exon 12 wurde die Long Template PCR von der Firma Roche zur Hilfe genommen (B.2.9.1). Es wurden Primer verwendet und Intron-überspannende PCR Ansätze durchgeführt. Die verwendeten Primerpaare und die verschiedenen PCR Ansätze mit den dazugehörigen Introngrößen sind in **Tabelle C-1** aufgeführt, die Sequenzen der Primer im Anhang (F.1).

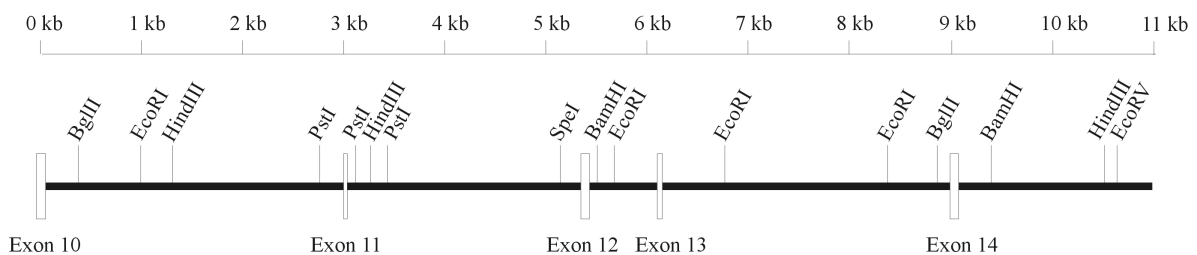
**Tabelle C-1 Primerpaare mit den dazugehörigen amplifizierten Sequenzen und ihrer Größe**

Primerpaar	Amplifizierte Sequenz	Gesamtgröße	Introngröße
AA27 + AA41	Exon 10 bis 11	~ 3,15 kb	~ 3,1 kb
AA40 + AA30	Exon 11 bis 12	~ 2,6 kb	~ 2,43 kb
AA29 + AA31	Exon 12 bis 13	~ 0,75 kb	~ 0,65 kb
AA32 + AA39	Exon 13 bis 14	~ 3,0 kb	~ 2,9 kb
AA33 + AA38	Exon 14 bis 15	~ 7,1 kb	~ 6,9 kb

Die Exon/Intron Struktur, die amplifizierten Größen sowie die ermittelte Sequenz stimmte mit der vom Sanger Institute (Internet: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) unter der Ensembl gene ID ENSMUSG00000005611 veröffentlichten Sequenz des Gens auf dem Chromosom 7 der Maus überein.

### C.1.2. Restriktionskarte

Mittels PCR, Restriktions- und Southern Blot Analysen konnte für die Umgebung der Exons 10 bis 14 folgende Exon/Intron Struktur und eine Restriktionskarte (**Abb. C-1**) erstellt werden.



**Abb. C-1 Partielle Restriktionskarte des *IRAG* Gens.**

## C.2. Konstruktion des Targeting Vektors

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

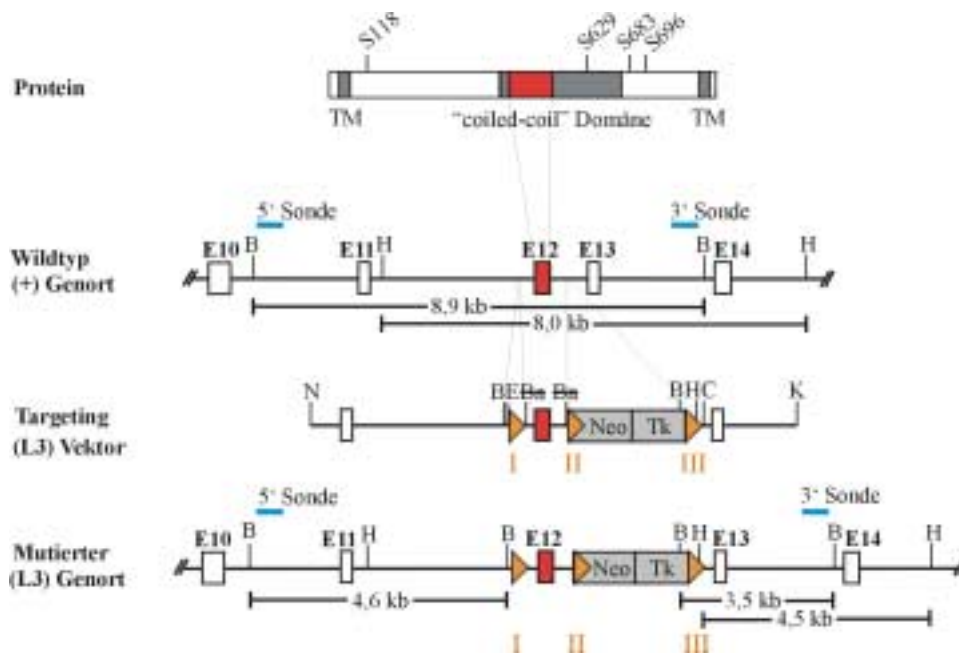
### C.2.1. Merkmale des Targeting Vektors

Die Einführung der Mutationen in das Genom von ES Zellen erfolgte über homologe Rekombination. Ein Targeting Vektor mit den gewünschten Mutationen wurde mittels Elektroporation in die ES Zellen eingebracht. Über homologe Rekombination wurde die Mutation in das Genom der Zellen integriert. Um die Deletion des Exons 12 über die Cre Rekombinase zu ermöglichen, musste das Exon innerhalb des Vektors von zwei *loxP*

Sequenzen flankiert („gefloxt“) werden, die in der selben Orientierung eingesetzt wurden (**Abb. C-2**). Da die Effizienz der homologen Rekombination in eukaryotischen Zellen sehr niedrig ist, wurde dem Targeting Vektor zusätzlich ein Selektionsmarker eingesetzt, über den rekombinante ES Zellklone selektiert werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Selektionsmarker verwendet, der ein Neomycinresistenzgen und eine Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus Typ I enthielt. Um mögliche Auswirkungen der Expression dieser Selektionsgene auf den Phänotyp der mutierten Maus zu vermeiden, wurde das Markergen ebenfalls von zwei gleichgerichteten *loxP* Sequenzen flankiert. Dadurch war es möglich, den Marker mit Hilfe der Cre Rekombinase später wieder aus dem Genom der ES Zellen zu entfernen (Torres & Kühn, 1997). In dieses Plasmid wurde zunächst über die Restriktionsschnittstellen *NotI* und *BamHI* eine dritte, einzelne *loxP* Seite eingefügt. Die Orientierung dieser *loxP* Seite entsprach dabei den beiden *loxP* Seiten des Selektionsmarkers. Der homologe 3' Arm, der homologe 5' Arm und das mittlere Fragment, welches zwischen die einzelne *loxP* Sequenz und den „gefloxt“ Selektionsmarker eingesetzt werden sollte, wurden mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer besaßen an den 5' Enden Restriktionsschnittstellen über welche sie in das Plasmid eingesetzt wurden (F.1, F.3). Außerdem wurde die einzelne *loxP* Seite sowie der „gefloxt“ Selektionsmarker mit einem Abstand von je 450-500 bp 5' und 3' des Exons 12 in das jeweilige Intron eingesetzt, so dass es möglichst zu keinem Spleißfehler kommen konnte. Zuerst wurde der homologe 3' Arm über die Schnittstellen *ClaI* und *KpnI* in das Plasmid eingesetzt, dann das mittlere Fragment über *BamHI/BglIII*, wodurch beide Schnittstellen zerstört wurden und zuletzt der 5' homologe Arm über *NotI*. Die homologen Vektorarme hatten auf der 5' gelegenen Seite eine Größe von ungefähr 3,5 kb und auf der 3' gelegenen Seite eine Größe von ungefähr 2 kb (**Abb. C-2**). Der gesamte Vektor hatte eine Größe von etwa 15,5 kb. Die Primer und deren Sequenzen sind im Anhang aufgeführt (F.1).

### **C.2.2. Gensonden zum Nachweis der homologen Rekombination in ES Zellen**

Zur eindeutigen Identifizierung, ob die Mutationen an der richtigen Stelle im Genom der ES Zellen integriert wurden, wurden sowohl für den 5' Bereich als auch für den 3' Bereich Gensonden ausgewählt, die für Southern Blot Hybridisierungen verwendet werden konnten (**Abb. C-2**). Die Gensonden wurden mittels PCR hergestellt und bestanden aus Intronsequenzen, die sich außerhalb des Targeting Vektors befanden. Die 5' Sonde hatte eine Größe von 0,4 kb und wurde mit den Primern AA75 und AA76 (F.1) amplifiziert. Die 3' Sonde hatte ebenfalls eine Größe von 0,4 kb, und wurde mit den Primern AA86 und AA87 (F.1) amplifiziert. Für das zweite Targeting wurde zusätzlich eine interne Sonde verwendet, welche mit den Primern AA55 und AA31 (F.1) amplifiziert wurde. Diese lag zum Teil auf dem Exon 13.



**Abb. C-2 Strategie des Targetings und zum Nachweis der homologen Rekombination.**

Oben: Primärstruktur des IRAG Proteins mit der „coiled-coil“ Domäne, putative Transmembran-domänen (TM) und Phosphorylierungsstellen (S, Serin). Darunter der Wildtyp Genort, der Targeting Vektor und der mutierte Genort nach erfolgter homologer Rekombination. Gelbe Dreiecke: *loxP* Sequenzen I, II und III, die den Selektionsmarker (Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus Typ I und Neomycinresistenzgen) und das Exon 12 (rotes Rechteck) flankieren; weiße Rechtecke: benachbarte Exons; E10-E14: Exon 10-Exon 14; blaue Linien: Gensonden zum Nachweis der Modifikationen; B, *Bgl*II; H, *Hind*III; N, *Not*I; E, *Eag*I; Ba, *Bam*HI (durch Ligation mit *Bgl*II zerstört); C, *Cla*I; K, *Kpn*I Schnittstelle; L3, drei *loxP* Sequenzen.

### C.3. Transiente Transfektion in COS Zellen

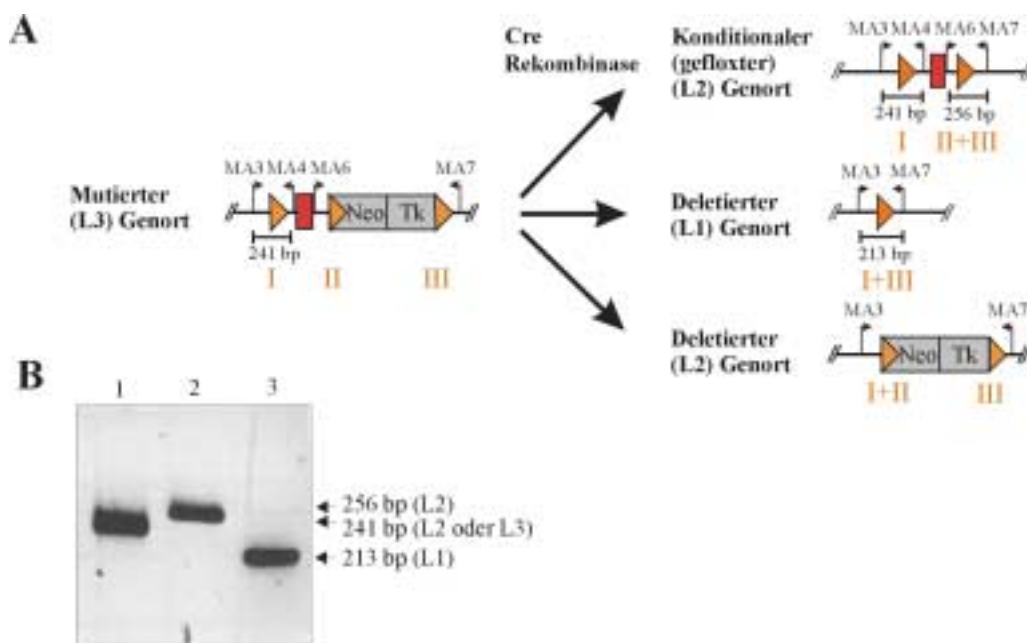
Die Funktionalität der drei eingesetzten *loxP* Sequenzen wurde vor dem Beginn des ES Zell Targetings *in vitro* überprüft. Dazu wurden COS-7 Zellen transient transfiziert. In einem Kontrollansatz wurde der Targeting Vektor (5 µg) zusammen mit pUC18 (10 µg) transfiziert. In einem zweiten Ansatz wurde der Targeting Vektor (5 µg) zusammen mit dem *Cre*-exprimierenden Plasmid pIC-*Cre* (5 µg) und pUC18 (5 µg) transfiziert. Nach Inkubation der COS Zellen über Nacht bei 37°C wurde die DNS wie unter B.3 beschrieben isoliert. Die nach der *Cre*-vermittelten Rekombination stattgefundenen Ereignisse wurden mittels PCR (B.2.9) analysiert. In **Tabelle C-2** sind die verwendeten Primerpaare (siehe Anhang F.1) und je nach Rekombinationsereignis die erwarteten Bandengrößen angegeben. In den Spuren 1 bis 3 (**Abb. C-3B**) sind die PCR Ansätze der COS-7 Zellen aufgetragen, die mit einem *Cre*-exprimierenden Plasmid transfiziert wurden.

### Tabelle C-2 Primerpaare zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination

Die erwarteten PCR Bandengrößen sind angegeben.

Spur	Rekombinationsereignis	Primerpaar	Größe des PCR Produkts
1	Keine bzw. loxP II + III	MA3 + MA4	241 bp
2	loxP II + III	MA6 + MA7	256 bp
3	loxP I + III	MA3 + MA7	213 bp

Die zugrundeliegende PCR Strategie ist in **Abb. C-3A** dargestellt. Ein Aliquot jedes PCR Ansatzes wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, und die Banden konnten nach Ethidiumbromidfärbung unter UV Licht detektiert werden (**Abb. C-3B**).



### Abb. C-3 PCR Strategie zur Detektion der Cre-vermittelten Rekombination.

**A** Das Primerpaar MA3 + MA4 detektiert die *loxP* Seite I. Dies ist nur möglich, wenn kein Rekombinationsereignis zwischen *loxP* I und II stattgefunden hat. Das Primerpaar MA6 + MA7 detektiert nur das Ereignis zwischen *loxP* II und III und das Primerpaar MA3 + MA7 detektiert das Ereignis zwischen *loxP* I und III. Das Rekombinationsereignis zwischen *loxP* I und II wurde mit dieser Strategie nicht nachgewiesen. **B** Amplifizierte PCR-Banden, die auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. In den Spuren 1 bis 3 sind Aliquots der unterschiedlichen PCR Ansätze der Zellen aufgetragen, die mit einem *Cre*-exprimierenden Plasmid transfiziert wurden: Spur 1 (MA3 + MA4), Spur 2 (MA6 + MA7), Spur 3 (MA3 + MA7). L3, L2, bzw. L1 enthält drei, zwei, bzw. eine *loxP* Sequenz.

