

Gezielte Inaktivierung von Genen der TRP-Kanalproteine

Dissertation

zur Erlangung des Grades

der Doktorin der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultäten

der Universität des Saarlandes

Jenny Olausson

Saarbrücken

2006

Tag des Kolloquiums:	23. Juni 2006
Dekan:	Prof. Dr. K. Hegetschweiler
Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Flockerzi Prof. Dr. R. W. Hartmann Prof. Dr. P. Ruth
Akademischer Mitarbeiter:	Dr. C. Kegler

To the memory of Tommy Olausson

There's no problem, only solutions...

John Lennon (Watching the wheels)

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung und Inaktivierung des TRPV6 Gens von Maus. Parallel dazu habe ich an den gleichzeitig durchgeführten Experimenten zur Inaktivierung der Gene TRPM4 und TRPM7 mitgearbeitet. Aus dem Vergleich dieser Maus-Tiermodelle mit den entsprechenden Wildtyp-Tieren soll auf die Funktion des ausgeschalteten Gens geschlossen und das TRPV6-Protein als mögliches Zielmolekül für neue Medikamente definiert werden. Zunächst wurde die cDNS von TRPV6 aus polyA⁺-RNS kloniert, die aus Plazenta von Maus präpariert worden war. Die cDNS umfasst 2184 Basenpaare und kodiert ein Protein von 727 Aminosäureresten. Dieses Protein, das TRPV6-Protein, lässt sich in drei etwa gleich große Bereiche unterteilen. Der Aminoterminus ist hydrophil und im Zytosol lokalisiert; er enthält mehrere Ankyrin-Repeats, Proteinmodule, die für die Dimerisierung von TRPV6-Proteinen essentiell sind. Der mittlere Teil des Proteins ist hydrophob und umfasst sechs Proteinsegmente die wahrscheinlich als α -Helizes die Zellmembran durchqueren. Zwischen der fünften und der sechsten Helix liegt eine ca. 30 Aminosäurereste lange Sequenz die zur Pore des TRPV6-Ionenkanals beiträgt. Der C-Terminus ist wiederum hydrophil und im Zytosol lokalisiert. Er enthält mindestens eine Bindungsstelle, die das Protein Calmodulin kalziumabhängig bindet. Nach Expression der TRPV6 cDNS in Zellkulturzellen werden Kationenkanäle exprimiert, die in erster Linie für Ca²⁺-Ionen permeabel sind und einen Ca²⁺-Einstrom in die Zelle ermöglichen. TRPV6-Transkripte werden in Zellen der Bauchspeicheldrüse (Pankreas), Niere und Plazenta exprimiert. Allerdings konnte bisher weder von unserer Arbeitsgruppe noch von einer anderen Arbeitsgruppe in diesen Zellen die Ströme durch TRPV6-Kanäle gemessen werden. Die gleichen Protokolle, mit denen nach Expression der cDNS in Kulturzellen kalziumselektive Ströme relativ einfach charakterisiert werden können, führen nicht zur Detektion entsprechender Ströme in hPrimärzellen aus Pankreas und Plazenta, die TRPV6 ‚von Natur aus‘ exprimieren.

Durch Inaktivierung des Gens von TRPV6 in Maus soll diese Diskrepanz aufgelöst werden. Hierzu wurde zunächst das TRPV6-Gen von Maus charakterisiert. Es erstreckt sich über 15 660 Basenpaare, enthält 15 Exonabschnitte und ist auf Chromosom 6 lokalisiert. Im nächsten Schritt wurden verschiedene Strategien zum Targeting des Gens in Erwägung gezogen. Begonnen wurde mit einer Strategie, die es erlaubt, das Gen mit Hilfe des Cre/loxP-Systems zu inaktivieren, aber gleichzeitig auch über das Tetrazyklin-Regulationssystem zu überexprimieren bzw. seine Expression zu hemmen. Diese Strategie, die sich in parallelen Arbeiten in der Arbeitsgruppe, an denen ich ebenfalls beteiligt war, zum Targeting des TRPM7-Gens auf Anhieb bewährt hat, führte bei TRPV6 zu keinem Ergebnis. Insgesamt 1279 selektionierte ES-Zellklone wurden isoliert, zeigten aber keine Rekombination. Im nächsten Schritt wurde deshalb die verwendete Strategie durch zusätzliche Negativselektion modifiziert. Es wurden 289 selektionierte ES-Zellklone isoliert; allerdings kam es auch bei dieser

Strategie zu keiner Rekombination. Es wurde deshalb eine grundlegend andere Targeting-Strategie entwickelt, wobei auch die Zielsequenz des Targetings innerhalb des TRPV6-Gens geändert wurde; statt dem ersten translatierten Exon sollten die Exons 13, 14 und 15 des TRPV6-Gens deletiert werden. Weiterhin wurden jetzt prinzipiell zwei Ziele angestrebt: Erstens sollte das Gen inaktiviert werden, so dass kein Protein translatiert wird. Zweitens sollte das Gen mutiert werden, so dass zwar das Protein synthetisiert wird, es aber nicht die typische Kanalaktivität aufweist. Beide Ziele wurden bei der angewendeten Strategie kombiniert und es konnten aus 1140 selektionierten ES-Zellklonen ein rekombinanter Klon, Klon 6F11, für die Inaktivierung des Gens, und zwei rekombinante Klone, die Klone 8E11 und 16F8, für die Synthese eines inaktiven Proteins isoliert werden. Nach Injektion der ES-Zellen 6F11, 8E11 und 16F8 in Blastozysten und Austragen der resultierenden Embryonen durch Ammenmütter wurden chimäre Tiere für beide Targeting-Ereignisse geboren. Ein Teil dieser Tiere hat die Mutation an die F1-Generation weitergegeben, so dass Tiere entstanden, die heterozygot für die in das TRPV6-Gen eingeführten Mutationen sind. Anschließend wurden diese Tiere untereinander verpaart um so Tiere zu züchten, die homozygot für die eingeführten Mutationen sind. Inzwischen sind vier TRPV6 knock-out Mäuse geboren worden. Aus den Defiziten dieser Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren mit unverändertem TRPV6-Gen sollte sich die Funktion des TRPV6-Proteins ergeben sowie neue Perspektiven im Hinblick auf TRPV6 als mögliches Zielmolekül neuer Pharmaka. Parallel zu den Arbeiten zu TRPV6, die den Hauptteil meiner Untersuchungen ausgemacht haben, war ich am Targeting von TRPM7 und insbesondere von TRPM4 beteiligt. Tiere, die homozygot sind für Mutationen in beiden Genen existieren bereits. und für den Phänotyp von TRPM4-Tieren ist eine Publikation in Vorbereitung.

SUMMARY

The major aim of this study was the characterization and inactivation of the mouse TRPV6 gene. Comparing KO mice to their corresponding wild type littermates is an established strategy to elucidate the physiological role of a particular gene in an organism and to define it as a potential drug target. Roughly, the project can be subdivided in three parts: first, cloning and characterization of the mouse TRPV6 protein coding cDNA. Second, characterization of the mouse TRPV6 gene, designing a suitable strategy, construction of the targeting vector and performing targeting in embryonic stem cells and selection of recombinant clones and third, injection of these clones into mouse blastocysts to generate transgenic animals.

First, cDNA of mouse TRPV6 was cloned from polyA⁺-RNA derived from murine placenta. This cDNA comprises 2184 base pairs, encoding a 727 amino acid protein. TRPV6 is a member of the TRPV subfamily of the TRP superfamily of cation channels, which comprises 28 genes in the mouse genome. Upon heterologous over-expression of TRPV6-cDNA in a mammalian cell line, cation channels are formed which are highly calcium-selective and allow calcium influx into the cell. Within the TRP family, TRPV6, and the highly related TRPV5, are the most calcium selective ion channels. The TRPV6 protein sequence can be subdivided in three segments of approximately the same length. The amino-terminal is hydrophilic and localized in the cytoplasm. It contains several ankyrin-repeats, which are protein modules essential for multimerisation of TRPV6-proteins. The middle part of the protein is hydrophobic and contains six protein segments, presumably spanning the cell membrane as α -helices. Between the fifth and the sixth helix a 30 amino acid sequence contributing to the selectivity filter of the TRPV6 ion channel is located. Finally, the carboxy-end is hydrophilic and is again localized in the cytoplasm. It contains at least one binding site for calcium-dependent binding of calmodulin. TRPV6 transcripts are found in pancreas, kidney and placenta. Notably, at the time of writing no reports were made concerning the measurement of native TRPV6-channels in these cells, despite the extensive characterization of TRPV6 in a heterologous overexpression system. It is to be expected that the inactivation of the TRPV6 gene in mouse, and subsequent comparison of channel activity in wild-type and KO tissue, is the most promising strategy to overcome this discrepancy.