Aufgrund der drei *loxP* Seiten im Targeting Vektor waren drei Rekombinationsereignisse möglich, welche mittels PCR nachgewiesen werden konnten (**Abb. C-3**). Das Primerpaar MA3 + MA4 bildete nur dann ein PCR Produkt, wenn keine Rekombination zwischen *loxP* I und II stattgefunden hatte, anderenfalls konnte der Primer MA4 nicht binden. Die sichtbare Bande (Spur 1 auf dem Agarosegel) entsprach der erwarteten Größe von 241 bp. Das Primerpaar MA6 + MA7 liefert nur ein PCR Produkt bei einer Rekombination zwischen *loxP* II + III. Die Bandengröße von 256 bp entsprach ebenfalls der erwarteten

Größe (Spur 2). Bei diesem Rekombinationsereignis wurde nur der Selektionsmarker deletiert. Bei einer Rekombination der *loxP* Seiten I + III werden sowohl der Selektionsmarker als auch das Exon 12 deletiert. Dies ließ sich mit den Primern MA3 + MA7 nachweisen, die ein PCR-Produkt von der erwarteten Größe ergaben (213 bp, Spur 3). Eine Rekombination zwischen *loxP* I und II, also die Deletion des Exons 12, nicht aber des Selektionsmarkers, wäre auch möglich. Dies wurde aber nicht untersucht, da dieses Ereignis, falls es beim späteren zweiten Targeting (C.4.2) vorkommen sollte, irrelevant war. Die Transfektion mit dem Targeting Vektor ohne das *Cre*-exprimierende Plasmid wurde ebenfalls mittels PCR untersucht. Dabei ließen sich die Rekombinationen zu einem geringen Anteil ebenfalls nachweisen (nicht gezeigt). Dies lag aber an einer nicht *Cre*-vermittelten Rekombination, die manchmal in Zellsystemen vorkommen kann (Dr. Robert Feil, persönliche Mitteilung). Die Funktionalität der drei eingesetzten *loxP* Seiten in den Targeting Vektor konnte mit diesem Versuch bestätigt werden. Ebenfalls konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass die verschiedenen *Cre*-vermittelten Rekombinationsereignisse mittels PCR spezifisch nachgewiesen werden konnten. Dies war eine wichtige Voraussetzung für spätere Genotypisierungen mittels PCR.

## **C.4. Genetische Modifikation der ES Zellen**

Unter „Gene Targeting“ in ES Zellen (ES Zell Targeting) versteht man den Schritt bei dem der Targeting Vektor zunächst durch Elektroporation in die ES Zellen eingebracht wird und dann die auf dem Vektor befindlichen Mutationen zielgerichtet über homologe Rekombination in das ES Zellgenom integriert werden. Für den erfolgreichen Verlauf eines „Gene Targetings“ in ES Zellen müssen optimale Voraussetzungen gewährleistet sein. Embryonale Stammzellen sind pluripotent, d.h. sie sind noch nicht differenziert. Dieser undifferenzierte Zustand muss für die spätere Keimbahngängigkeit der ES Zellen unbedingt erhalten bleiben. Das wird einerseits durch die Zugabe von Leukämie-inhibierendem Faktor (LIF) ins Nährmedium (B.4.2) erreicht und andererseits durch einen Zellrasen aus Feederzellen, auf dem die ES Zellen wachsen können. Als Feederzellen wurden embryonale Fibroblasten verwendet, die aus Embryos am Tag 14,5 *post coitum* hergestellt worden sind. Die Präparation und Kultivierung der Feederzellen ist unter B.4.3 beschrieben.

### **C.4.1. Homologe Rekombination (Erstes Targeting)**

Die für das Targeting verwendeten R1 ES Zellen der 11. Passage wurden zunächst in entsprechendem Nährmedium (B.4.2) und auf einem dichten Zellrasen aus Feederzellen kultiviert. Nach zweimaligem Passagieren waren ausreichend ES Zellen vorhanden, um das Targeting durchzuführen. Zum Zeitpunkt der Elektroporation befanden sich die Zellen in der 13. Passage. Der Targeting Vektor wurde vor der Elektroporation mit *NotI* linearisiert

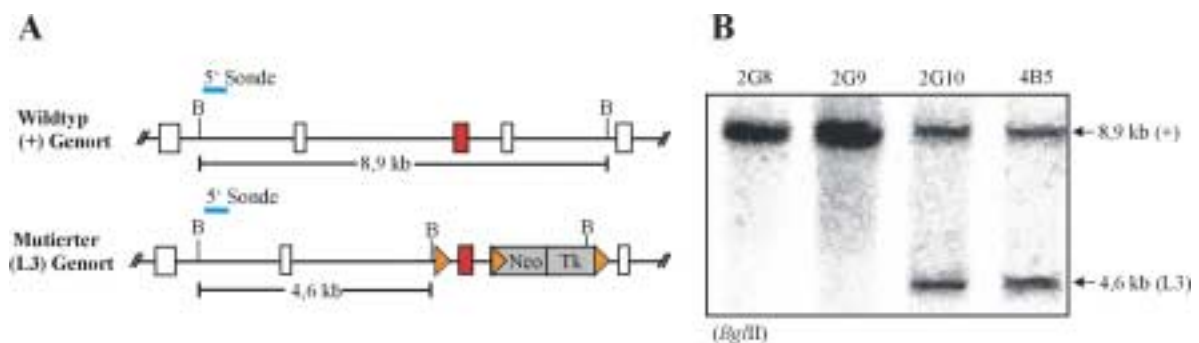
und unter der Sterilbank mit Ethanol präzipitiert (B.4.5.1). Für die Elektroporation der ES Zellen wurden 30 µg linearisierter Vektor verwendet. 24 Stunden nach der Elektroporation begann die Selektion. Dem Nährmedium wurde ab diesem Zeitpunkt G418 (400 µg/µl) zugegeben (B.4.5.4). Etwa vier Tage nach der Elektroporation setzte die Selektion ein und die nicht G418 resistenten ES Zellen begannen abzusterben. Nach acht Tagen wurden die ersten G418 resistenten ES Zellklone isoliert und jeder Klon auf zwei 96 Loch Platten aufgeteilt und weiter unter Selektionsdruck kultiviert (B.4.5.5). Weitere G418 resistente Klone wurden am 9. und am 11. Tag nach der Elektroporation isoliert und ebenfalls in 96 Loch Platten unter Selektionsdruck kultiviert. Insgesamt wurden etwa 1200 G418 resistente ES Zellklone isoliert. Etwa vier Tage nach der Isolierung hatten sich die ersten Klone in den 96 Loch Platten ausreichend vermehrt, um sie weiter für die DNS-Analyse und zum Einfrieren aufzuteilen (B.4.5.6, B.4.5.7).

#### C.4.1.1. Analyse der ES Zellklone mittels Southern Blot

Die DNS der ES Zellklone wurden mittels Restriktionsenzymen, Agarosegelelektrophorese und Southern Blot Hybridisierung analysiert. Die Durchführung ist unter B.2.11 beschrieben.

##### C.4.1.1.1. Hybridisierung mit der 5' Sonde

Die Nylonmembranen mit der darauf befindlichen, mit *Bgl*II geschnittenen DNS der Klone wurden zunächst mit der 5' Sonde hybridisiert. Nach einem erfolgreichen Targeting wurde folgendes Bandenmuster erwartet: Im Wildtyp detektiert die 5' Sonde ein 8,9 kb großes Fragment des *IRAG* Gens. Nach Integration der einzelnen *loxP* Seite und der ihr angeschlossenen *Bgl*II Restriktionsschnittstelle in das *IRAG* Gen verkleinert sich die Bande auf 4,6 kb. Positive ES Zellklone sollten also nach der Southern Blot Hybridisierung zwei Banden aufweisen, eine bei 8,9 kb für das Wildtyp Allel und eine bei 4,6 kb für das mutierte Allel (**Abb. C-4**).



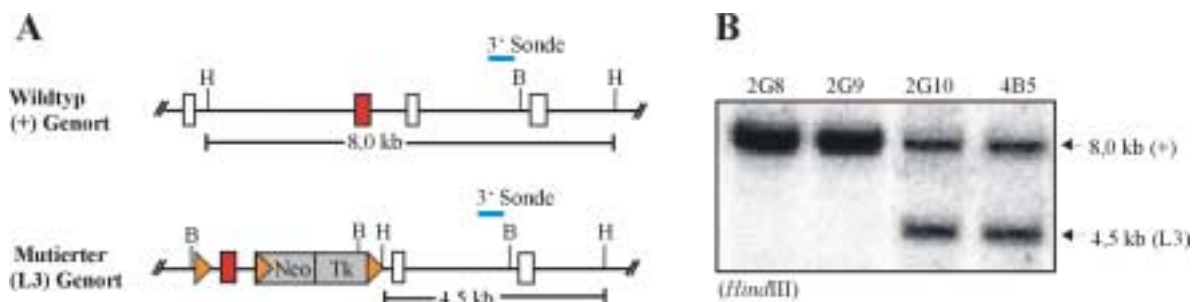
**Abb. C-4 Southern Blot Hybridisierungen mit der 5' Sonde zum Nachweis der homologen Rekombination.**

**A** Erwartete Größen der beiden Genorte. **B** Southern Blot Hybridisierung von *Bgl*II geschnittener genomischer ES Zell DNS. Die Bande bei 8,9 kb entspricht dem Wildtyp, die Bande bei 4,6 kb dem mutierten Genort nach Integration der einzelnen *loxP* Seite 5' des Exons 12. Die angegebenen Nummern entsprechen den jeweiligen ES Zellklonen. B, *Bgl*II Schnittstelle.

Insgesamt wurde die DNS von 1200 isolierten Klonen analysiert. Zwei Klone (4B5 und 2G10) hatten die einzelne *loxP* Seite an der richtigen Stelle im ES Zellgenom integriert. Gezeigt sind zwei weitere Klone, bei welchen die Integration nicht im *IRAG* Gen stattgefunden hat.

#### C.4.1.1.2. Hybridisierung mit der 3' Sonde

Alle isolierten ES Zellklone hatten den Selektionsmarker in ihrem Genom integriert, da sie sonst nicht in Anwesenheit von G418 wachsen konnten. Um nun zu überprüfen, welche dieser Klone den Selektionsmarker in dem gewünschten *IRAG* Genort trugen, wurde eine weitere Southern Blot Hybridisierung durchgeführt. In diesem Fall wurde mit der 3' Sonde hybridisiert. Die Vorgehensweise war genauso wie unter C.4.1.1.1 beschrieben, jedoch wurde die DNS mit dem Restriktionsenzym *Hind*III geschnitten. Das erwartete Bandenmuster sollte wie folgt aussehen. Der Wildtyp Genort entspricht einer Bande von 8,0 kb, die sich bei richtiger Integration im mutierten Genort auf 4,5 kb verkleinert. Der Grund dafür ist eine zusätzlich eingesetzte *Hind*III Schnittstelle unmittelbar 3' vom Selektionsmarker. Die Ergebnisse der Southern Blot Hybridisierung sind in **Abb. C-5** dargestellt.



**Abb. C-5 Southern Blot Hybridisierungen mit der 3' Sonde zum Nachweis der homologen Rekombination.**

**A** Erwartete Größen der beiden Genorte. **B** Southern Blot Hybridisierung von *Hind*III geschnittener genomischer ES Zell DNS. Die 8,0 kb Bande entspricht dem Wildtyp, die 4,5 kb Bande dem mutierten Genort nach der Integration des Selektionsmarkers an der vorhergesehenen Stelle im Genom der ES Zellen. Gezeigt sind neben zwei positiven Klonen auch zwei Klone, bei denen die Integration nicht im *IRAG* Genort stattgefunden hat. B, *Bgl*I; H, *Hind*III Schnittstellen.

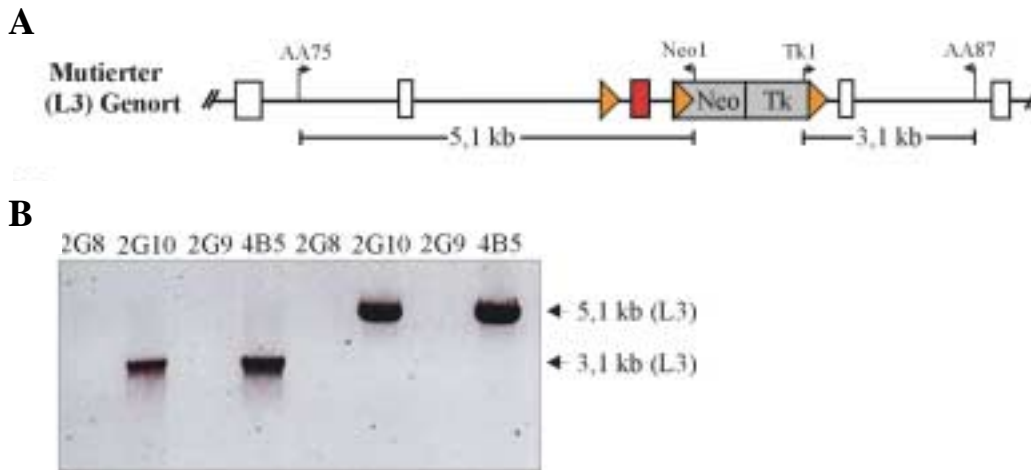
Die Southern Blot Hybridisierung mit der 3' Sonde ergab, dass genau die beiden Klone, welche mit der 5' Sonde positiv waren, auch den Selektionsmarker auf dem gewünschten Genort im ES Zellgenom trugen. Aufgrund der drei vorhandenen *loxP* Seiten auf einem Allel wurden diese beiden Klone auch als „+/L3“ bezeichnet.

#### C.4.1.2. Analyse der ES Zellklone mittels Long-Range-PCR

Zusätzlich wurden diese beiden positiven Klone sowie zwei bei der Southern Blot Analyse negativen Klone mittels Long-Range-PCR (B.2.9.1) analysiert. Für diese PCR Strategie wurden zwei Primerpaare so ausgewählt, dass je einer der beiden Primer innerhalb des



Targeting Vektors gebunden hat (Neo1 und Tk1) und der andere außerhalb des Vektors, aber innerhalb des *IRAG* Locus (AA75 und AA87) (**Abb. C-6A**). Aliquots der PCR wurden anschließend mit einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden mit Ethidiumbromid und UV-Licht sichtbar gemacht (**Abb. C-6B**).



#### **Abb. C-6 Nachweis der homologen Rekombination durch Long-Range-PCR.**

**A** Long-Range-PCR Strategie mit den entsprechenden Primern. **B** Agarosegelelektrophorese der PCR-Reaktionen: Spur 1-4 mit den Primern Tk1 + AA87, Spur 5-8 mit den Primern AA75 und Neo1.

Beide Primerpaare lieferten Amplifikate der erwarteten Größen bei den Southern Blot-positiven (2G10, 4B5), aber nicht bei den Southern Blot-negativen Klonen (2G8, 2G9). Tk1 + AA87 ergaben eine Bande bei etwa 3,1 kb und AA75 + Neo1 bei etwa 5,1 kb. Der Primer AA75 wurde außerdem für die Amplifikation der 5' Sonde und der Primer AA87 für die Amplifikation der 3' Sonde verwendet. Mit dieser PCR-Strategie konnte somit ebenfalls die korrekte Integration des Vektors in das *IRAG* Gen nachgewiesen werden.

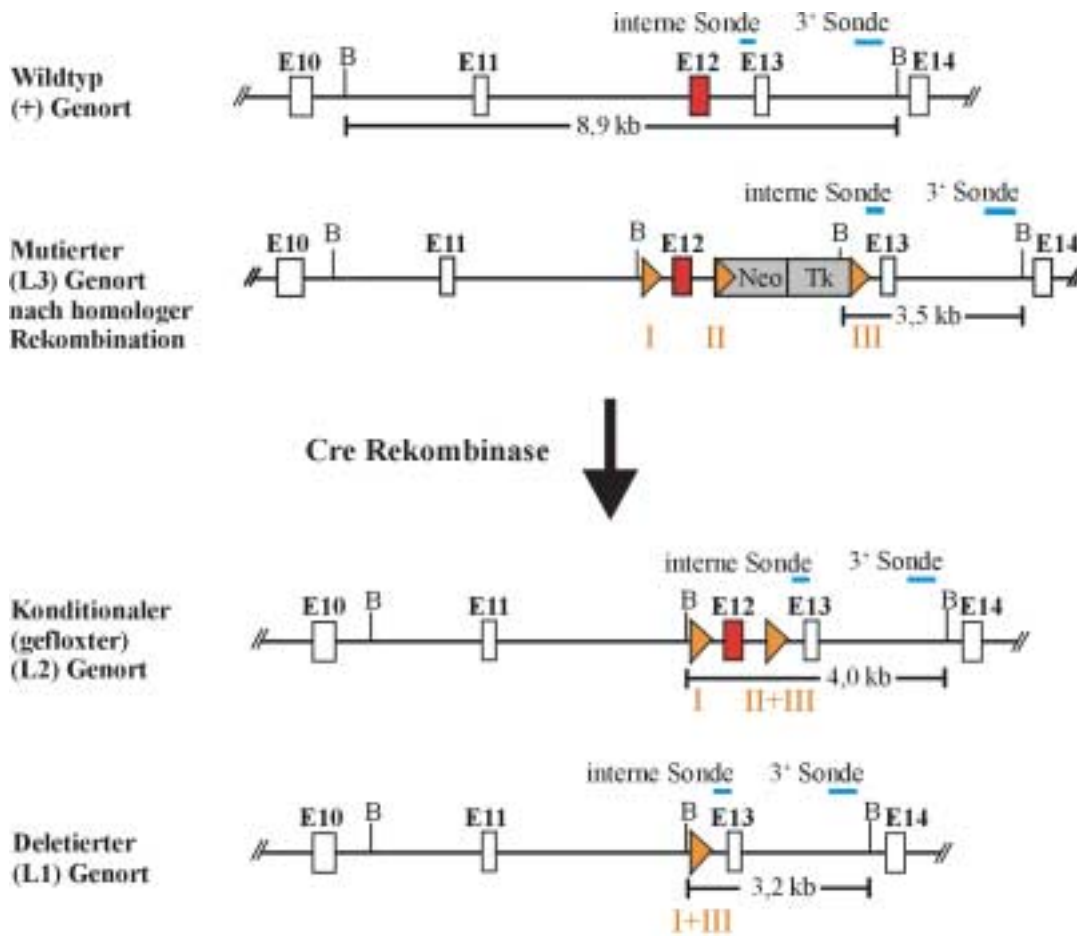
#### **C.4.2. Cre-vermittelte Rekombination in ES Zellen (Zweites Targeting)**

In einem zweiten Targeting wurde die Cre-vermittelte Rekombination in ES Zellen durchgeführt. Ziel dieser Sequenz-spezifischen Rekombination war zum einen die Entfernung des Selektionsmarkers, um einen heterozygot „gefloxten“ *IRAG* Genort zu erhalten und zum anderen die Entfernung des Selektionsmarkers zusammen mit dem Exon 12, um Zellklone mit einem heterozygot deletierten *IRAG* Genort zu erhalten, bei dem der vordere Bereich der „coiled-coil“ Domäne fehlt. Die beiden aus dem ersten Targeting positiv hervorgegangenen primären (+/L3) Klone (2G10 und 4B5; siehe auch **Tabelle C-3**) wurden aufgetaut und wieder in geeignetem Nährmedium auf einem Zellrasen aus Feederzellen ausgesät. Sobald eine ausreichende Zellzahl vorhanden war (nach 9 Tagen und 3 Mal passagieren), wurden etwa  $1 \times 10^7$  ES Zellen, die sich mittlerweile in der 16. Passage befanden, mit dem Cre-exprimierenden Plasmid pIC-Cre (20  $\mu$ g) elektroporiert (B.4.7). Nach der Elektroporation wurden unterschiedliche Zellzahlen auf Petrischalen mit

Feederzellen ausplattiert ( $1 \times 10^6$  Zellen,  $0,5 \times 10^6$  Zellen,  $0,1 \times 10^6$  Zellen,  $1 \times 10^5$  Zellen pro Petrischale). 48 Stunden nach der Elektroporation begann die Selektion. Dem Nährmedium wurde Ganciclovir (Endkonzentration  $0,2 \mu\text{M}$ ) hinzugefügt und die Zellen damit inkubiert (B.4.7). Ganciclovir ist für diejenigen Zellen toxisch, die die Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus Typ I in ihrem Genom integriert haben. Das bedeutet entweder, es sterben die Zellen ab, die nicht mit dem *Cre*-exprimierenden Plasmid transfiziert wurden oder bei denen die *Cre*-vermittelte Rekombination zwischen den *loxP* Seiten I und II stattfand, was zur Deletion des Exons 12, aber nicht zur Entfernung des Selektionsmarkers führte. Parallel dazu wurde die Entwicklung von Zellen auf einer Kontrollplatte beobachtet, die weiterhin Medium ohne Ganciclovir enthielten. Etwa vier Tage nach der Elektroporation wurde die Selektion wirksam. Am 10. und 11. Tag nach der Elektroporation entwickelten sich Ganciclovir-resistente Zellklone, die isoliert, jeweils in zwei 96 Loch Platten verteilt und weiter unter Selektionsdruck inkubiert wurden. Insgesamt wurden 77 Ganciclovir-resistente Klone isoliert, die vier Tage später weiter aufgeteilt werden konnten (B.4.5.6, B.4.5.7). Sobald die Klone nach dem Aufteilen bis zu einer ausreichenden Zellzahl herangewachsen waren, wurde die DNS isoliert, mit *BglIII* geschnitten und eine Southern Blot Analyse (B.2.11) durchgeführt.

#### **C.4.2.1. Analyse der ES Zellklone mittels Southern Blot**

Um festzustellen, bei welchen ES Zellklonen eines der beiden gewünschten *Cre*-vermittelten Rekombinationsereignisse stattgefunden hatte, wurden die isolierten Klone wieder mittels Southern Blot Hybridisierung analysiert. Aufgrund der Ganciclovir-Selektion konnten nur Klone zweier verschiedener Rekombinationsereignisse überlebt haben. Entweder wurde nur der Selektionsmarker oder der Selektionsmarker zusammen mit dem Exon 12 deletiert (**Abb. C-7**).



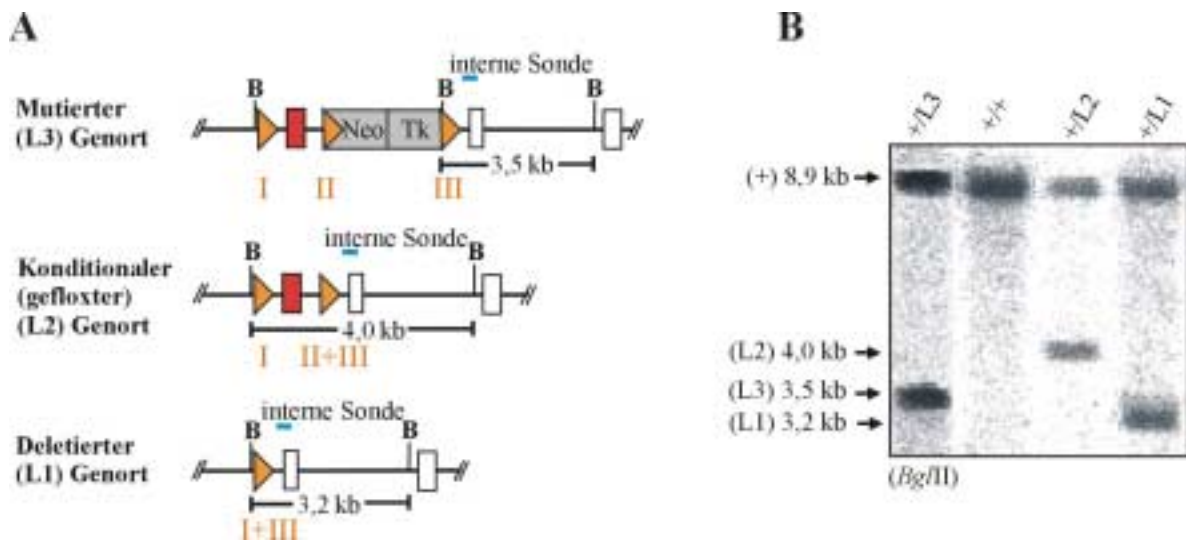
**Abb. C-7 Strategie der Southern Blot Hybridisierung zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination.**

Die Bandengrößen, die nach dem Cre-vermittelten Rekombinationsereignis nach erfolgter Hybridisierung mit der 3' und der internen Sonde erwartet wurden. E10 - E14: Exon 10 - Exon 14; Blaue Linien: 3' und interne Sonden; gelbe Dreiecke: *loxP* Sequenzen I, II und III; B, *Bgl*II Schnittstelle.

#### C.4.2.1.1. Hybridisierung mit der internen Sonde

Die DNS der ES Zellklone des zweiten Targetings auf den Nylonmembranen wurde zunächst mit einer internen Sonde hybridisiert. Da bereits im ersten Targeting mit den externen 5' und 3' Sonden die korrekte Integration bewiesen werden konnte, war es zulässig jetzt mit einer internen Sonde die Klone zu analysieren (**Abb. C-8**), welche aus den ersten beiden positiven (+/L3) Primärklonen (2G10 und 4B5) hervorgegangen sind (siehe **Tabelle C-3**). Die beiden Ausgangsklone zeigten aufgrund der Integration des Selektionsmarkers durch die homologe Rekombination in eines der beiden *IRAG* Allele zwei Banden nach der Restriktion mit *Hind*III und der Hybridisierung mit der 3' Sonde (**Abb. C-5**). Die 8,0 kb Bande entsprach dem Wildtyp und die 4,5 kb Bande dem modifizierten (L3) Allel. Wurde die genomische DNS der ES Zellklone mit *Bgl*II geschnitten und mit der 3' Sonde hybridisiert, so konnte eine 8,9 kb Bande für das Wildtyp und eine 3,5 kb Bande für das modifizierte (L3) Allel detektiert werden (**Abb. C-7** und **Abb. C-9**). Ist dieser Marker im zweiten Targeting nun deletiert worden, dann vergrößert

sich die Bande des mutierten Allels von 3,5 kb auf 4,0 kb, da die im Selektionsmarker enthaltene *Bgl*III Schnittstelle ebenfalls entfernt wurde (vgl. **Abb. C-7**, **Abb. C-8** und **Abb. C-9**). Ist der Marker allerdings zusammen mit dem Exon 12 entfernt worden, so verkleinert sich die Bande von 3,5 kb auf 3,2 kb, da damit die *Bgl*III Schnittstelle verschoben wurde. Die **Abb. C-8B** zeigt Beispiele für verschiedene rekombinierte ES Zellklone, deren genomische DNS mit der internen Sonde hybridisiert wurde.

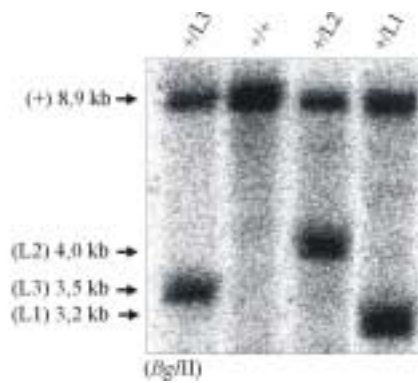


**Abb. C-8 Southern Blot Hybridisierungen mit der internen Sonde zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination.**

**A** Erwartete Größen vor und nach Cre-vermittelter Rekombination. **B** Southern Blot Hybridisierung von *Bgl*III geschnittener genomischer ES Zell DNS. Die 8,9 kb Bande entspricht dem Wildtyp und die 3,5 kb Bande dem mutierten Genort vor der Rekombination. Die 4,0 kb Bande entspricht dem mutierten Genort, wenn die Cre-vermittelte Rekombination zwischen *loxP* II und III stattgefunden hat, und die 3,2 kb Bande bei Rekombination zwischen *loxP* I und III; B, *Bgl*III Schnittstelle.

#### C.4.2.1.2. Hybridisierung mit der 3' Sonde

Zur Bestätigung der Ergebnisse mit der internen Sonde wurden alle Klone des zweiten Targetings auch mit der 3' Sonde analysiert, um erneut abzusichern, dass die Integration und auch die Cre-vermittelte Rekombination im *IRAG* Genort statt gefunden hat. Die Strategie war dieselbe wie mit der internen Sonde und auch die detektierten Banden der verschiedenen Rekombinationsereignisse hatten dieselben Größen. In **Abb. C-9** sind verschiedene Klone als Beispiel für die Hybridisierung mit der 3' Sonde gezeigt.