Second, I characterized the mouse TRPV6 gene. It covers 15 660 base pairs, consisting of 15 exons and is localized on mouse chromosome 6. Next, several gene-targeting strategies were considered, and the corresponding targeting vector was constructed. In the initial strategy, the first exon of the TRPV6 gene, containing the start ATG, was targeted. The targeting vector was constructed as such that conditional gene inactivation using the Cre/loxP system, simultaneously with overexpression or inactivation by the tetracycline regulatory system could be achieved. This strategy was successfully

applied for targeting of the TRPM7 gene, a project also conducted in our group. However, in case of the TRPV6 gene this strategy did not lead to positive results: a total of 1279 ES-cell clones were isolated but did not show homologous recombination. Therefore, in the next step we modified this targeting strategy by including a negative selection cassette in the targeting vector. 289 ES-cell clones were isolated, but again no clone showed homologous recombination. Thus finally, a totally different targeting strategy was developed using a different part of the TRPV6 gene as target sequence. Instead of the first translated exon, now exons 13, 14 and 15 should be deleted. These exons contain the sequence contributing to the selectivity filter of the TRPV6 channel. Upon removal of these exons a protein consisting of the N-terminus and 5 transmembrane domains will be formed, lacking the ion conducting pore of the TRPV6 channel and the complete C-terminus. Furthermore, in a parallel strategy we aimed at mutating the TRPV6 gene, by introducing a point mutation which would functionally impair channel function, without compromising protein expression. Suitable targeting vectors were constructed and 1140 ES-cell clones were analyzed using southern blot. Among these, one recombinant clone, clone 6F11, for inactivation of TRPV6 and two recombinant clones, clones 8E11 and 16F8, for generation of a functionally inactive, but structurally intact protein were identified. Third, these positive clones were injected into blastocysts to generate transgenic animals. After blastocyst injection of the ES-cell clones 6F11, 8E11 and 16F8 and implantation into surrogate mothers, chimeric mice for both targeting events were born. For each of these groups, some of the mice passed the mutation to the F1-generation, thus establishing germ-line transmission was successful. Heterozygote mice for the introduced mutation were born and are viable. Subsequently, those mice were bred to generate homozygote TRPV6 knock-out mice and at the time of writing four knock-out mice have been obtained. Analyzing the phenotype of these TRPV6 knock-out mice in comparison to their wild type littermates, will allow elucidation of the functional role and the importance of the TRPV6 protein in individual cells and the whole organism. As a result, perspectives for application of TRPV6 as a new drug target can be evaluated.

In parallel to the above described work, I simultaneously contributed to experiments leading to the inactivation of the mouse TRPM4 and TRPM7 genes. Mice with homozygote mutations in those genes exist by now, and phenotypes are being analyzed. A manuscript describing part of the TRPM4 phenotype is in preparation.

1 INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
1 INHALTSVERZEICHNIS	5
2 VERZEICHNIS VON ABBILDUNGEN UND TABELLEN	8
2.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
2.2 TABELLENVERZEICHNIS.....	9
3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
4 EINLEITUNG	15
4.1 DIE TRP-PROTEINE.....	17
4.1.1 DIE TRPC-FAMILIE	17
4.1.2 DIE TRPV-FAMILIE	18
4.1.3 DIE TRPM-FAMILIE	20
4.1.4 DIE TRPA-FAMILIE	22
4.1.5 DIE TRPP-FAMILIE.....	22
4.1.6 DIE TRPML- FAMILIE.....	23
4.2 TARGETING VON GENEN IN EMBRYONALEN STAMMZELLEN	23
5 FRAGESTELLUNG	35
6 MATERIAL UND METHODEN	37
6.1 MATERIAL	37
6.1.1 GERÄTE UND ARBEITSMATERIAL.....	37
6.1.2 CHEMIKALIEN	38
6.1.3 REAGENZIENSYSTEME.....	38
6.1.4 NUKLEOTIDE UND OLIGODEOXYNUKLEOTIDE.....	39
6.1.5 RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN UND MODIFIZIERENDE ENZYME	44
6.1.6 PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGISCHE EXPERIMENTE	45
6.1.7 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME	49
6.1.8 NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE KULTUR VON BAKTERIEN.....	50
6.1.9 VERSUCHSTIERE UND ZELLINIEN.....	50
6.1.10 NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE KULTUR VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN.....	51

6.2	METHODEN FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGISCHEN EXPERIMENTE.....	54
6.2.1	KULTURBEDINGUNGEN FÜR BAKTERIEN	54
6.2.2	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN	54
6.2.3	TRANSFORMATION VON PLASMID DNS IN KOMPETENTE BAKTERIENZELLEN	55
6.2.4	ISOLIERUNG VON PLASMID DNS AUS BAKTERIEN.....	55
6.2.5	REINIGUNG VON PLASMID-DNS UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNS.....	57
6.2.6	MODIFIKATION VON PLASMID-DNS MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	58
6.2.7	MODIFIKATION VON PLASMID-DNS MIT ANDEREN ENZYMEN	59
6.2.8	GELELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG UND NACHWEIS VON DNS	60
6.2.9	ISOLIERUNG EINZELNER DNS-FRAGMENTE	61
6.2.10	AMPLIFIZIERUNG VON DNS MIT HILFE DER POLYMERASEKETTENREAKTION	62
6.2.11	EINFÜGEN VON GEZIELTEN PUNKTMUTATIONEN IN DNS	63
6.2.12	HERSTELLUNG REKOMBINANTER PLASMIDE DURCH LIGATION.....	64
6.2.13	SEQUENZIERUNG VON DNS.....	66
6.2.14	ISOLIERUNG GENOMISCHER DNS	69
6.2.15	SOUTHERN-BLOT-ANALYSE.....	71
6.2.16	ISOLIERUNG VON RIBONUKLEINSÄUREN.....	73
6.2.17	GELELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG UND NACHWEIS VON RNS.....	76
6.2.18	NORTHERN-BLOT-ANALYSE	77
6.2.19	SYNTHESE VON CDNS AUS MRNS (ERSTSTRANGSYNTHESE)	80
6.3	METHODEN ZUM GENE-TARGETING IN EMBRYONALEN STAMMZELLEN VON MAUS ...	81
6.3.1	KULTIVIERUNG VON EMBRYONALEN STAMMZELLEN VON MAUS	82
6.3.2	DURCHFÜHRUNG DES „GENE –TARGETING“.....	88
6.3.3	INJEKTION REKOMBINANTER ES-ZELLKLONE IN BLASTOZYSTEN.....	96
6.3.4	UTERUSTRANSFER	98
6.3.5	VERPAARUNG DER CHIMÄREN TIERE	99
6.4	METHODEN DER MAUSZUCHT.....	99
6.4.1	SPF-TIERHALTUNG.....	99
6.4.2	MARKIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER TIERE	101
6.4.3	GENOTYPISIERUNG DER MÄUSE MITTELS PCR.....	101
7	ERGEBNISSE.....	103
7.1	KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES TRPV6 GENS VON MAUS.....	103
7.1.1	DAS TRPV6 GEN UND CDNS	103
7.1.2	EXPRESSIONSMUSTER VON TRPV6 VON MAUS	106
7.2	PLANUNG UND ERSTELLUNG DER TARGETINGVEKTOREN FÜR DAS TRPV6 GEN	107
7.2.1	DER TARGETINGVEKTOR pMCATL_26 – GENINAKTIVIERUNG UNTER VERWENDUNG DES TETRACYCLINABHÄNGIGEN REGULATIONSSYSTEMS.....	108
7.2.2	DER TARGETINGVEKTOR pMCATL_36.....	118
7.2.3	DIE TARGETINGVEKTOREN pMCATL_52 UND pMCATL_52-A.....	121
7.3	TARGETING DES TRPV6-GENS	133
7.3.1	VERSUCHE, DIE MIT DEM TARGETINGKONSTRUKT pMCATL_26 DURCHGEFÜHRT WURDEN	133