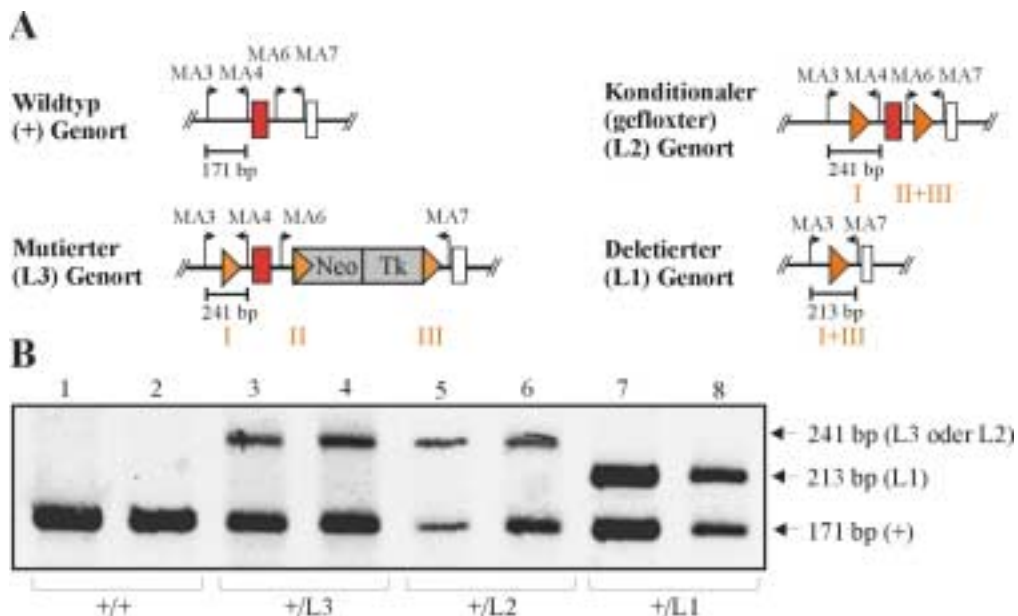


**Abb. C-9 Southern Blot Hybridisierungen mit der 3' Sonde zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination.**

Southern Blot Hybridisierung von *BglII* geschnittener genomischer ES Zell DNS. Die 8,9 kb Bande entspricht dem Wildtyp und die 3,5 kb Bande dem mutierten Genort vor der Rekombination. Die 4,0 kb Bande entspricht dem mutierten Genort, wenn die Cre-vermittelte Rekombination zwischen *loxP* II und III stattgefunden hat und die 3,2 kb Bande bei Rekombination zwischen *loxP* I und III.

#### C.4.2.2. Analyse der ES Zellklone mittels PCR

Die beiden Ausgangsklone des ersten Targetings sowie vier Klone des zweiten Targetings wurden außerdem mittels PCR analysiert. Dabei wurden die Primer MA3, MA4 und MA7 (Tabelle C-2) verwendet, deren Spezifität bereits in C.3 bestätigt wurde. Alle drei Primer wurden zusammen in einem PCR Ansatz eingesetzt, Aliquots der Reaktionen mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die Amplifikate mit Ethidiumbromid und UV-Licht sichtbar gemacht. Die Ergebnisse dieser PCR sind in Abb. C-10 gezeigt.



**Abb. C-10 PCR Analyse der Cre-vermittelten Rekombination.**

**A** Verwendete Primer und deren Lokalisation. **B** Wildtyp ES Zellen (Spur 1 und 2) und die beiden Ausgangsklone des ersten Targetings (Spur 3 und 4). Spur 5 und 6 sind Klone, bei denen nach dem zweiten Targeting *loxP* II und III rekombiniert haben und Spur 7 und 8 sind Klone, bei denen *loxP* I und III rekombiniert haben. Primer: MA3, MA4, MA6 und MA7.

Die 171 bp große Bande entstand bei der Amplifikation des Wildtyp Genorts mit den Primern MA3 und MA4 und war bei allen Klonen vorhanden. Die Bande bei 241 bp entstand ebenfalls mit den Primern MA3 und MA4 und war nur bei den beiden Ausgangsklonen bzw. bei den Klonen vorhanden, bei denen *loxP* II und III rekombinierten (L2). Der Größenunterschied von etwa 70 bp zum Wildtyp Genort war auf die integrierte *loxP* Seite zurückzuführen, welche sowohl beim L3 als auch beim L2 Genort vorhanden war. Ein selektiver Nachweis des L2 Genorts war mit den Primern MA6 und MA7 möglich (nicht gezeigt), da der Abstand der beiden Primer im Fall des L3 Genorts zu groß war, um eine Amplifikation zu ermöglichen (**Abb. C-10**). Die Bande bei 213 bp konnte mit den Primern MA3 und MA7 nur bei den Klonen entstehen, bei denen *loxP* I und III rekombiniert hatten (L1). Beim Wildtyp, L3 und L2 Genort war der Abstand der Primer zu groß, um mit diesem PCR Protokoll eine Amplifikation zu erhalten.

Insgesamt sind nach homologer Rekombination des modifizierten (+/L3) Primärklons #2G10 37 Sekundärklone analysiert worden. Davon waren neun nicht angewachsen, bei 13 fand eine Rekombination zwischen den *loxP* Seiten I und III statt (L1), bei einem zwischen II und III (L2) und 14 waren Wildtyp Klone. Vom Primärklon #4B5 wurden 40 Sekundärklone analysiert. Davon waren zwei nicht angewachsen, bei sieben fand eine Rekombination zwischen den *loxP* I und III statt (L1), bei zwei zwischen II und III (L2) und 29 waren Wildtyp Klone. Die hohe Anzahl an Wildtyp ES Zellklonen war darauf zurückzuführen, dass die beiden Primärklone sog. Mischklone waren, d.h. sie enthielten sowohl ES Zellen, bei denen ein *IRAG* Allel modifiziert war, als auch ES Zellen, bei denen der Selektionsmarker an einer anderen Stelle im Genom integriert hatte und darum ebenfalls G418 resistent waren. Bezüglich des *IRAG* Allels waren diese ES Zellen erst nach der Cre-vermittelten Rekombination als Wildtyp identifizierbar.

Wenn *loxP* II und III rekombinierten, waren demnach zwei *loxP* Stellen auf einem Genort vorhanden, und diese Klone wurden dann als „+/L2“ bezeichnet. Bei den Klonen, bei denen *loxP* I und III rekombinierten, war auf diesem Genort das Exon 12 deletiert und nur noch eine *loxP* Stelle blieb übrig. Demnach wurden diese Klone auch als „+/L1“ bezeichnet. Wenn keine Rekombination stattgefunden hat (bei den Klonen vor dem zweiten Targeting), waren drei *loxP* Seiten auf dem modifizierten Genort vorhanden. Diese Klone wurden demnach auch als „+/L3“ bezeichnet.

Mit der PCR Strategie, die schon bei der transienten Transfektion von COS Zellen erfolgreich war (C.3), konnte somit die Identität der ES Zellklone bestätigt werden. Ziel dieser Strategie war einerseits eine dritte Kontrolle der ES Zellklone vor der Injektion. Andererseits diente sie dazu, die spätere Genotypisierung von Mäusen zu vereinfachen, da eine PCR Analyse viel weniger Zeit und Material in Anspruch nimmt als eine Southern Blot Hybridisierung.

## C.5. Injektion der ES Zellklone in Blastozysten

Nach dem zweiten Targeting wurden diejenigen ES Zellklone, die nach den Southern Blot Hybridisierungen mit der 5' Sonde, der 3' Sonde und der internen Sonde sowie nach der PCR Analyse eindeutig heterozygot für die drei mutierten *IRAG* Genorte waren (+/L3, +L2 oder +/L1), für die Injektion in Blastozysten vorbereitet. Dazu wurden die Klone aufgetaut und wieder kultiviert. Welche Klone dazu verwendet wurden, ist in **Tabelle C-3** dargestellt.

Die Mikroinjektion der genetisch modifizierten ES Zellen in die Blastozysten (B.4.8) wurde von Frau Dr. Susanne Kühbandner durchgeführt. Bei 16 Ammenmüttern wurden Blastozysten mit genetisch modifizierten +/L3 ES Zellen reimplantiert, bei 6 Ammenmüttern Blastozysten mit +/L2 ES Zellen und bei 7 Ammenmüttern Blastozysten mit +/L1 ES Zellen. Welcher Mausstamm dabei für welchen Schritt verwendet wurde, ist unter B.4.8 beschrieben. Ein Schema zum gesamten Ablauf ist in **Abb. B-2** dargestellt. Aus den injizierten Blastozysten gingen chimäre Mäuse hervor. Männchen, die 70 bis 90% chimär waren, d.h. deren Anteil an agouti-farbenem Fell entsprechend hoch war, wurden mit C57BL/6 Weibchen verpaart, um die Keimbahngängigkeit der genetischen Modifikation nachzuweisen. Zeugten diese chimären Männchen nur schwarze Nachkommen, so wurde das veränderte Gen nicht weitervererbt, da auch die Fellfarbe agouti nicht vererbt wurde. Für eine erfolgreiche Keimbahngängigkeit mussten agouti-farbene Nachkommen erzeugt werden. **Tabelle C-3** zeigt eine Zusammenfassung aller Chimären und deren Keimbahngängigkeit

**Tabelle C-3 Ausbeute bei der Etablierung der I-L3, I-L2 und I-L1 Mauslinien**

Primärer ES Zellklon	Sekundärer ES Zellklon	reimplantierte Blastozysten	Nachkommen	Chimären	GLT <sup>a</sup>	Mauslinie
#2G10 (L3)		87	12	5	1	I-L3 583
#4B5 (L3)		69	14	8	0	-
#2G10 (L3)	D1 (L2)	32	0	0	0	-
#2G10 (L3)	D4 (L1)	24	7	2	0	-
#2G10 (L3)	C1 (L1)	9	6	1	0	-
#4B5 (L3)	E9 (L2)	27	13	7	3	I-L2 657, 658, 659
#4B5 (L3)	E10 (L2)	28	3	0	0	-

<sup>a</sup> Chimären mit Keimbahntransmission („germ line transmission“)

## C.6. Genotypisierung agouti-farbener Nachkommen

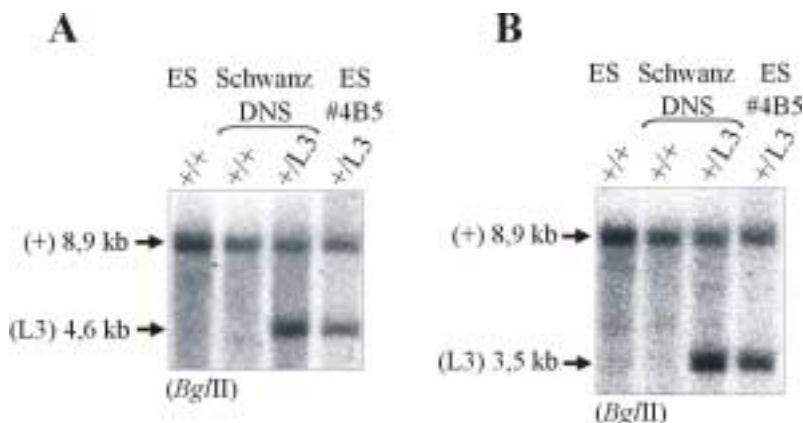
Das Vorkommen agouti-farbener Nachkommen aus der Rückkreuzung der männlichen Chimären mit schwarzen Weibchen (C57BL/6) bestätigte die Keimbahngängigkeit der modifizierten ES Zellen (129/Sv). Da die ES Zellen nach dem Targeting genotypisch heterozygot bezüglich der eingeführten Mutation waren, wurden die Nachkommen mittels Southern Blot und PCR Analyse genotypisiert. Unter den Nachkommen konnten sowohl Wildtyp, als auch heterozygot mutierte Mäuse sein. Zur Genotypisierung mittels Southern Blot (B.2.11) und PCR Analyse (B.2.9) wurde aus Schwanzgewebe der Mäuse die DNS isoliert (B.2.2).

### C.6.1. Genotypisierung der *IRAG* (+/L3) Mäuse

Zur Genotypisierung der Mäuse aus der I-L3 583 Linie (**Tabelle C-3**) wurden die gleichen etablierten Southern Blot und PCR Strategien verwendet, die bereits bei der Analyse der ES Zellklone erfolgreich waren (C.4). Als Kontrolle diente die DNS aus einem positiven und einem negativen ES Zellklon.

#### C.6.1.1. Genotypisierung mittels Southern Blot

Die aus Mausgewebe isolierte DNS wurde mit dem Restriktionsenzym *Bgl*III geschnitten und mittels Southern Blot Hybridisierung analysiert. Dabei wurde wieder sowohl die 5' als auch die 3' Sonde verwendet (**Abb. C-11**).



**Abb. C-11 Genotypisierung der *IRAG* (+/L3) Mäuse mittels Southern Blot.**

**A** zeigt die Hybridisierung mit der 5' Sonde und **B** mit der 3' Sonde. Die äußeren Spuren sind jeweils negative und positive ES Zellklone, die mittleren Spuren sind jeweils Beispiele für Wildtyp (+/+) und heterozygote (+/L3) Mäuse.

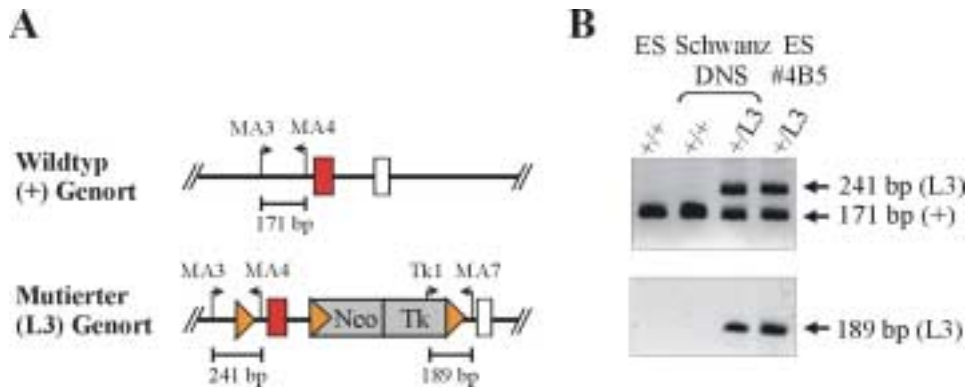
Die Hybridisierung der Mäuse DNS mit der 5' Sonde ergab wie bei der Analyse der ES Zellklone eine Bande bei 8,9 kb für den Wildtyp Genort und eine Bande bei 4,6 kb für den modifizierten (L3) Genort. Die Hybridisierung mit der 3' Sonde lieferte ebenfalls die



Wildtyp Bande bei 8,9 kb sowie eine 3,5 kb Bande, wenn der *IRAG* L3-Locus vorhanden war.

### C.6.1.2. Genotypisierung mittels PCR

Wie unter C.3 beschrieben, wurde eine PCR Strategie entwickelt, um die Mäuse zeit- und materialsparend zu genotypisieren. Zusätzlich wurde in diesem Fall ein weiteres Primerpaar (Tk1 + MA7) verwendet, um den Selektionsmarker nachzuweisen. **Abb. C-12A** zeigt die PCR-Strategie und **Abb. C-12B** Aliquots der PCR auf einem Agarosegel.



#### Abb. C-12 Genotypisierung der *IRAG* (+/L3) Mäuse mittels PCR.

**A** zeigt die PCR Strategie mit den verwendeten Primern und **B** die dazugehörigen Agarosegele. Das obere Gel zeigt die PCR mit den Primern MA3 + MA4, wobei die Bande bei 241 bp das modifizierte (L3) Allel und die Bande bei 171 bp das Wildtyp Allel nachweist. Das untere Gel zeigt die PCR mit den Primern Tk1 + MA7. Die äußeren Spuren sind jeweils negative und positive ES Zellklone, die mittleren Spuren sind jeweils Beispiele für Wildtyp (+/) und heterozygote (+/L3) Mäuse.

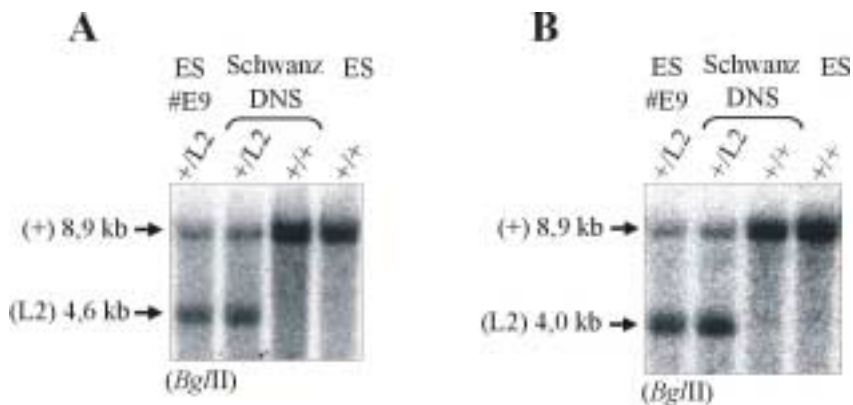
Wie erwartet, ergab die PCR Genotypisierung der beiden Mäuse mit den Primern MA3 + MA4 sowie der ES Zellklone als Kontrolle eine Bande bei 171 bp, die dem Wildtyp Genort entspricht. Bei der Maus, bei der bereits im Southern Blot der mutierte *IRAG* Locus nachgewiesen werden konnte (**Abb. C-11**), wies auch die PCR (241 bp Bande) den veränderten Locus nach. Mit den Primern Tk1 + MA7 entstand nur dann ein Amplifikat, wenn der Selektionsmarker vorhanden war, da nur in diesem Fall der Primer Tk1 binden konnte. Dies war beim positiven ES Zellklon sowie bei einer der beiden Mäuse der Fall.

### C.6.2. Genotypisierung der „geflochten“ *IRAG* (+/L2) Mäuse

Zur Genotypisierung dieser Mäuse wurden die gleichen etablierten Southern Blot und PCR Strategien verwendet wie in C.6.1. Als Kontrolle diente erneut die DNS aus einem positiven und einem negativen ES Zellklon.

### C.6.2.1. Genotypisierung mittels Southern Blot

Die Genotypisierung erfolgte wie in C.6.1.1. Die Ergebnisse sind in **Abb. C-13** dargestellt.



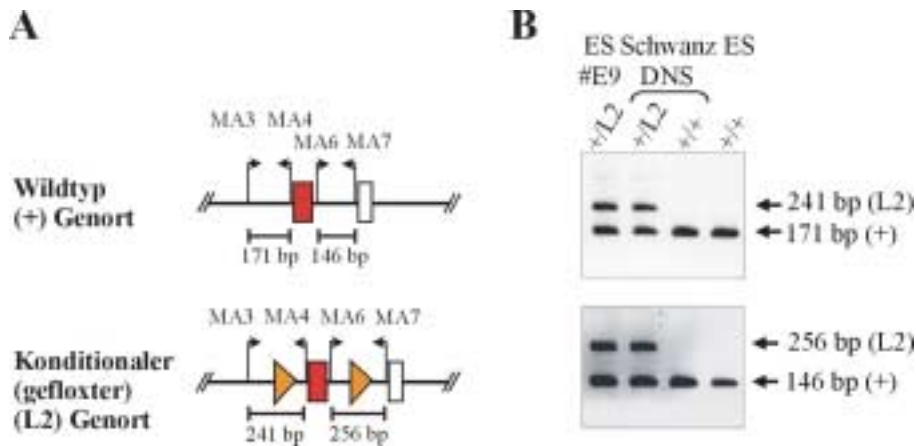
**Abb. C-13** Genotypisierung der „gefloxten“ *IRAG* (+/L2) Mäuse mittels Southern Blot.

**A** zeigt die Hybridisierung mit der 5' Sonde und **B** mit der 3' Sonde. Die äußeren Spuren sind jeweils negative und positive ES Zellklone, die mittleren Spuren sind jeweils Beispiele für Wildtyp (+/+) und heterozygote (+/L2) Mäuse.

Die Hybridisierung der Mäuse DNS mit der 5' Sonde ergab wie bei der Analyse der ES Zellklone eine Bande bei 8,9 kb für den Wildtyp Genort und eine Bande bei 4,6 kb für den modifizierten (L2) Genort. Die Hybridisierung mit der 3' Sonde lieferte ebenfalls die Wildtyp Bande bei 8,9 kb, sowie eine 4,0 kb Bande wenn der *IRAG* L2-Locus vorhanden war. Mit der 3' Sonde ließ sich spezifisch der „gefloxte“ L2 Locus nachweisen, da der L3 Locus mit dem noch vorhandenen Selektionsmarker ein Bande bei 3,5 kb aufwies (siehe auch **Abb. C-7** und **Abb. C-11B**).

### C.6.2.2. Genotypisierung mittels PCR

Wie unter C.3 beschrieben, wurde eine PCR Strategie entwickelt, um die Mäuse zeit- und materialsparend zu genotypisieren **Abb. C-14A** zeigt die PCR-Strategie und **Abb. C-14B** Aliquots der PCR auf einem Agarosegel.



**Abb. C-14 Genotypisierung der „gefloxten“ *IRAG* (+/L2) Mäuse mittels PCR.**

**A** zeigt die PCR Strategie mit den verwendeten Primern und **B** die dazugehörigen Agarosegele. Das obere Gel zeigt die PCR mit den Primern MA3 + MA4, wobei die Bande bei 241 bp das modifizierte (L2) Allel und die Bande bei 171 bp das Wildtyp Allel nachweist. Das untere Gel zeigt die PCR mit den Primern MA6 + MA7, wobei die Bande bei 256 bp das modifizierte (L2) Allel und die Bande bei 146 bp das Wildtyp Allel nachweist. Die äußeren Spuren sind jeweils positive und negative ES Zellklone, die mittleren Spuren sind jeweils Beispiele für Wildtyp (+/+) und heterozygote „gefloxte“ (+/L2) Mäuse.

Die PCR mit den Primern MA3 + MA4 entsprach der PCR in C.6.1.2. Zusätzlich konnte das L2 Allel mit den Primern MA6 + MA7 nachgewiesen werden. Hierbei entstand eine Bande von 256 bp, während vom Wildtyp Allel eine Bande von 146 bp amplifiziert wurde (vgl. auch **Tabelle C-2** und **Abb. C-3**). Durch Verpaarung von +/L2 Mäusen konnten L2/L2 Mäuse gezüchtet werden. Bei diesen Verpaarungen wurden insgesamt 19 Nachkommen geboren, davon waren 4 +/+, 9 +/L2 und 6 L2/L2. Auch wenn die Nachkommenzahl zu gering war, um eindeutige Aussagen treffen zu können, war eine Verteilung der Genotypen nach Mendel (1:2:1) zu erkennen. Das deutet daraufhin, dass die L2/L2 Mäuse keinen Nachteil bei der Embryonalentwicklung gegenüber den +/+ oder +/L2 Mäusen haben und alle geboren werden.

### C.7. Verpaarung mit einer „Cre-deleter“ Maus

Das Ziel dieser Arbeit war neben der Erzeugung eines konditionalen *IRAG* Allels (L2 bzw. „gefloxtes“ Allel) auch die konventionelle Mutation des *IRAG* Allels (L1 Allel bzw. Deletion des Exons 12). Da aber keine der heterozygoten +/L1 Chimären agouti-farbene Nachkommen zeugten und damit keine Keimbahngängigkeit vorhanden war (vgl. **Tabelle C-3**), wurde ein weiterer Verpaarungsschritt notwendig. Dazu wurden heterozygote *IRAG* +/L2 Mäuse mit „Cre-deleter“ Mäusen verpaart. Diese Mäuse exprimierten die Cre Rekombinase als Transgen unter der Kontrolle des CMV Promotors in vielen Zellen, v.a. aber auch in den Keimzellen (Dupé et al., 1997). Der CMV Promotor stammt aus dem Cytomegalie Virus und ist permanent aktiv. Das bewirkt, dass das nachgeschaltete Gen unabhängig vom Gewebe- oder Zelltyp und zu jeder Zeit exprimiert wird. Die Verpaarung

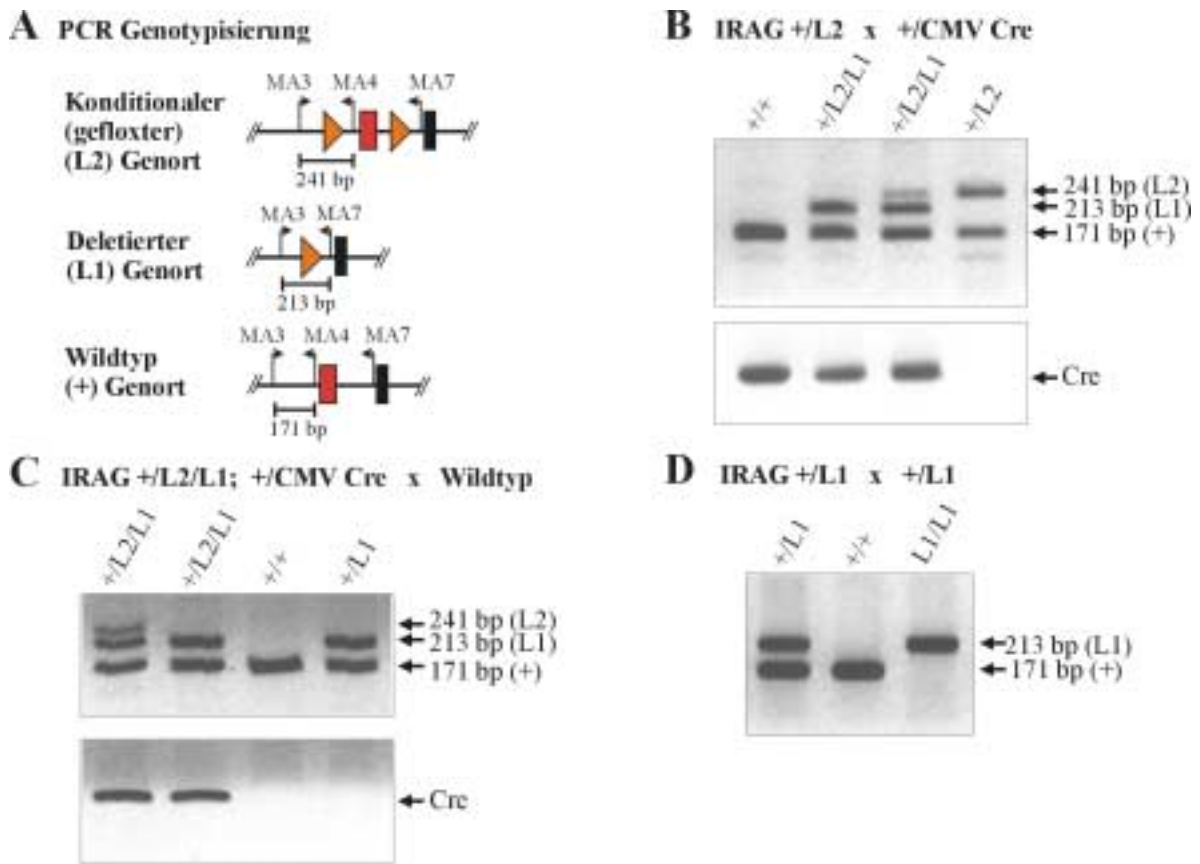
der Mäuse sollte Nachkommen erzeugen, die sowohl heterozygot den modifizierten *IRAG* Locus trugen als auch die Cre Rekombinase exprimierten. War dies der Fall, dann erfolgte in diesen Mäusen eine Cre-vermittelte Rekombination des L2 zu einem L1 Locus. Man spricht dann von einer *in vivo* Rekombination im Vergleich zur *in vitro* Rekombination des zweiten ES Zell Targetings. Diese Nachkommen wurden dann mit Wildtyp Mäusen rückgekreuzt. Das war einerseits notwendig, um die transgene Cre Rekombinase wieder zu entfernen, andererseits um zu testen, ob die Rekombination auch in den Keimzellen erfolgt war. War dies der Fall, dann trugen die Nachkommen aus der Verpaarung mit Wildtyp Mäusen nur noch heterozygot das *IRAG* L1 und kein L2 Allel mehr. Demnach wurden sie als „+/L1“ bezeichnet.

Der letzte Schritt zur Erzeugung von Mäusen, bei denen homozygot das Exon 12 fehlte („L1/L1“), war die Verpaarung zweier „+/L1“ Mäuse.

### **C.7.1. Genotypisierung der Nachkommen**

Alle Mäuse aus den beschriebenen Verkreuzungen wurden mit der etablierten PCR Strategie genotypisiert. Mit dieser Methode war es möglich, in kurzer Zeit das Wildtyp und das L2 bzw. das L1 Allel nachzuweisen (**Abb. C-15A**).

Den Nachkommen wurde wie auch zuvor eine Schwanzbiopsie entnommen und davon die DNS isoliert. Mit dieser DNS wurden zwei verschiedene PCR Ansätze durchgeführt. Die erste PCR erfolgte mit den drei Primern MA3, MA4 + MA7 und diente dem Nachweis des Wildtyp, des L2, bzw. nach erfolgter Cre-vermittelter Rekombination, des L1 Genorts. (**Abb. C-15**). Mit der zweiten PCR erfolgte der Nachweis, ob das Transgen für die Cre Rekombinase vererbt wurde (**Abb. C-15B** und **C** untere Gele).



**Abb. C-15 PCR Genotypisierung der Nachkommen nach Verpaarung mit einer „Cre-deleter“ Maus.**

**A** zeigt ein Schema des *IRAG* Genorts sowie die verwendeten Primer. In **B – D** sind die PCR Genotypisierungen der Nachkommen der verschiedenen Verpaarungen zu sehen. Die erwarteten Bandengrößen waren: 171 bp für den Wildtyp, 213 bp für den L1 Genort und 241 bp für den L2 Genort. **B** Nachkommen aus der Verpaarung der heterozygot „gefloxten“ (+/L2) Maus mit der transgenen „Cre-deleter“ (+/CMV Cre) Maus, **C** Nachkommen aus der Verpaarung der mosaikartigen Exon 12 deletierten (+/L2/L1; +/CMV Cre) Maus mit einer Wildtyp (+/+) Maus und **D** Nachkommen aus der Verpaarung zweier heterozygoter (+/L1) Mäuse untereinander.