7.3.2	VERSUCHE, DIE MIT DEM TARGETINGKONSTRUKT pmCATL_36 DURCHGEFÜHRT WURDEN	135
7.3.3	VERSUCHE, DIE MIT DEN TARGETINGKONSTRUKTEN pmCATL_54 UND 54-A DURCHGEFÜHRT WURDEN	136
7.4	INJEKTION DER REKOMBINANTEN ES-ZELLKLONE IN BLASTOZYSTEN UND CHARAKTERISIERUNG DER CHIMÄREN	140
7.5	BESTIMMUNG DER MAUS-GENOTYPEN	143
7.5.1	GENOTYPISIERUNG DER NACHKOMMEN DER CHIMÄREN	143
7.5.2	GENOTYPISIERUNG DER NACHKOMMEN HETEROZYGOTER TIERE NACH VERPAARUNG MIT CRE-DELETER-TIEREN	146
7.5.3	GENOTYPISIERUNG DER NACHKOMMEN DER HETEROZYGOTEN MÄUSE NACH VERPAARUNG MIT DER FLP-MAUSLINIE	147
7.5.4	GENOTYPISIERUNG DER KNOCK-OUT MÄUSE	148
7.6	TRPV6 KNOCK-OUT TIERE	150
8	DISKUSSION	153
9	LITERATURVERZEICHNIS	161
9.1	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	161
9.2	ZITIERTE VERÖFFENTLICHUNGEN	161
9.3	DATENBANKEN	174
	DANKSAGUNG	175

2 VERZEICHNIS VON ABBILDUNGEN UND TABELLEN

2.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4-8 Das Tetracyclinabhängige Regulationssystem Tet-Off.	34
Abbildung 7-1 Maus TRPV6 Gen und cDNS	105
Abbildung 7-2 Klonierung der Northern Sonden zum Nachweis von mTRPV6	106
Abbildung 7-3 Maus TRPV6 Expressionsmuster	107
Abbildung 7-4 Die Regulationskassette triTaubi.AF	108
Abbildung 7-5 Targetingkonstrukt zur Inaktivierung des TRPV6 Gens	111
Abbildung 7-6 Targeting des ersten Exons - Klonierung des 5'-homologen Arms	112
Abbildung 7-8 Targeting des ersten Exons - Klonierung des Targetingkonstruktes pmCaTL_26	115
Abbildung 7-9 Targeting des ersten Exons - Southern-Strategie	116
Abbildung 7-10 Targeting des ersten Exons - Klonierung der Southernsonden.	117
Abbildung 7-11 Targeting des ersten Exons - Testen der Southernsonden	118
Abbildung 7-12 Targeting des ersten Exons – Modifizieren der Targeting-Strategie	119
Abbildung 7-13 Targeting des ersten Exons - Klonierung des Hilfsvektors pmCaTL_34	119
Abbildung 7-14 Targeting des ersten Exons - Klonierung des Targetingkonstruktes pmCaTL_36 ...	120
Abbildung 7-15 Neue Strategie für die Inaktivierung von TRPV6 - Targeting der Exons 13 bis 15..	123
Abbildung 7-16 Targeting der Exons 13 bis 15 - Klonierung der Hilfsvektoren.....	124
Abbildung 7-17 Targeting der Exons 13 bis 15 - Klonierung der mit frt-Sequenzen flankierten Neomycin-Resistenzkassette.	124
Abbildung 7-18 Targeting der Exons 13 bis 15 - Klonierung der 5'Homologie.....	127
Abbildung 7-19 Targeting der Exons 13 bis 15 - Klonierung der Exons 13 bis 15.	128
Abbildung 7-20 Targeting der Exons 13 bis 15 - Klonierung der 3'Homologie.....	129
Abbildung 7-21 Targeting der Exons 13 bis 15 - Klonierung der Targetingkonstrukte pmCaTL_54 und pmCaTL_54-A	130
Abbildung 7-22 Targeting der Exons 13 bis 15 - Southern-Strategie.....	131
Abbildung 7-23 Targeting der Exons 13 bis 15 -Klonierung der Southern Sonden	132
Abbildung 7-24 Targeting der Exons 13 bis 15 - Testen der Southern Sonden.....	133
Abbildung 7-25 Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_26 – Southern Blots.	134
Abbildung 7-26 Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_36- Southern Blots.	135
Abbildung 7-29 Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_54 und pmCaTL_54-A – Ergebnis.....	138
Abbildung 7-30 Genotyp der Nachkommen aus den Verpaarungen der Chimären.....	143
Abbildung 7-31 Targeting von mTRPV6 - Optimierung des PCR-Protokolls zur Bestimmung der Genotypen	144
Abbildung 7-32 Targeting von mTRPV6 - Genotypisierung der Nachkommen aus dem ersten Wurf 145	145
Abbildung 7-33 Genotypisierung der Nachkommen nach Verpaarung mit Cre.	146
Abbildung 7-34 Genotypisierung der Nachkommen nach Verpaarung mit Flp.....	147
Abbildung 7-35 Genotypisierung der knock-out Mäuse.....	148
Abbildung 7-36 TRPV6-Allele und relative Lage der Primer, die zur Genotypisierung verwendet wurden.	149

Abbildung 7-37 TRPV6 knock-out Maus mit Geschwistern.	152
Abbildung 8-1 Wildtyp-Allel, Targetingvektor und erwartetes mutiertes Allel bei der Inaktivierung des TRPM7 Gens von Maus.....	155
Abbildung 8-2 Wildtyp-Allel, Targetingvektor und rekombinantes Allel L3F2 des TRPM4 Gens.....	156

2.2 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 4-1 Die sieben TRP-Genfamilien mit Angabe ihrer (publizierten) Mitglieder.....	17
Tabelle 6-1 Liste der verwendeten Primer.....	39
Tabelle 6-2 Übersicht über die verwendeten Zellkulturgefäße und die jeweils benötigten Volumina an Zellkulturmedium und Trypsin	86
Tabelle 6-3 Liste der Krankheitserreger für die serologischen Untersuchungen.....	100
Tabelle 7-1 Übersicht über die bei den Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_26 erhaltenen ES-Zellklone	134
Tabelle 7-2 Übersicht über die bei den Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_36 erhaltenen ES-Zellklone	135
Tabelle 7-3 Übersicht über die bei den Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_54 und pmCaTL_54-A erhaltenen Klone.....	136
Tabelle 7-4 Positive ES-Zellklone nach Hybridisierung mit der 3'-Sonde.....	137
Tabelle 7-5 Ergebnis der Blastozysteninjektionen.....	140
Tabelle 7-6 Aufschlüsselung der geborenen Tiere und Abschätzen des Chimärismus	141
Tabelle 7-7 Nachkommen aus den Verpaarungen männlicher Chimären (Zellklone 6F11, 8E11 und 16F8).....	142
Tabelle 7-8 Für die Genotypisierungs-PCR verwendete Primer.....	149
Tabelle 7-9 Dokumentation der Zuchten und Genotypisierungs-Protokolle.....	150
Tabelle 8-1 Übersicht über die bei den Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pMN_18 erhaltenen Klone.....	155
Tabelle 8-2 Übersicht über die bei den Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pM4-27 erhaltenen Klone.....	157
Tabelle 8-3 Targeting des TRPV6-Gens im Vergleich zum Targeting anderer Gene von Ionenkanalproteinen, das von der Arbeitsgruppe in den letzten sechs Jahren durchgeführt wurde.....	157
Tabelle 8-4 Etablierte TRP-defiziente Mausmodelle bzw. Erbkrankheiten, die durch Mutationen von TRP-Genen in Mensch bzw. Maus entstehen.....	159