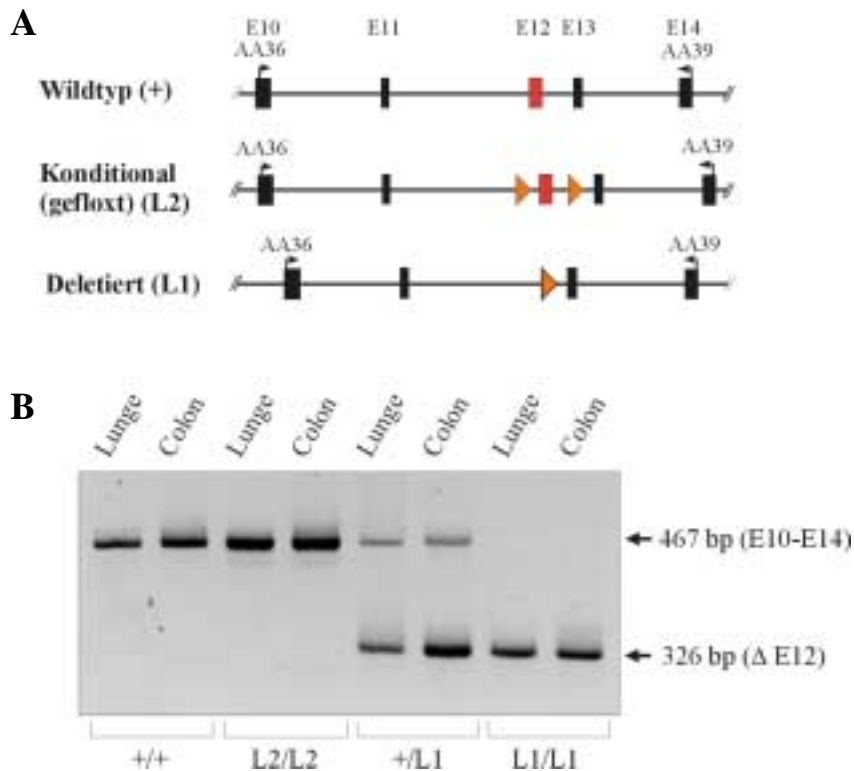
Die Verpaarung der heterozygot „gefloxten“ (+/L2) Maus mit der transgenen „Cre-deleter“ (+/CMV Cre) Maus lieferte ca. 50% Nachkommen, die die Cre Rekombinase exprimierten. Als Beispiel sind in **Abb. C-15B** vier mögliche Genotypen gezeigt, bei denen drei positiv für *Cre* waren. In Bezug auf den *IRAG* Genort war eine Maus homozygot Wildtyp (+/+), und bei zwei Mäusen war die Rekombination nicht in allen Zellen der Biopsie erfolgreich, was zu einer Detektion des L2 und des L1 Genorts führte. Dies war generell bei allen Mäusen der Fall (d.h. *Cre*-positive Mäuse sind mosaik für L2/L1), nur ließ sich der L2 Genort nicht immer nachweisen. Der vierten Maus in dieser Abbildung wurde kein *Cre* vererbt, und somit blieb sie heterozygot „gefloxte“ (+/L2). Die Mosaik-Maus, bei der in manchen Zellen das Exon 12 auf einem Allel deletiert war (+/L2/L1) und die heterozygot die *Cre* Rekombinase besaß, wurde mit Wildtyp Mäusen rückgekreuzt. In **Abb. C-15C** sieht man vier Beispiele der Genotypisierungen der Nachkommen. Wichtig bei dieser Verpaarung war, dass man eine Maus erhielt, die heterozygot das Exon 12 deletiert hatte

(+/L1), aber kein Transgen für die Cre Rekombinase mehr besaß, weil nur dann sicher war, dass die Rekombination auch in den Keimzellen des Elterntiers erfolgreich war. Dies ist beispielhaft bei der vierten Maus (v.1.) in dieser Abbildung gezeigt. Die +/L1 Mäuse wurden nun untereinander verkreuzt, um homozygot das Exon 12 zu deletieren (L1/L1). Die Genotypisierung der Nachkommen ist in **Abb. C-15D** zu sehen. In diesem Bild war die dritte Maus homozygot (L1/L1) und besaß somit keinen *IRAG* Wildtyp Genort mehr, bei dem das Exon 12 vorhanden war.

Bei diesen Verpaarungen wurden insgesamt 39 Nachkommen geboren, davon waren 12 +/+, 20 +/L1 und 7 L1/L1. Die Nachkommenzahl war auch hier zu gering, um eindeutige Aussagen treffen zu können. Eine Verteilung der Genotypen nach Mendel (1:2:1) war aber zu erkennen. Das deutet daraufhin, dass die L1/L1 Mäuse keinen Nachteil bei der Embryonalentwicklung gegenüber den +/+ oder +/L1 Mäusen haben und alle geboren werden.

### **C.8. RNS Analyse der genetisch modifizierten Mäuse**

Bei den in C.6.2 (L2) und C.7 (L1) beschriebenen Mäusen wurde nun untersucht, ob der genetisch modifizierte Genort Auswirkungen auf die Transkription des *IRAG* Gens hatte. Dazu wurde aus diesen Mäusen Lunge und Colon präpariert und daraus die gesamte RNS isoliert (B.2.2.2). Diese beiden Gewebe wurden ausgewählt, da *IRAG* dort hoch exprimiert wird. Mit der RNS wurde dann eine RT-PCR (B.2.9) durchgeführt. Die dazu verwendeten Primer lagen auf dem Exon 10 und Exon 14. Aliquots dieser RT-PCR wurden wieder auf einem Agarosegel aufgetrennt und sichtbar gemacht (**Abb. C-16**).



**Abb. C-16 RT-PCR Analyse der mRNS der genetisch modifizierten Mäuse.**

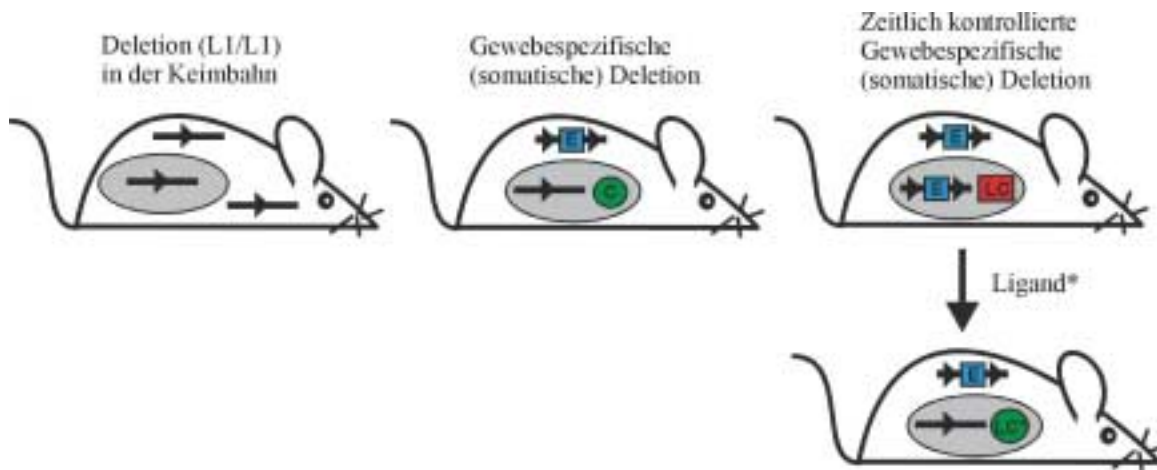
**A** Schema der Exons und die verwendeten Primer. **B** Das Agarosegel mit den RT-PCR Reaktionen aus der Lunge und dem Colon der Mäuse. War das Exon 12 vorhanden (E10-E14), ließ sich eine Bande von 467 bp amplifizieren, war das Exon deletiert ( $\Delta$ E12), so reduzierte sich das Amplifikat auf 326 bp.

Aus RNS von Wildtyp Mäusen wurde erwartungsgemäß die Region von Exon 10-14 (467 bp) amplifiziert. Das gleiche Ergebnis wurde bei den homozygot „gefloxten“ (L2/L2) Mäusen erhalten. Dies wies darauf hin, dass die beiden *loxP* Seiten 5' und 3' des Exons 12 keinen Einfluss auf die Transkription dieser Exons hatten. Bei den Mäusen, denen heterozygot das Exon 12 fehlte (+/L1) wurde zusätzlich zur Wildtyp mRNS ein weiteres Transkript detektiert, welches sich mit der Amplifikation eines 326 bp großen Fragments nachweisen ließ. Im Fall der homozygoten (L1/L1) Mäuse, die kein Wildtyp Allel mehr besaßen, war nur noch das kleinere Fragment nachweisbar (**Abb. C-16**). Die beiden unterschiedlich großen Amplifikate wurden isoliert und sequenziert (B.2.10). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Nukleinsäuresequenz des Transkripts des L2 Allels zu 100% der des Wildtyps entsprach. Wie erwartet, fehlten dem Transkript des L1 Allels exakt die Nukleinsäuren des Exons 12 (F.2).

## D. Diskussion

Die genetische Modifikation von Säugetieren hat bereits viel dazu beigetragen, um die physiologische Funktion von Proteinen besser zu verstehen. Mit Hilfe des „Gene Targeting“ können Gene gezielt modifiziert bzw. inaktiviert werden (Capecchi, 1989). Durch die Folgen, die der Gendefekt mit sich bringt, können Rückschlüsse auf die ursprüngliche Genfunktion gezogen werden. Beim klassischen oder konventionellen „Gene Targeting“ wird i.d.R. ein Selektionsmarkergen in ein Exon des Zielgens eingesetzt, wodurch die Struktur des Gens zerstört wird und die Funktion verloren geht (**Abb. B-3** Seite 25). Die Nullmutation wird in der Keimbahn weitergegeben. Diese Strategie beinhaltet allerdings gewisse Nachteile (Rajewsky et al., 1996). Der Einbau des Selektionsmarkers, der für die Selektion rekombinanter ES Zellklone exprimiert werden muss, kann den mutierten Phänotyp beeinflussen. Ist das veränderte Gen für die Entwicklung des Embryos von großer Bedeutung, führt die Keimbahnmutation oft zur embryonalen Letalität. Als Folge daraus ist kein mutierter Organismus vorhanden, an dem die Auswirkungen des Gendefekts untersucht werden können. Ein weiterer Nachteil des klassischen „Gene Targeting“ ist, dass Genfunktionen, die erst in späteren Entwicklungsstadien wichtig werden, oft durch frühe Defekte überspielt werden. Eine Weiterentwicklung des konventionellen „Gene Targetings“ ist das konditionale „Gene Targeting“ mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems aus dem Bakteriophagen P1 (Rajewsky et al., 1996; Metzger & Feil, 1999). Bei diesem System besteht die Modifikation aus dem Einbau von *loxP* Sequenzen in Introns des Zielgens durch homologe Rekombination in ES Zellen. Durch die Verwendung eines „gefloxten“ Selektionsmarkers kann dieser Cre-vermittelt wieder entfernt werden, so dass mögliche störende Auswirkungen nicht mehr vorhanden sind, und man erhält ein konditionales „gefloxtes“ Allel (vgl. **Abb. C-7** Seite 43). Durch eine Cre-vermittelte Rekombination in ES Zellen (*in vitro*) oder durch Verpaarung mit einer „Cre-deleter“ Maus (*in vivo*) kann eine Deletion (L1) bereits in der Keimbahn und somit in allen Geweben und Zellen der Tiere erzeugt werden (**Abb. D-1** links). Durch Verpaarung der konditionalen „gefloxten“ Maus mit einer Maus, die aufgrund eines gewebespezifischen Promotors die Cre Rekombinase nur in einem ganz bestimmten Gewebe exprimiert, lässt sich eine gewebespezifische oder somatische Deletion erzeugen (**Abb. D-1** Mitte). Eine zusätzliche Weiterentwicklung des Rekombinationssystems lässt nicht nur eine gewebespezifische, sondern auch eine Liganden-gesteuerte und somit zeitlich kontrollierbare Modifikation des Zielgens zu (Danielian, 1998; Metzger & Feil, 1999; Kühbandner et al., 2000; **Abb. D-1** rechts). Die hierbei verwendete gewebespezifisch exprimierte Cre Rekombinase ist ein chimäres Enzym, welches erst nach Bindung eines synthetischen Liganden selektiv aktiviert wird und somit erst dann die Rekombination erfolgt.



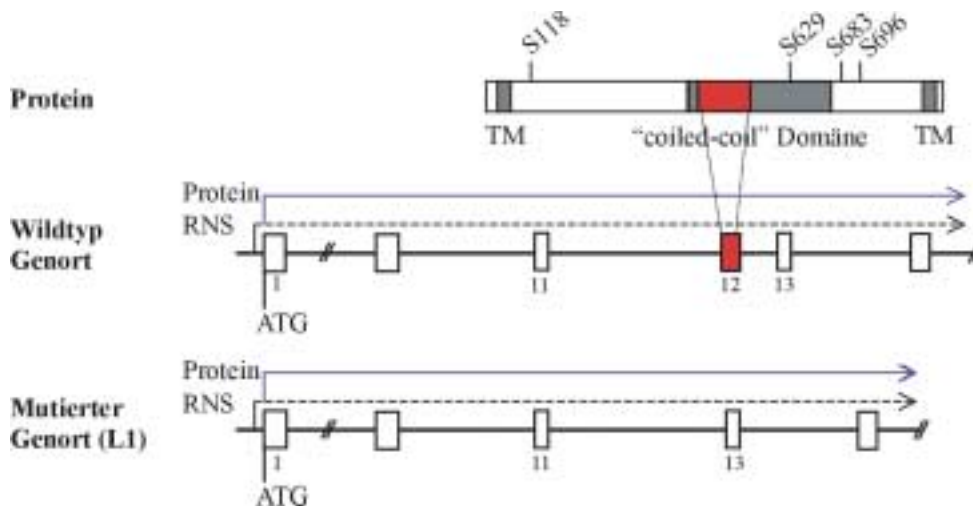


**Abb. D-1 Vergleich verschiedener Modifikationsmöglichkeiten mit Hilfe des Cre/loxP Systems.**

**Links:** Verpaarung der konditionalen „gefloxten“ Maus mit einer „Cre-deleter“ Maus liefert eine Deletion (L1) bereits in der Keimbahn und somit in allen Geweben und Zellen. **Mitte:** Verpaarung der konditionalen „gefloxten“ Maus mit einer Maus, mit einer gewebespezifischen Expression der Cre Rekombinase erzeugt eine gewebespezifische oder somatische Deletion (graues Oval). **Rechts:** Eine Liganden-gesteuerte Cre Rekombinase lässt eine zeitlich kontrollierbare Deletion zu. Weitere Erklärung im Text.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe der homologen Rekombination in ES Zellen der Maus und des Cre/loxP Rekombinationssystems Mauslinien mit verschiedenen genetischen Modifikationen innerhalb des *IRAG* Gens erzeugt, um die physiologische Rolle des Gens untersuchen zu können. *IRAG* wurde ursprünglich aus der Trachea von Rindern isoliert (Schlossmann et al., 2000). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass *IRAG* in der Maus hauptsächlich im glatten Muskel exprimiert wird. Möglicherweise ist *IRAG* dort in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und bildet mit dem  $IP_3$  Rezeptor Typ I und der cGMP-abhängigen Kinase  $I\beta$  einen makromolekularen Komplex. *IRAG* wird an vier unterschiedlichen Stellen von der Kinase phosphoryliert. Bisherige Funktionsanalysen in COS Zellen haben gezeigt, dass *IRAG* bei der Kalziumregulation eine wichtige Rolle spielt (Schlossmann et al., 2000; Ammendola et al., 2001). Zur weiteren Aufklärung der *in vivo* Funktion von *IRAG* sollte diese Arbeit die Voraussetzungen schaffen.

Zwei Ziele wurden bei der Einführung der genetischen Modifikationen in das *IRAG* Gen verfolgt. Als erstes sollte das *IRAG* Gen konventionell, d.h. in allen Zellen und bereits in der Embryonalentwicklung, so verändert werden, dass das Exon 12 deletiert war (**Abb. D-2**). Gleichzeitig sollte der aus technischen Gründen eingefügte Selektionsmarker über Cre-vermittelte Rekombination entfernt werden. Als zweites Ziel dieser Arbeit sollte eine konditionale Deletion des Exons 12 vorbereitet werden. Beide Ziele wurden im Verlauf dieser Arbeit mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems erreicht.



**Abb. D-2 Deletion des Exons 12 im *IRAG* Gen.**

Gezeigt ist die Primärstruktur des *IRAG* Proteins mit der „coiled-coil“ Domäne, den putativen Transmembrandomänen (TM) und den Phosphorylierungsstellen (S, Serin). Darunter der Wildtyp und der mutierte Genort sowie deren Transkription und Translation.

Zunächst wurde das *IRAG* Gen in embryonalen Stammzellen (ES Zellen) der Maus mittels homologer Rekombination genetisch modifiziert. Die genetisch modifizierten ES Zellen wurden anschließend in frühe Mäuseembryos, Blastozysten, injiziert und nahmen an der weiteren Embryonalentwicklung teil, wodurch chimäre Mäuse entstanden. Die Keimbahngängigkeit der modifizierten ES Zellen führte zu heterozygoten Mäusen bezüglich der eingeführten *IRAG* Mutation.

Für eine Cre-vermittelte Mutagenese musste das für den vorderen Bereich der „coiled-coil“ Domäne kodierende Exon 12 mit zwei *loxP* Sequenzen flankiert werden, die die gleiche Orientierung hatten. Durch ein erstes Targeting wurden deshalb zunächst insgesamt drei *loxP* Stellen durch homologe Rekombination in den *IRAG* Genort von embryonalen Stammzellen eingeführt. Zwei dieser *loxP* Stellen flankierten einen Selektionsmarker und wurden in das Intron 3' von Exon 12 (Intron 12) eingeführt. Eine dritte, einzelne *loxP* Stelle wurde in das Intron 5' von Exon 12 (Intron 11) integriert (**Abb. C-2** Seite 36). Aus diesem ersten Targeting gingen zwei positive ES Zellklone hervor, die die beschriebenen Mutationen an der vorgesehenen Stelle in ihrem Genom integriert hatten (vgl. C.4.1). Das zweite Targeting beinhaltete die Cre-vermittelte Rekombination im Genom der ES Zellen. Zwei ES Zellgenotypen gingen daraus hervor. Es entstanden ES Zellklone mit einem deletierten Genort, da der Selektionsmarker zusammen mit dem Exon 12 entfernt wurde. Zusätzlich entstanden auch ES Zellklone mit einem „gefloxten“ (*loxP*-flankierten), konditionalen *IRAG* Genort, d.h. innerhalb der Introns 5' und 3' von Exon 12 befanden sich nach den beiden Targetingschritten jeweils einzelne, gleichgerichtete *loxP* Sequenzen (vgl. C.4.2).

Klone dieser beiden verschiedenen ES Zellgenotypen sowie die beiden positiven ES Zellklone nach dem ersten Targeting (**Tabelle C-3**) wurden erfolgreich in Blastozysten

injiziert und diese in scheinchwangere Leihmütter reimplantiert. Aus den drei ES Zellklonen gingen chimäre Mäuse hervor. Bei der Rückkreuzung der männlichen Chimären mit Wildtyp C57BL/6 Weibchen stellte sich heraus, dass nur einer der beiden Klone nach dem ersten Targeting (+/L3), sowie ein „gefloxter“ Klon (+/L2) keimbahngängig war. Aus den Klonen, bei denen heterozygot das Exon 12 fehlte (+/L1) gingen keine keimbahngängigen Chimären hervor. Um dennoch Mäuse zu bekommen, deren Exon 12 des *IRAG* Gens deletiert war, wurden die „geflochten“ Mäuse mit sog. „Cre-deleter“ Mäusen gekreuzt. Nach mehreren Schritten konnte auf diesem Weg erfolgreich das Exon 12 *in vivo* entfernt werden (C.7). Nach dieser Cre-vermittelten Rekombination wurden die heterozygoten Exon 12 deletierten (+/L1) Mäuse miteinander gekreuzt, um homozygote Tiere zu erzeugen, die auf beiden *IRAG* Allelen kein Exon 12 mehr besaßen (L1/L1). Außerdem wurden auch die heterozygot „geflochten“ (+/L2) Mäuse miteinander verpaart, um homozygot „geflochte“ (L2/L2) Mäuse zu züchten. Beide Verpaarungen der heterozygot „geflochten“ Mäuse, bzw. der heterozygot deletierten Mäuse führten zu lebensfähigen homozygot „geflochten“ bzw. deletierten Mäusen.

Mit Hilfe der RT-PCR und der DNS Sequenzierung konnte zweierlei bestätigt werden. Zum einen, dass die *loxP* Sequenzen des „geflochten“ (L2) Genorts weder die Transkription noch das Exon/Intron Spleißen des *IRAG* Gens beeinflussten, da die Amplifikation sowohl in Bezug auf die Größe als auch auf die Nukleinsäuresequenz mit der des Wildtyp Genorts übereinstimmte. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass bei der mRNA des deletierten (L1) Genorts exakt die Nukleinsäuren des Exons 12 fehlten (C.8, F.2).

Das Fehlen des Exons 12 wurde somit auf Transkriptionsebene eindeutig nachgewiesen und demnach die Entstehung einer mRNA entsprechend dem modifizierten Genort (**Abb. D-2**). Ob diese mutierte mRNA zur Translation eines mutierten Proteins führt, und ob das degenerierte Protein gegebenenfalls abgebaut wird, muss nun untersucht werden. Falls vom L1 Allel ein Protein entstehen sollte, wäre es interessant, dessen Lokalisation und Interaktionen mit dem IP<sub>3</sub> Rezeptor Typ I und der cGMP-abhängigen Kinase Iβ zu untersuchen.

Da die homozygote Deletion des Exons 12 (L1/L1) nicht letal ist, können die Mäuse nun über einen längeren Zeitraum beobachtet werden und mit heterozygoten (+/L1) und Wildtyp (+/+) Mäusen sowohl in Bezug auf das Wachstum als auch auf Verhaltenserscheinungen verglichen werden. Bei manchen genetisch modifizierten Mäusen tritt erst im zunehmenden Alter ein mehr oder weniger deutlicher Phänotyp auf. Dies hängt davon ab, in welcher Entwicklungsphase das veränderte Gen wichtige Funktionen hat. Außerdem wird es interessant sein herauszufinden, ob die homozygoten (L1/L1) Mäuse fertil sind. Verpaarungsversuche sind bereits angelaufen, lieferten aber bislang noch keine klaren Ergebnisse. Zum einen, weil zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht genügend

modifizierte Mäuse gezüchtet werden konnten, und zum anderen, weil aufgrund der geringen Kreuzungsansätze noch keine trächtigen Weibchen hervorgegangen sind.

Wenn später genügend L1/L1 Mäuse gezüchtet sind, werden verschiedene Organe, von denen man weiß, dass *IRAG* dort hoch exprimiert ist, präpariert und untersucht. Neben möglichen äußeren Erscheinungen dieser Organe können sie auch auf verschiedene physiologische Merkmale hin analysiert werden, und damit die Funktion von *IRAG* genauer bestimmt werden. Da phosphoryliertes *IRAG* die  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) in transfizierten COS-Zellen vermindert (Schlossmann et al., 2000), ist dies möglicherweise in Zellen der deletierten Maus nicht mehr der Fall. Ein Experiment dazu ist bereits in Planung. Dazu werden glatte Muskelzellen aus der Aorta isoliert, und nach Kultivierung dieser Zellen in Nährmedium kann die  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung aus dem ER nach Hormonstimulation (z.B. Noradrenalin) untersucht werden (vgl. Feil et al., 2002). Ein weiteres Experiment wäre die Untersuchung des Kontraktions- und Relaxierungsverhalten von glatten Muskeln aus diesen Mäusen. Isolierte präkontrahierte Gefäße aus Mäusen mit deletierter cGMP-abhängiger Kinase I relaxieren im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen nicht mehr nach NO Zugabe, auch wenn ein Anstieg der cGMP Konzentration nachweisbar ist (Pfeifer et al., 1998). Inwieweit dies auch bei den hier erzeugten Mäusen mit mutiertem *IRAG* Gen der Fall ist, werden zukünftige Untersuchungen zeigen.

Zusätzlich wurde eine genetisch modifizierte Mauslinie etabliert, die ein konditionales „gefloxtes“ *IRAG* Allel besitzt und für weitere Cre-gerichtete Mutationen zur Verfügung steht. Durch Verpaarung mit verschiedenen *Cre*-exprimierenden Mäusen kann so im *IRAG* Gen das Exon 12 gewebespezifisch und zeitlich kontrollierbar deletiert werden. Diese Mäuse stehen ebenfalls für detaillierte Analysen der physiologischen Funktion von *IRAG* zur Verfügung.

## E. Zusammenfassung

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in glatten Gefäßmuskelzellen ist von großer Bedeutung für den Tonus von Blutgefäßen. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Kontraktion und Relaxierung der Gefäßmuskulatur und wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Eine möglicherweise entscheidende Rolle bei der Relaxierung könnte das kürzlich identifizierte IRAG (Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor-assoziiertes cGKI Substrat) übernehmen. Phosphorylierung von IRAG durch die cGKI $\beta$  (cGMP-abhängige Proteinkinase  $\beta$ ) führt in COS Zellen zur Inhibierung der  $IP_3$ -induzierten Kalziumfreisetzung und somit zur Verringerung von  $[Ca^{2+}]_i$ . Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das *IRAG* Gen in der Maus unter Verwendung des Cre/loxP Rekombinationssystems genetisch modifiziert. Dieses System lässt sowohl eine konventionelle als auch eine konditionale Modifikation des Zielgens zu. Dazu wurde zunächst die Exon/Intron Struktur des *IRAG* Gens in dem Bereich aufgeklärt, der für die „coiled-coil“ Domäne des Proteins kodiert. Von diesen Domänen ist bekannt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Proteinen untereinander spielen. Im IRAG Protein ist die „coiled-coil“ Domäne möglicherweise für die Interaktion mit der cGKI $\beta$  oder dem  $IP_3$  Rezeptor Typ I verantwortlich. Anhand der Genstruktur wurde das Exon 12 ausgewählt, welches die genetische Information für den vorderen Bereich dieser Domäne trägt, um es mittels homologer Rekombination in ES Zellen mit zwei *loxP* Sequenzen zu flankieren. Der so veränderte („gefloxte“) Genort bildete die Voraussetzung zur Erzeugung von Mauslinien mit einer konventionellen oder konditionalen Mutation des *IRAG* Gens. Mit Hilfe einer „Cre-deleter“ Maus wurde das „gefloxte“ Exon 12 in der Keimbahn deletiert und Mäuse erzeugt, denen im *IRAG* Gen homozygot dieses Exon fehlte. RNS Analysen bestätigten die Entfernung des Exons 12. Mäuse mit dieser konventionellen Deletion im *IRAG* Gen sind lebensfähig und können nun mit verschiedenen Tests auf verhaltensbiologische und physiologische Störungen hin untersucht werden.

Neben der konventionellen Deletion wurde mit dem „gefloxten“ Gen auch gleichzeitig die Möglichkeit zur konditionalen, d.h. zeit- und gewebespezifischen Deletion des Exons 12 im *IRAG* Gen geschaffen. RNS Analysen zeigten, dass die beiden *loxP* Sequenzen keinen Einfluss auf die Transkription des Gens haben. Durch Verpaarung dieser „gefloxten“ Mäuse mit entsprechenden *Cre*-exprimierenden Mäusen kann das Exon 12 nun auch selektiv in ausgewählten Geweben und zeitlich kontrollierbar deletiert werden. Dies bietet weitere Möglichkeiten zur Aufklärung der physiologischen und patho-physiologischen Funktion des *IRAG* Gens.