3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Absorption
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMV	Avian myeloblastosis virus
ANK	Ankyrin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B	Becquerel
BAC	Bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca	Kalzium
cAMP	Zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
CC	Coiled coil Domäne
cDNS	Copy Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	Counts per minute
Cre	Cre-Rekombinase (Causes rekombination)
Da	Dalton, Masseneinheit
DAG	Diacylglycerol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
DEPC	Diethyl-pyrocbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	dATP, dCTP, dGTP oder TTP
dNTPs	Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP und TTP
Dox	Doxycyclin
dpc	Dies post coitum
DRG	Dorsal root ganglion (Hinterhorn Ganglion)
dT	Desoxythymidin
DT-A	Diphtherie Toxin-A Fragment
E.coli	Escherichia coli
EC-Zellen	Embryonale Karzinomzellen
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FCS	Fötale Rinderserum (Fetal calf serum)

Flp	Flp-Rekombinase
g	Gramm
G418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
Gray	Energiedosis (1 J/kg)
GTG	Genetic technology grade
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEK293	Human embryonic kidney Zelllinie
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
Hprt	Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase
HSV-TK	Herpes Simplex Virus Thymidinkinase
ICM	Inner cell mass (Innere Zellmasse)
I_{CRAC}	Calcium release activated calcium current
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosylpyranosid
I_{SOC}	Store operated calcium current
J	Joule
K	Kalium
kb	Kilobasen
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LIF	Leukemia inhibitory factor
loxP	Locus of recombination in P1
m	Masse
M	Molare Masse
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MIC	Magnesium inhibitet current
min	Minute
ml	Milliliter
Mol	Stoffmenge
Mo-MLV	Moloney strain des Murine Leukemia Virus
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
N	Stoffmenge
n	Anzahl
Na	Natrium
Na₂HPO₄	Dinatrium-monhydrogenphosphat
Na-citrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NaH₂PO₄	Natrium-dihydrogenphosphat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
Neo	Neomycin-Resistenzgen
NHERF	Sodium-hydrogen exchanger regulatory factor
Nt	Nukleotid

NUDT9	Nucleoside diphosphate linked moiety X-type motif 9
OD	Optische Dichte
Osm/l	Osmolarität (Molare Menge der gelösten, osmotisch wirksamen Teilchen pro Liter Lösung)
pA	Polyadenylierungs Signal
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PenStrep	Mischung aus Penicillin und Streptomycin
pH	Pondus Hydrogenii; $\text{pH} = -\log c(\text{H}_3\text{O}^+)$
PIP₂	Phosphatidyl Inositol 4,5,-diphosphat
PK	Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PNK	Olynukleotid-Kinase
Primer	Oligodesoynukleotid
Prom	Promotor
RBL	Rat basophilic carcinoma
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
rRNS	Ribosomale RNS
RU486	Mifepriston
SDS	Natriumdodekylsulfat
snRNA	Small nuclear Ribonukleinsäure
SOCC	Store operated calcium current
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
tetO	Tetrazyklin-Operator
TK	Thymidinkinase
T_M	Schmelztemperatur eines DNS-Fragments: $T_M = n(A+T) \cdot 2 + n(G+C) \cdot 4$
TM	Transmembran-Domäne
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
TritonX-100	Octyl-phenol-ethoxylat
tRNS	Transfer RNS
TRP	Transient Receptor Potential
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Spannung
U	Einheit (Unit)
UV	Ultra-violett
V	Volumen
WT	Wildtyp
x g	Multipliziert mit der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosylpyranosid

Liste der Aminosäuren

Name	Einbuchstaben kod	Dreibuchstaben kod
Alanin	a	ala
Arginin	r	arg
Asparagin	n	asn
Asparaginsäure	d	asp
Cystein	c	cys
Glutamin	q	gln
Glutaminsäure	e	glu
Glycin	g	gly
Histidin	h	his
Isoleucin	i	ile
Lysin	k	lys
Methionin	m	met
Phenylalanin	f	phe
Prolin	p	pro
Serin	s	ser
Threonin	t	thr
Tryptophan	w	trp
Tyrosin	y	tyr
Valin	v	val
Leucin	l	leu

4 EINLEITUNG

Für die Funktionstüchtigkeit eines Organismus ist es essentiell Signale wahrzunehmen und darauf reagieren zu können. Die Wahrnehmung von Signalen geschieht mit den Sinnen. Diese wurden von Aristoteles (Aristoteles et al., 1954) in die fünf Sinneskanäle Gehörsinn, Geruchssinn, Geschmackssinn, Gesichtssinn (Sehen) und Tastsinn untergliedert. Heute rechnet man außerdem noch den Temperatursinn (Thermozeption), das Schmerzempfinden (Nozizeption), den Gleichgewichtssinn und die Propriozeption (Körperempfinden oder Tiefensensibilität) dazu. Manche Tierarten besitzen außerdem noch Sinne für die Polarisierung des Lichtes oder für das Magnetfeld der Erde. Bei der Untersuchung der Photorezeption von *Drosophila melanogaster* durch Herstellung von Mutanten fiel eine Mutante dadurch auf, dass die Stromantwort nach einem Lichtreiz transient und nicht andauernd war (Montell et al., 1985). Das bei dieser Fliege mutierte Gen wurde nach dem Phänotyp der Mutante transient receptor potential oder ‚trp‘ genannt. Mittlerweile sind eine Reihe von strukturell verwandten Proteinen identifiziert worden, wodurch eine Familie von TRP-Proteinen entstanden ist (Tabelle 4-1). Mitglieder dieser Familie sind in so unterschiedlichen Organismen wie Würmern, Fliegen und Säugern konserviert und haben so vielfältige Funktionen wie Thermozeption, Chemosensation, Pheromonrezeption, Magnesiumhomeostase und Blutdruckregulation. Das verbindende Merkmal der TRP Superfamilie besteht darin, dass ihre Mitglieder Membranproteine mit sechs die Plasmamembran durchspannenden Sequenzabschnitten und einer Pore zwischen der fünften und sechsten dieser Transmembrandomänen sind (Abbildung 4-1). TRP-Proteine bilden Kationenkanäle und auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit mit Kaliumkanälen (Yellen, 2002) wird vermutet, dass sie zu Tetrameren zusammengelagert in der Zellmembran vorliegen - entweder als Homotetramer aus vier gleichen TRP-Proteinen oder als Heterotetramer aus verschiedenen TRP-Proteinen.

Die meisten TRP-Kanäle leiten unselektiv Kationen und sind mäßig spannungsabhängig. Die bei Säugern vorkommenden TRP-Proteine werden nach ihrer Sequenzähnlichkeit zueinander in sechs Familien unterteilt: TRPC (kanonische), TRPV (Vanilloidrezeptor-ähnliche), TRPM (Melastatin-ähnliche), TRPA (Ankyrinreiche TRP-Proteine), TRPP (sind mutiert bei der familiären Zystenniere, PKD (polycystic kidney disease)), und TRPML (Mucolipin-ähnliche) (Montell et al., 2002). In heterologen Expressionssystemen ist die Mehrzahl der TRP-Kanäle durchlässig für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺-Ionen. Zwei TRP-Kanäle leiten sehr selektiv Ca²⁺-Ionen (TRPV5 und TRPV6), zwei sind selektiv für monovalente Kationen (TRPM4 und TRPM5), letztere leiten kein Ca²⁺. Abgesehen von den sechs Transmembrandomänen gibt es weitere strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen den Mitgliedern der TRP-Familien. Dabei ist die in allen Mitgliedern der TRPC-Familie im proximalen C-Terminus gelegene Aminosäuresequenz ‚EWKFAR‘, die so genannte TRP-Domäne, weniger stark in der TRPV- und TRPM-Familie konserviert. Die Funktion dieser TRP-Domäne ist bislang ungeklärt. In

den aminoterminalen Sequenzabschnitten von Mitgliedern der TRPC, TRPV und TRPA-Familien kommen so genannte Ankyrin-Repeats in variabler Zahl vor. Als Ankyrin-Repeats wird eine 33 Aminosäurereste lange Sequenz bezeichnet, die sich zu einer β - α - α - β Struktur faltet und die wahrscheinlich als Modul für die Wechselwirkung von Proteinen miteinander dient (Sedgwick and Smerdon, 1999).

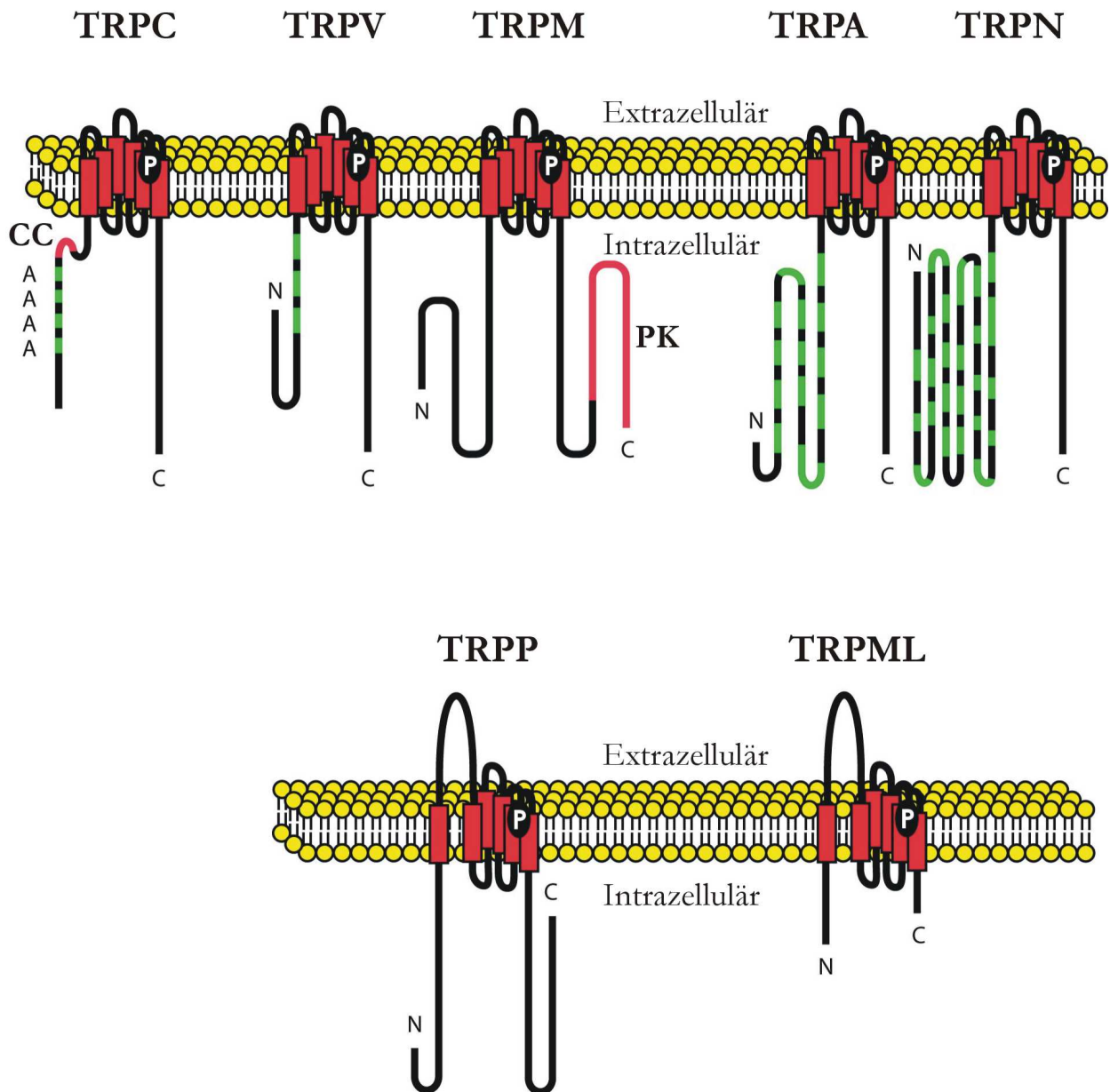


Abbildung 4-1 Die sieben TRP-Protein Familien.

Abbildung der vorausgesagten Transmembrantopologie in der Plasmamembran. Eingezeichnet sind Ankyrin-Repeats (A, grün), Coiled-Coil Domänen (CC, rot) und die Enzym- oder Protein Kinase Domäne (PK, rot). Modifiziert nach (Montell, 2005).

Tabelle 4-1 Die sieben TRP-Genfamilien mit Angabe ihrer (publizierten) Mitglieder

TRP-Familie	Fliege	Wurm	Seescheide	Fisch	Maus	Mensch
TRP C	3	3	8	8	7	6
TRP V	2	5	2	4	6	6
TRP M	1	4	2	6	8	8
TRP A	4	2	4	1	1	1
TRP N	1	1	1	-	-	-
TRP P	4	2	9	2	3	3
TRP ML	1	1	1	4	3	3
gesamt	16	17	27	25	28	27

4.1 DIE TRP-PROTEINE

4.1.1 DIE TRPC-FAMILIE

Die TRPC-Familie beinhaltet die ersten identifizierten TRP-Proteine, deshalb werden sie auch als klassische oder kanonische TRP-Proteine bezeichnet. Allen TRPC-Proteinen ist gemeinsam, dass sie drei bis vier Ankyrin-Repeats und die TRP-Domäne ‚EWKFAR‘ beinhalten und PLC-regulierte nichtselektive Kationenkanäle sind. Die Funktion der TRPC-Kanäle wurde zuerst in *Drosophila melanogaster* untersucht. Die dabei festgestellte Regulierung durch Phospholipase C und die Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen führten zur Vermutung, dass die TRP-Kanäle die langgesuchten speichergesteuerten Kalziumkanäle sein könnten (Hu et al., 1994). TRPC1 (Zhu et al., 1996; Zitt et al., 1996) und TRPC4 (Philipp et al., 1996) waren die ersten TRP-Proteine aus Säugern, für die nachgewiesen wurde, dass sie einen Ionenkanal bilden. Sie liegen in vivo möglicherweise in einigen Geweben als Heterotetramere mit TRPC5 vor (Strubing et al., 2001). Andere Untersuchungen zeigen, dass die TRPC4- und TRPC5-Proteine nicht in gleichen Geweben exprimiert werden (Philipp et al., 1998). Kürzlich wurde gezeigt, dass TRPC1 in Oozyten von *Xenopus laevis* einen Kanal bildet, der durch Dehnungsreize stimuliert wird (Maroto et al., 2005). Ob TRPC1 in Säugerzellen ebenso als dehnungsempfindlicher Kanal auftritt ist unklar. In den TRPC4- und TRPC5-Proteinen wurde jeweils eine so genannte PDZ-Domäne im C-Terminus identifiziert. PDZ Domänen sind 90 Aminosäuren lange Sequenzabschnitte, die zuerst in dem post synaptic density protein PSD 95 mit einem Aminosäuresequenzmotif GLGF identifiziert wurden. Der Name PDZ setzt sich aus dem Namen von drei Proteinen zusammen, die solche PDZ-Domänen beinhalten (PSD-95, *Drosophila discs-large* tumor suppressor protein und *Zo-1* oder Tight junction protein) (Cho et al., 1992). Neben TRPC1 sind als weitere Interaktionspartner von TRPC4 NHERF (Na^+/H^+ Exchanger Regulatory Factor) und PLC β 1 (Tang et al., 2000) bekannt. TRPC4 spielt eine Rolle bei der Agonist-vermittelten