## F. Anhang

### F.1. Verwendete Oligonukleotide (Primer)

#### F.1.1. PCR- bzw. Sequenzier-Primer

Name	Sequenz in 5' – 3' Richtung	Lokalisation <sup>a</sup>
AA22	GTT TCT GAT AGG TCT CCC GGT GTT	Exon 13 r
AA27	GGT CTG GAT GTG ATG CCC AAC AT	Exon 10 v
AA28	ATG TTG GGC ATC ACA TCC AGA CC	Exon 10 r
AA29	GGA GTC TAG AAT TAA CCA GGC TGA	Exon 12 v
AA30	TCA GCC TGG TTA ATT CTA GAC TCC	Exon 12 r
AA31	GAG AGG CGG GCA GCC AGA CGA T	Exon 13 r
AA32	GTG GGT GCT GTT CGC CAG GAA AA	Exon 13 v
AA33	AAG AGA ACG TAT GAG AAG GAC CA	Exon 14 v
AA36	TAT TGC TGC GCA AAC TTA GGG TT	Exon 10 v
AA37	CTC CAA GGT GTA GCT GTC ATT T	Exon 12 r
AA38	CGC CGT TCG AGG AAC CCC GTC TT	Exon 15 r
AA39	GAA TTC TGA TTG GAA AGT TTC TT	Exon 14 r
AA40	CCC CTC CAC TCA CTG AAA AG	Exon 11 v
AA41	CTT TTC AGT GAG TGG AGG GG	Exon 11 r
AA42	AAC CCT AAG TTT GCG CAG CAA TA	Exon 10 v
AA69	GTG ACG AAC TGA GCA GAA AGG TGC	Intron E11/12 v
AA72	ATG CAT GCT ATA GAG AAC TCA T	Intron E11/12 r
AA73	CCA CCG GAA GTG ATG ATG CA	Intron E14/15 v
AA74	CCA CAT CTT ACA CAT ACT GCC TC	Intron E14/15 r
AA77	AAG CCT ATG CCT CAA TGT TGC C	Intron E10/11 v
AA78	AGG GTG GTG TGG TGG AAG GTC	Intron E10/11 r
AA85	CCT CCA GAC AGG AAT TCC TGT	Intron E13/14 v
AA88	TCC CCA CCC AGC ACA GGA AAG	Intron E10/11 v
AA89	ATT GCT TAT CTG CCC TGC CTG	Intron E11/12 v
AA92	CTG TGT TGC TTA GAG AAT ATG GC	Intron E10/11 r
AA93	CGA GCT GGC ATG ATC AGT CTC C	Intron E11/12 r
33-38-For2	GGA GCA GAT CGG CAT CCC TAG TC	Intron E14/15 v
33-38-For3A	GGG GCA GGG TTG GAG TCT GGG C	Intron E14/15 v
33-38-For3B	AAA AGG CCT AAA CTA AGT GA	Intron E14/15 v
33-38-For4A	AAC CAT GCC TTT GCC CTG T	Intron E14/15 v

<sup>a</sup> v, vorwärts; r, rückwärts

#### F.1.2. Primer zur Konstruktion des Targeting Vektors

Name	Sequenz in 5' – 3' Richtung	Lokalisation <sup>a</sup>
AA81	GAT ATC GCG GCC GCG GAC CTT CCA CCA CAC CAC CCT	5' Arm v
AA82	GAT ATC CCG CCG GGA AGA TCT TCC AGA ACA TCC ACG TTT GGG TTG AG	5' Arm r
AA53	GAT ATC GGA AGA TCT TCC TGA TTC AGG GAA AGG CAG AAT GC	Mittleres Fragment v
AA54	GAT ATC GGA AGA TCT TCC TGG CCT TGG AGC TAA GAG AAA CA	Mittleres Fragment r
AA55	GAT ATC CCA TCG ATG GAG TTC GGG TTT CAG CAT GGT TAG	3' Arm v
AA56	GAT ATC CCA TCG ATG GTT GGC GCG CCA ATA GGA TTC CTC TAC AAG ATT CCT C	3' Arm r

<sup>a</sup> v, vorwärts; r, rückwärts

### F.1.3. Primer für die Sondenherstellung

Name	Sequenz in 5' – 3' Richtung	Lokalisation <sup>a</sup>
AA75	CAA AAT GGA CCA CAG ACC TTA ATG	5' Sonde v
AA76	CCA AGA CAA TGC AGA GTA ATG GC	5' Sonde r
AA86	CTG TGG CAC TGG GCT GAG GG	3' Sonde r
AA87	ACA GGA ATT CCT GTC TGG AGG	3' Sonde v
AA55	siehe F.1.2	Interne Sonde v
AA31	siehe F.1.1	Interne Sonde r

<sup>a</sup> v, vorwärts; r, rückwärts

### F.1.4. Primer zur Genotypisierung

Name	Sequenz in 5' – 3' Richtung	Lokalisation <sup>a</sup>
MA3	CTG CTT ACA CAG CTC TGG CCT	5' von <i>loxP</i> I v
MA4	CCT TGA TGG TGA AAC ACA CCA	3' von <i>loxP</i> I r
MA6	GCT CAA GCT ACT ATA ATG CAT T	5' von <i>loxP</i> II v
MA7	GCC AGG CTA TAA AGA GAG GTT	3' von <i>loxP</i> III r
Cre800	GCT GCC ACG ACC AAG TGA CAG CAA TG	Cre v
Cre1200	GTA GTT ATT CGG ATC ATC AGC TAC AC	Cre r

<sup>a</sup> v, vorwärts; r, rückwärts

### F.1.5. Sonstige verwendete Primer

Name	Sequenz in 5' – 3' Richtung	Lokalisation <sup>a</sup>
Neol	GGA CGT AAA CTC CTC TTC AGA C	Neomycinresistenzgen r
Tk1	GCG GTC GAC TAG AGC TTG CGG A	Thymidinkinasegen v

<sup>a</sup> v, vorwärts; r, rückwärts

## F.2. Sequenzvergleich

### Sequenzvergleich des Wildtyp *IRAG* Genorts mit dem RT PCR Fragment einer deletierten (L1/L1) Maus im Bereich der Exons 10 bis 14

	AA36	Exon 10 • Exon 11				
Wildtyp	ATATTGCTGC	GCAAACCTTAG	GGTTCACAAG	TCACTCACTG	GAAGCGCCCC	TCCACTCACT
Deletiert	ATATTGCTGC	GCAAACCTTAG	GGTTCACAAG	TCACTCACTG	GAAGCGCCCC	TCCACTCACT
		Exon 11 • Exon 12				
Wildtyp	GAAAAGGAAG	TTGAGAACGT	GTTTGTACAA	CTGTCCTTGG	CCTTTAGAAA	TGACAGCTAC
Deletiert	GAAAAGGAAG	TTGAG-----	-----	-----	-----	-----
Wildtyp	ACCTTGGAGT	CTAGAATTAA	CCAGGCTGAA	AGGGAGCGCA	ACCTGACAGA	AGAGAACACG
Deletiert	-----	-----	-----	-----	-----	-----
			Exon 12 • Exon 13			
Wildtyp	GAGAAGGAAC	TGGAAAACCTT	CAAAGCCTCC	ATAACGTCCT	CAGCAAACAT	CTGGTACCAC
Deletiert	-----	-----	-----	-----TCCT	CAGCAAACAT	CTGGTACCAC
Wildtyp	TGCGAACACC	GGGAGACCTA	TCAAGAAACT	TCTGGAAGAC	ATCGCCGTCT	TGCATCGTCT
Deletiert	TGCGAACACC	GGGAGACCTA	TCAAGAAACT	TCTGGAAGAC	ATCGCCGTCT	TGCATCGTCT

Exon 13 • Exon 14

Wildtyp GGCTGCCCCG CTCTCCAGTC GGGCTGAAGT GGTGGGTGCT GTTCGCCAGG AAAAGCGCAT  
 Deletiert GGCTGCCCCG CTCTCCAGTC GGGCTGAAGT GGTGGGTGCT GTTCGCCAGG AAAAGCGCAT

Wildtyp GTCAAAGGCC ACGGAAGTGA TGATGCAGTA TGTGGAGAAT CTGAAGAGAA CGTATGAGAA  
 Deletiert GTCAAAGGCC ACGGAAGTGA TGATGCAGTA TGTGGAGAAT CTGAAGAGAA CGTATGAGAA

AA39

Wildtyp GGACCATGCT GAGCTCATGG AATTTAAGAA ACTTGCAAAT CAGAA  
 Deletiert GGACCATGCT GAGCTCATGG AATTTAAGAA ACTTGCAAAT CAGAA

### F.3. Verwendete Restriktionsenzyme

Tabelle F-1 Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Firma	Erkennungssequenz	Puffer
<i>Bam</i> HI	NEB	5'-G/GATCC-3'	NEB <i>Bam</i> HI
<i>Bgl</i> II	NEB	5'-A/GATCT-3'	NEB 3
<i>Bst</i> XI	NEB	5'-CCANNNNN/NTGG-3'	NEB 3
<i>Cla</i> I	Roche	5'-AT/CGAT-3'	H
<i>Dra</i> I	NEB	5'-TTT/AAA-3'	NEB 4
<i>Eco</i> RI	NEB	5'-G/AATTC-3'	NEB 3
<i>Eco</i> RV	NEB	5'-GAT/ATC-3'	NEB 2
<i>Hind</i> III	NEB	5'-A/AGCTT-3'	NEB 2
<i>Kpn</i> I	NEB	5'-G/GTACC-3'	B, NEB 1
<i>Mlu</i> I	NEB	5'-A/CGCGT-3'	NEB 3
<i>Nco</i> I	NEB	5'-C/CATGG-3'	NEB 4
<i>Nhe</i> I	NEB	5'-G/CTAGC-3'	NEB 2
<i>Not</i> I	NEB	5'-GC/GGCCGC-3'	NEB 3
<i>Pae</i> I	NEB	5'-TTAAT/TAA-3'	NEB 1
<i>Pst</i> I	NEB	5'-CTGCA/G-3'	NEB 3
<i>Sal</i> I	NEB	5'-G/TCGAC-3'	NEB U
<i>Sma</i> I	NEB	5'-CCC/GGG-3'	NEB 4
<i>Spe</i> I	NEB	5'-A/CTAGT-3'	NEB 2
<i>Sph</i> I	NEB	5'-GCATG/C-3'	NEB 2
<i>Sst</i> I	Gibco-BRL	5'-G/TCGAC-3'	R 2
<i>Stu</i> I	NEB	5'-AGG/CCT-3'	NEB 2
<i>Xba</i> I	NEB	5'-T/CTAGA-3'	NEB 2
<i>Xho</i> I	NEB	5'-C/TCGAG-3'	NEB 2

N steht für ein beliebiges Nukleotid. Die Schnittstellen sind mit / gekennzeichnet. Die optimale Inkubationstemperatur ist für fast alle angegebenen Enzyme 37°C , für *Sma*I 25°C.



## F.4. Geräteverzeichnis

ABI Prism™ Sequence-Analyser, Perkin-Elmer Applied Biosystems

Brutschrank, Memmert

Certomat® R (Schüttler), B. Braun

Gene Pulser™ (zur Elektroporation), Bio-Rad

Handmonitor LB1210B, Berthold

IR 1500 Automatic CO<sub>2</sub> Incubator, Flow-Laboratories

Laminar Air HB 2448, Heraeus Instruments

Mini Oven MKII, MWG-Biotech

Multi Temp II (Wasserbad), Pharmacia

Phosphoimager, raytest GmbH

Photometer specord 40, Analytik Jena

Standard Powerpack P25, Biometra

Stereomikroskop Stemi SV6, Zeiss

Stickstofftank Chronos, Messer

Thermomixer compact, Eppendorf

Thermostat 5320, Eppendorf

Ultra Turrax, IKA Werk

UNO-Thermoblock für PCR, Biometra

UV Stratalinker 1800, Stratagene

Vacuum Concentrator, Bachofer

Zentrifugen: 5417 C (Rotor: F 45-30-11), 5804 R (Rotor: Hermle Z320), 5412, Eppendorf;

J2-HS, Beckmann; Rotanta/AP, Hettich

## F.5. Firmenverzeichnis

<b>Name</b>	<b>Ort</b>	<b>Land</b>
Altromin	Lage	Deutschland
Amersham Biosciences Europe GmbH	Freiburg	Deutschland
Applied Biosystems GmbH	Weiterstadt	Deutschland
Bio-Rad Laboratories GmbH	München	Deutschland
Biozym Diagnostik GmbH	Hess. Oldendorf	Deutschland
Boehringer GmbH (jetzt Roche)	Mannheim	Deutschland
Charles River GmbH	Sulzfeld	Deutschland
Gibco-BRL (jetzt Invitrogen)		
ICN Biomedicals GmbH	Eschwege	Deutschland
Iffa Credo (Charles River GmbH)		
Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Macherey-Nagel GmbH	Düren	Deutschland
MWG Biotech	Ebersberg	Deutschland
New England Biolabs GmbH (NEB)	Frankfurt	Deutschland
Nunc	Wiesbaden	Deutschland
Perkin-Elmer (jetzt Applied Biosystems GmbH)		
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen	Deutschland
Qiagen GmbH	Hilden	Deutschland
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim	Deutschland
Schleicher & Schuell	Dassel	Deutschland
Sigma Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen	Deutschland
Stratagene Europe	Amsterdam	Niederlande

## G. Literaturverzeichnis

### G.1. Zitierte Veröffentlichungen

- Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P., and Toro, L. (1998). The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* **273**, 32950-6.
- Ammendola, A., Geiselhoeringer, A., Hofmann, F., and Schlossmann, J. (2001). Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I-beta. *J Biol Chem* **276**, 24153-9.
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- 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.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., and Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* **11**, 82-8.
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288-92.
- 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.
- Dupé, 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.
- Feil, R., Gappa, G., Rutz, M., Schlossmann, J., Rose, C.R., Konnerth, A., Brummer, S., Kühbandner, S., and Hofmann, F. (2002). Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circ Res* **90**, 1080-6.
- 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.
- 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.
- Ignarro, L. J., Cirino, G., Casini, A., and Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* **34**, 879-86.
- 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.
- Kühbänder, S., Brummer, S., Hofmann F., and Feil, R. (2000). Conditional gene targeting in smooth muscle of mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol* **361**.
- Kühbandner, S. (2001). Induzierbare Cre-vermittelte Rekombination im glatten Muskel der Maus. Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München.
- 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.
- Lohmann, S. M., Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Walter, U., and De Jonge, H. R. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* **22**, 307-12.
- Lupas A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **22**, 375-82.
- Metzger, D., and Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 470-6.
- 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.

- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-6.
- 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.
- 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.
- 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.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.-X., Allescher, H.-D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., and Ruth, P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I-beta. *Nature* **404**, 197-201.
- 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**, 39193-9.
- Shaughnessy, J. D. Jr., Largaespada, D. A., Tian, E., Fletcher, C. F., Cho, B. C., Vyas, P., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (1999). *Mrvil*, a common MRV integration site in BXH2 myeloid leukemias, encodes a protein with homology to a lymphoid-restricted membrane protein Jaw1. *Oncogene* **18**, 2069-84.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.

- Strachan, T., and Read, AP. (1996). *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., Tang, K. M., Ito, M., Lincoln, T. M., and Mendelsohn, M. E. (1999). Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I $\alpha$ . *Science* **286**, 1583-7.
- Torres, R. M., and Kühn, R. (1997). *Laboratory protocols for conditional gene targeting*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- 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.

## G.2. Eigene Veröffentlichungen

### Abstract

- Werner, M., Schmidt, H., Henning, M., Moré, M.I., Kühbandner, S, Hofmann, F., Feil, R, and Rathjen, F.G. (2002). cGMP-dependent proteinkinase I $\alpha$  is required for the guidance of sensory axons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol* **365** R55.

### Orginalarbeit

- Schmidt, H., Werner, M., Heppenstall, P. A., Henning, M., Moré, M. I., Kühbandner, S., Lewin, G. R., Hofmann, F., Feil, R., and Rathjen, F. G. (2002). cGMP-mediated signalling via cGKI $\alpha$  is required for the guidance and connectivity of sensory axons. *J Cell Biol* **159**, 489-98.

## **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.

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

Dr. Jens Schlossmann für die Möglichkeit, dieses Thema bearbeiten zu können, sowie für seine fachliche Unterstützung.

Sabine Brummer, unserem guten Geist im Labor, für die vielen Kleinigkeiten im täglichen Laboralltag und für die Hilfe bei der Genotypisierung der Mäuse.

Susi, GG und Wiebke für die tatkräftige Unterstützung sowie Geli, Kleppi, René, Pascal und allen anderen im Erdgeschoss und 1. Stock für das gute Arbeitsklima.

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

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