Vasoregulation (Freichel et al., 2001) und bei der mikrovaskulären Permeabilität von Lungenendothel (Tiruppathi et al., 2002). TRPC5 wird in hippokampalen Wachstumshügeln exprimiert und scheint das Neuritenwachstum zu modulieren (Greka et al., 2003). Allerdings zeigen TRPC4-defiziente Maus-Tiermodelle keine neurologischen Symptome. TRPC2 wurde als wichtig für die Acrosomenreaktion erachtet, weil es den Kalziumeinstrom in Maus-Spermatozyten vermittelt (Jungnickel et al., 2001), TRPC2 defiziente Mäuse sind jedoch fertil. TRPC2 wird in Mäusen hauptsächlich in den neuronalen Microvilli des Vomeronasalen Organs exprimiert (Liman et al., 1999) und ist maßgeblich für die Wahrnehmung von Pheromonen verantwortlich (Leypold et al., 2002; Stowers et al., 2002). In Mensch ist TRPC2 ein Pseudogen und vermutlich funktionslos. TRPC3, TRPC6 und TRPC7 weisen ca. 75% Sequenzidentität auf und bilden nach heterologer Expression in HEK293 Zellen heteromultimere Kanäle (Trebak et al., 2003). Sie führen dabei zu einem konstitutiv vorhandenen Kationenstrom, der sowohl einwärts als auch auswärtsrektifizierend ist. Außerdem werden sie durch intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen gehemmt (Zitt et al., 1997). Alle drei TRPC-Proteine werden durch DAG reguliert (Trebak et al., 2003). Schon lange ist bekannt, dass nach Stimulierung der glatten Muskulatur durch Katecholamine, es zu einem Kationeneinstrom in die Zelle kommt. Dabei aktiviert z.B. Noradrenalin zunächst den α_1 -Adrenorezeptor, ein Guaninnukleotid-bildendes Protein der G_q -Familie wird aktiviert und Phospholipase C stimuliert. Die aktivierte Phospholipase C katalysiert die Umwandlung von Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (PIP_2) in IP_3 und DAG. Die verschiedenen TRPC-Proteine, insbesondere TRPC1, TRPC3, TRPC6 und TRPC7 könnten die Kanalproteine darstellen, die durch DAG am Ende dieser Kaskade aktiviert werden (Hofmann et al., 1999).

4.1.2 DIE TRPV-FAMILIE

Die TRPV-Familie besteht aus 6 Mitgliedern und ist in zwei Subfamilien unterteilt, welche TRPV1, TRPV2, TRPV3 und TRPV4 bzw. TRPV5 und TRPV6 umfassen. Alle TRPV-Proteine beinhalten mehrere Ankyrin-Repeats im aminoterminalen Bereich. Mit der Familie der TRPC-Proteine besitzen sie nur etwa 25 % Sequenzidentität im Bereich der Transmembrandomäne fünf bis sechs. Das namensgebende Mitglied dieser Familie, TRPV1, wird auch als Vanilloidrezeptor bezeichnet. Es wurde auf der Suche nach dem Rezeptor für den scharfen Inhaltsstoff des Cayennepfeffers (*Capsicum frutescens* L.), dem Vanilloid Capsaicin, identifiziert (Caterina et al., 1997). TRPV1 bildet einen Kationenkanal der durch eine auswärtsrektifizierende Strom/Spannungs-Kennlinie charakterisiert ist. Außer durch Capsaicin wird TRPV1 auch durch das im Körper vorkommende Anandamid aktiviert. Anandamid ist ein Arachidonsäurederivat und fungiert auch als körpereigener Ligand von Canabinoidrezeptoren. Die Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals erfolgt auch bei Temperaturen über $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Caterina et al., 1997; Chuang et al., 2001). Der TRPV2-Kanal, der nächste Verwandte von TRPV1, ist hinsichtlich seiner Sequenz zu 50 % identisch mit TRPV1, wird aber nicht durch Capsaicin

aktiviert, wohl aber durch Temperaturen über 52 °C (Caterina et al., 1999). Temperaturen über 52 °C werden bereits als schmerzhaft empfunden. TRPV3, das dritte Mitglied dieser Unterfamilie, wird durch Wärmereize über 31 °C aktiviert (Peier et al., 2002;Smith et al., 2002;Xu et al., 2002). Es wird in den selben Neuronen exprimiert wie TRPV1 und bildet möglicherweise zusammen mit TRPV1 heterooligomere TRPV1/TRPV3-Kanalkomplexe (Smith et al., 2002). TRPV3 wird auch in Keratinozyten exprimiert (Peier et al., 2002) sowie auf der Oberfläche der Zunge (Xu et al., 2002). TRPV4 schließlich wird durch Temperaturen über 25 °C aktiviert; diese Aktivierung kann unter hypotonen Bedingungen unter denen die Zelle anschwillt, verstärkt werden (Guler et al., 2002), (Liedtke et al., 2000;Strotmann et al., 2000;Wissenbach et al., 2000). Der TRPV4-Kanal kann weiterhin durch Arachidonsäure selbst aber auch durch Metabolite der Arachidonsäure aktiviert werden unter anderem durch Anandamid und verschiedene Eicosatetraensäurederivate (Watanabe et al., 2003). In primären afferenten Schmerzfasern wird TRPV4 ebenfalls durch hypotone Bedingungen aktiviert.

TRPV5 und TRPV6 bilden die zweite Unterfamilie der TRPV-Subfamilie. Beide Kanäle leiten mit hoher Selektivität Ca^{2+} -Ionen (den Dekker et al., 2003;Vennekens et al., 2000;Wissenbach et al., 2001;Yue et al., 2001). Für die hohe Kalziumselektivität ist der Aminosäurerest Aspartat an Position 542 von TRPV5 (Nilius et al., 2001) bzw. an Position 541 von TRPV6 verantwortlich (Voets et al., 2003). Beide Kanäle werden insbesondere in Niere (TRPV5), Darm (TRPV5, TRPV6) und Plazenten (TRPV6) exprimiert und sie könnten beide für die Resorption von Ca^{2+} in den Epithelien dieser Zellen verantwortlich sein (Hirnet et al., 2003;Hoenderop et al., 1999;Peng et al., 1999;Wissenbach et al., 2001). Es gibt Hinweise, dass die Expression der Gene beider Kanalproteine durch Vitamin D reguliert wird (Hoenderop et al., 2002a;Hoenderop et al., 2002b).

Die TRPV6 cDNS wurde ursprünglich als epithelialer Kalzium-Transporter oder Ca^{2+} -Transporter (CaT) aus Rattendünndarm kloniert (Peng et al., 1999). Kurz darauf folgte die Klonierung einer cDNS aus humaner Plazenta (Wissenbach et al., 2001). Ursprünglich wich die Sequenz von CaT von Ratte von derjenigen aus der menschlichen Plazenta erheblich ab. Deshalb wurde die Sequenz aus menschlicher Plazenta zunächst als CaT-Like oder CaT-L bezeichnet (Wissenbach et al., 2001). Mittlerweile wurde die Sequenz von Ratte erheblich korrigiert, so dass klar ist, dass es sich bei den Genprodukten von Ratte und von Mensch um orthologe Proteine handelt, die – entsprechend der vereinheitlichten Nomenklatur (Montell et al., 2002) – als TRPV6 bezeichnet werden. Die cDNS des TRPV6-Proteins von Maus wurde 2003 kloniert (Hirnet et al., 2003). Sie ist zu 90 % identisch mit den Proteinen von Ratte bzw. Mensch. Allerdings unterscheiden sich die Expressionsmuster der drei TRPV6-Gene. So wurden TRPV6-Transkripte von Mensch und Maus in Pankreas und Plazenta, nicht aber in Dünndarm und Dickdarm nachgewiesen. TRPV6-Transkripte von Ratte werden dagegen in Dün- und Dickdarm exprimiert (Hirnet et al., 2003;Wissenbach et al., 2001). Nach Expression in *Xenopus* Oozyten bilden TRPV5 und TRPV6 heterooligomere Kanalproteine (Hoenderop et al.,

2003b). Allerdings sind die Expressionsmuster beider Gene wenig überlappend – so wird TRPV6 praktisch nicht in Niere und Darm von Mensch exprimiert, sehr wohl aber TRPV5 – so dass abzuwarten bleibt, inwieweit solche heterooligomere TRPV5/TRPV6 Kanäle tatsächlich auch *in vivo*, d.h. Geweben und Zellen des Menschen oder der Maus vorkommen.

4.1.3 DIE TRPM-FAMILIE

Der Namensgeber dieser Subfamilie ist das TRPM1 oder Melastatin; es wurde bei der Suche nach Genen identifiziert, die mit der Entwicklung von Melanomen assoziiert sind. TRPM1-Transkripte werden in Melanozyten exprimiert und diese Expression nimmt bei Entwicklung eines Melanoms, insbesondere bei Metastasierung des Melanoms signifikant ab (Duncan et al., 1998). Bisher konnte TRPM1 noch nicht als Ionenkanal charakterisiert werden. TRPM2 dagegen (Nagamine et al., 1998) ist ein nichtselektiver Kationenkanal (Perraud et al., 2001), der durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration inaktiviert werden kann. Er besitzt im C-Terminus einen Sequenzabschnitt mit Ähnlichkeit zu einer NUDT9 Nudix Hydrolase Domäne, der enzymatisch aktiv ist (Perraud et al., 2003) und an den ADP-Ribose und NAD binden können (Perraud et al., 2001; Sano et al., 2001). Dieser Befund, dass Kanal- und Enzymaktivität in einem einzigen Molekül vorhanden sind, hat dazu geführt, dass man TRPM2 – ähnlich wie TRPM6 und TRPM7 (siehe unten) – auch als Kanalenzyme oder ‚Chanzymes‘ bezeichnet. Der Kanal wird wahrscheinlich direkt durch Wasserstoffperoxyd und über Signalkaskaden durch TNF- α aktiviert. Er könnte deshalb als Sensor für den Redoxstatus in Zellen fungieren (Hara et al., 2002). TRPM3 (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003) ist strukturell näher verwandt zu TRPM1 als zu TRPM2. Er hat zahlreiche Spleißvarianten (Lis et al., 2005; Oberwinkler et al., 2005) und fungiert als Kationenkanal. Interessanterweise konnten zwei Spleißvarianten identifiziert werden, die sich nur in einer kurzen Sequenz innerhalb der vorhergesagten Porenregion unterscheiden: Diese Unterschiede reichen jedoch aus, um die Selektivität des jeweiligen Ionenkanals für permeierende Kationen entscheidend zu verändern (Oberwinkler et al., 2005). TRPM4 und TRPM5 sind bisher die einzigen TRP Proteine, welche Kanäle bilden, welche nicht permeabel für Ca^{2+} sind. TRPM4-Transkripte werden in Maus hauptsächlich in Endothel von Aorten, von Darm, in Niere, Pankreas und Plazenta exprimiert (Nilius et al., 2003). In Mensch kommen mindestens zwei Spleißvarianten vor: Eine verkürzte und als TRPM4a bezeichnete Form und TRPM4b (Launay et al., 2002; Nilius et al., 2003). TRPM4b repräsentiert wahrscheinlich die vollständige Variante; der von TRPM4b gebildete Kanal wird durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert (Nilius et al., 2003), wobei Aktivierung- und Deaktivierung zeit- und spannungsabhängig verlaufen: Bei Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration – z.B. nach Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum – wird TRPM4 aktiviert, es kommt zum Einstrom von Na^+ -Ionen in die Zelle und die Zellmembran wird depolarisiert. Als Folge öffnen sich spannungsabhängige

Kanäle und ein Aktionspotential kann ausgelöst werden. Entsprechend eignet sich TRPM4 – ebenso wie TRPM5 – um ein chemisches Signal, nämlich Ca^{2+} , in ein elektrisches Signal, das Aktionspotential, umzuwandeln. TRPM5 verhält sich sehr ähnlich zu TRPM4b und konnte in Geschmacksrezeptoren identifiziert werden, wo er an der Wahrnehmung von süßen, bitteren und von Aminosäuren ausgelösten Geschmacksreizen (umami) beteiligt ist (Liu and Liman, 2003;Perez et al., 2003).

Die beiden TRPM-Kanäle TRPM6 und TRPM7 heben sich wie auch TRPM2 aus der TRP-Familie durch eine Enzymdomäne in ihrem C-Terminus hervor (Nadler et al., 2001;Runnels et al., 2001). Dabei handelt es sich bei dem Enzym um eine Kinase, die die terminale Phosphat-Gruppe von ATP auf ein Substratprotein übertragen kann (Ryazanov et al., 1997) und die in ihrer dreidimensionalen Struktur einer so genannten α -Kinase ähnlicher ist als konventionellen Kinasen (Yamaguchi et al., 2001).

TRPM6 wurde ursprünglich als dasjenige Gen identifiziert, das bei Patienten mit angeborenem Mangel an Magnesium im Blut, einer so genannten Hypomagnesiämie, mutiert ist (Schlingmann et al., 2002;Walder et al., 2002). Man geht deshalb davon aus, dass TRPM6 eine wichtige Rolle bei der Resorption von Magnesiumionen in Niere und Darm spielt. TRPM6 bildet Ionenkanäle, wobei die Ströme durch Kalzium- und Magnesiumionen getragen werden. Diese Ströme werden – ebenso wie TRPM7-Ströme – durch Magnesiumionen gehemmt (Nadler et al., 2001). Unter physiologischen Bedingungen leitet TRPM7 nur einen kleinen Einwärtsstrom der von Kalzium- und Magnesiumionen getragen wird. Die Funktion der Kinasedomäne ist umstritten. Zuerst wurde angenommen, dass ATP möglicherweise als Substrat der Kinase den TRPM7-Kanal aktiviert (Runnels et al., 2001), später wurde diese Aktivierung jedoch darauf zurückgeführt, dass ATP einen Teil der intrazellulären Magnesiumionen bindet, dadurch die Konzentration freier Magnesiumionen gesenkt und so TRPM7 aktiviert wird (Nadler et al., 2001). Außer durch Magnesiumionen scheint TRPM7 auch durch Hydrolyse von Phosphoinositol-4,5-diphosphat inhibiert zu werden (Runnels et al., 2002). Die Funktion der Kinasedomäne ist noch nicht geklärt. Deletion dieser Proteinkinasedomäne oder deren Modifikation durch einzelne Punktmutationen beeinflussten die Kanalaktivierung wenig; möglicherweise wird die Hemmung des Kanals durch Magnesiumionen (Schmitz et al., 2003) bzw. seine Modulation durch cAMP beeinflusst. So aktiviert cAMP TRPM7 vermittelte Ströme und durch Mutation der Kinase wird dieser Effekt aufgehoben (Takezawa et al., 2004). Eine Besonderheit von TRPM6 und TRPM7 ist die Magnesiumleitfähigkeit und der TRPM7 vermittelte Magnesiumionen-Einstrom scheint für das Überleben von Zellen notwendig zu sein. In Zellkulturmodellen in denen die TRPM7 Expression gezielt gemindert wurde, sterben die Zellen ab bzw. sind nur in Gegenwart von sehr hohen Magnesiumionenkonzentrationen lebensfähig (Schmitz et al., 2003). TRPM8 wurde ursprünglich bei der Suche nach solchen Genen in der Prostata entdeckt, die bei bösartiger Entartung dieses Gewebes vermehrt exprimiert sind (Tsavaler et al., 2001). Parallel dazu wurde TRPM8 als ein

Kanal identifiziert, der durch Temperaturabsenkung unter 28 °C sowie durch Menthol aktiviert wird (McKemy et al., 2002). Menthol kommt z.B. in der Pfefferminze vor und der kühlende Effekt Menthol-haltiger Stoffe kommt durch Aktivierung des TRPM8-Kationenkanals zustande. Dieser TRPM8-Kationenkanal wird außer durch Menthol auch durch Icillin aktiviert, einer Substanz, die wie Menthol Kälteempfindungen auslöst. Mittlerweile weiß man, dass TRPM8 – oder ‚Kälterezeptorkanal‘, wie TRPM8 auch genannt wird – nicht nur im Prostatagewebe sondern auch in sensorischen Neuronen der Spinalganglien und in den Sensorischen Neuronen des Nervus trigeminus lokalisiert ist. Während in diesen sensorischen Neuronen TRPM8 durchaus auch für die Registrierung schmerzhafter Kältereize verantwortlich ist, sind seine Funktionen in der Prostata völlig unbekannt.

4.1.4 DIE TRPA-FAMILIE

In Säugern gibt es nur ein Mitglied dieser Familie, TRPA1. Dieses Protein zeichnet sich durch das Vorkommen von zahlreichen sich wiederholenden Ankyrin-Domänen im aminoterminalen TRPA-Abschnitt aus. Das Gen von TRPA1 wurde ursprünglich bei der Suche nach Genen identifiziert, deren Expression in proliferierenden Fibroblasten vermindert ist (Jaquemar et al., 1999). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass TRPA1 einen Kationenkanal bildet, der möglicherweise wie TRPM8 durch Kälte und Icillin, darüber hinaus aber auch durch Senföl und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) aktiviert wird (Jordt et al., 2004). Die Ankyrin-Domänen in diesem Protein könnten darüber hinaus als Sensor für mechanische Reize dienen und es gibt einige Hinweise, dass TRPA1 der langgesuchte Mechanosensor im Innenohr ist, der an der Registrierung des Schalls beteiligt ist (Viswanath et al., 2003).

4.1.5 DIE TRPP-FAMILIE

Das erste Mitglied der TRPP-Familie, TRPP2, wurde als eines derjenigen Genprodukte identifiziert, die bei der autosomalen polyzystischen Nierenkrankheit ADPKD mutiert und Ursache dieser Erkrankung ist (Mochizuki et al., 1996). ADPKD führt zum Auftreten von benignen, flüssigkeitsgefüllten Zysten gefolgt von Nierenversagen. Das TRPP2-Protein ist wahrscheinlich eng mit dem TRPP1-Protein assoziiert und Mutationen in einem der beiden Gene sind für mehr als 95 % der ADPKD Fälle verantwortlich (Watnick and Germino, 1999). Das TRPP1-Protein ist strukturell nicht mit dem TRPP2-Protein verwandt und zählt deshalb nicht zur TRPP-Familie. Allerdings existieren in Geweben von Säugern zwei weitere TRPP Proteine, TRPP3 und TRPP5. TRPP2, TRPP3 und TRPP5 sind in beweglichen Zilien von Epithelzellen lokalisiert. Diese Lokalisation legt den Schluss nahe, dass sie an der Registrierung von Veränderungen in ihrer Umgebung, beispielsweise von Flüssigkeitsströmungen, Absinken der Osmolarität oder Zunahme von mechanischem Stress, beteiligt sein könnten.

4.1.6 DIE TRPML- FAMILIE

Das namensgebende Mitglied dieser Familie ist das Protein TRPML1, das auch als Mucolipin 1 bezeichnet wird (Bargal et al., 2000; Bassi et al., 2000; Sun et al., 2000). Mutationen im TRPML1-Gen sind verantwortlich für die neurodegenerative Erkrankung Mucopolidose Typ 1, einer lysosomalen Speicherstörung, die mit Katarakt, extrapyramidalmotorischen Störungen und geistiger Retardierung einhergeht. Eine Hypothese über die möglichen Funktionen von TRPML1 besagt, dass es in Endosomen und Lysosomen exprimiert und dort für das Recycling von Lysosomen verantwortlich ist (Piper and Luzio, 2004). In Geweben von Säugern kommen noch zwei weitere Vertreter dieser Gen-Familie vor, TRPML2 und TRPML3. TRPML-Proteine unterscheiden sich von den übrigen TRP-Proteinen vor allem durch ihre Größe; sie umfassen 538 bis 580 Aminosäuren und bisher gibt es keinen Anhalt, dass sie als Ionenkanäle fungieren.

Das wesentliche Methodenspektrum, das ich in meiner Arbeit nun angewendet habe, um die Funktion einzelner TRP-Proteine untersuchen zu können, umfasst neben molekularbiologischen, molekulargenetischen und molekularpharmakologischen Vorgehensweisen die Durchführung des Gene-Targetings und im Folgenden möchte ich diese neuen experimentellen Techniken kurz zusammenfassen.

4.2 TARGETING VON GENEN IN EMBRYONALEN STAMMZELLEN

Ziele der Untersuchungen von Genfunktionen ist es, das Entstehen von Krankheiten bis ins Detail aufzuklären, um so bessere Behandlungen entwickeln zu können. Eine weitere Motivation ist es, herauszufinden, inwieweit ein bestimmtes Genprodukt zum physiologischen Ablauf in einzelnen Zellen, Organen und im Gesamtorganismus beiträgt. Um die Funktion von Genen bzw. deren Genprodukten aufzuklären gibt es mehrere Möglichkeiten: Zum einen kann ein Gen in eine Zelle eingeschleust werden und anschließend können veränderte Funktionen dieser Zellen gemessen werden. Eine andere wichtige Methode besteht darin, den Phänotyp von Patienten zu untersuchen, die an Erbkrankheiten leiden bzw. an Krankheiten, die durch Spontanmutationen entstanden sind. Zwangsläufig sind solche Untersuchungen limitiert, haben aber – beispielsweise bei verschiedenen Formen des Long-QT-Syndroms oder bei Lipidspeicherkrankheiten – zum Verständnis der jeweiligen Erkrankung, zur Funktion des jeweils betroffenen Gens sowie zu neuen Therapieoptionen geführt. Ähnliches gilt für Erkrankungen von Tieren aufgrund von Mutationen, beispielsweise die

Untersuchungen des Gendefekts von Quarter-Horse Pferden oder verschiedenen Muskeldystrophie-Formen der Maus.

Eine rein experimentelle Methode ergibt sich aus dem Erstellen von Tiermodellen in denen jeweils ein Gen gezielt ausgeschaltet wird. Durch Charakterisierung der Defizite dieses Tiers im Vergleich zu einem genetisch unveränderten Tier kann auf die Funktion des Gens geschlossen werden. Als Modelle kommen im Prinzip alle Tiere in Frage. Technisch ist es jedoch an Säugern in erster Linie an Mäusen etabliert. Mäuse bieten darüber hinaus den Vorteil einer hohen Reproduktionsrate, einer kurzen Generationszeit und einer überschaubaren Lebenserwartung von etwa zwei Jahren. So ist es möglich, Effekte von veränderten Genen über mehrere Generationen gut zu beobachten. Grundsätzlich können zwei Formen von Tiermodellen erzeugt werden: Transgene Tiere und Tiere bei denen das Gen durch homologe Rekombination verändert wurde. Bei transgenen Tieren wird ein zusätzliches Gen in das Genom eingebracht; die Stelle im Genom, in die das Transgen inseriert, ist zufällig. Die Interpretation von Untersuchungen an solchen Tieren ist problematisch, da immer auch das Wildtyp-Allel nach wie vor vorhanden ist und exprimiert wird. Transgene Tiere können durch Mikroinjektion in die Zygote (Hammer et al., 1985) oder durch Infektion mit Retroviren hergestellt werden. Ein weiterer Nachteil dieser Methoden ist, dass nicht abzuschätzen ist, welche Auswirkung das Transgen auf den Genlocus hat, in den es inseriert.

Beim gezielten Mutieren von Genen durch homologe Rekombination, dem so genannten ‚Gene-Targeting‘, wird ein definierter DNS-Abschnitt eines Chromosoms durch einen anderen, der eine zielgerichtete Mutation trägt, ausgetauscht. Der Ablauf eines Gene-Targeting Experimentes ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Die Mutation muss nicht zwangsläufig zu einem Funktionsverlust (‚Knock-out‘ des Gens bzw. ‚loss of function‘-Phänotyp) führen, sondern es kann mit dieser Methode ein normales Gen gegen ein überaktives Gen ausgetauscht werden, das zu einer Funktionszunahme führt – ein so genannter ‚gain of function‘ – oder das normale Gen kann ausgetauscht werden gegen ein Gen, welches im Vergleich zum Wildtyp-Gen eine verminderte oder eingeschränkte Funktion hat. Weiterhin ist es möglich durch geeignete Targeting-DNS-Konstrukte eine im Vergleich zur Normalsituation stärkere oder schwächere Funktion des Gens zu erzielen.

Gene-Targeting in embryonalen Stammzellen, d.h. die gezielte Veränderung eines Gens in Zellen, aus denen später ein ganzes Tier entstehen kann, geht aus zwei methodischen Entwicklungen hervor: Erstens der Entdeckung, dass die in eine Zelle eingeschleuste DNS in der Lage ist, durch homologe Rekombination in das Genom zu integrieren. Zweitens der Isolation von pluripotenten embryonalen Zellen aus sehr frühen Mausembryonen, aus denen sich - unter geeigneten Kulturbedingungen gehalten - eine Maus entwickeln kann.

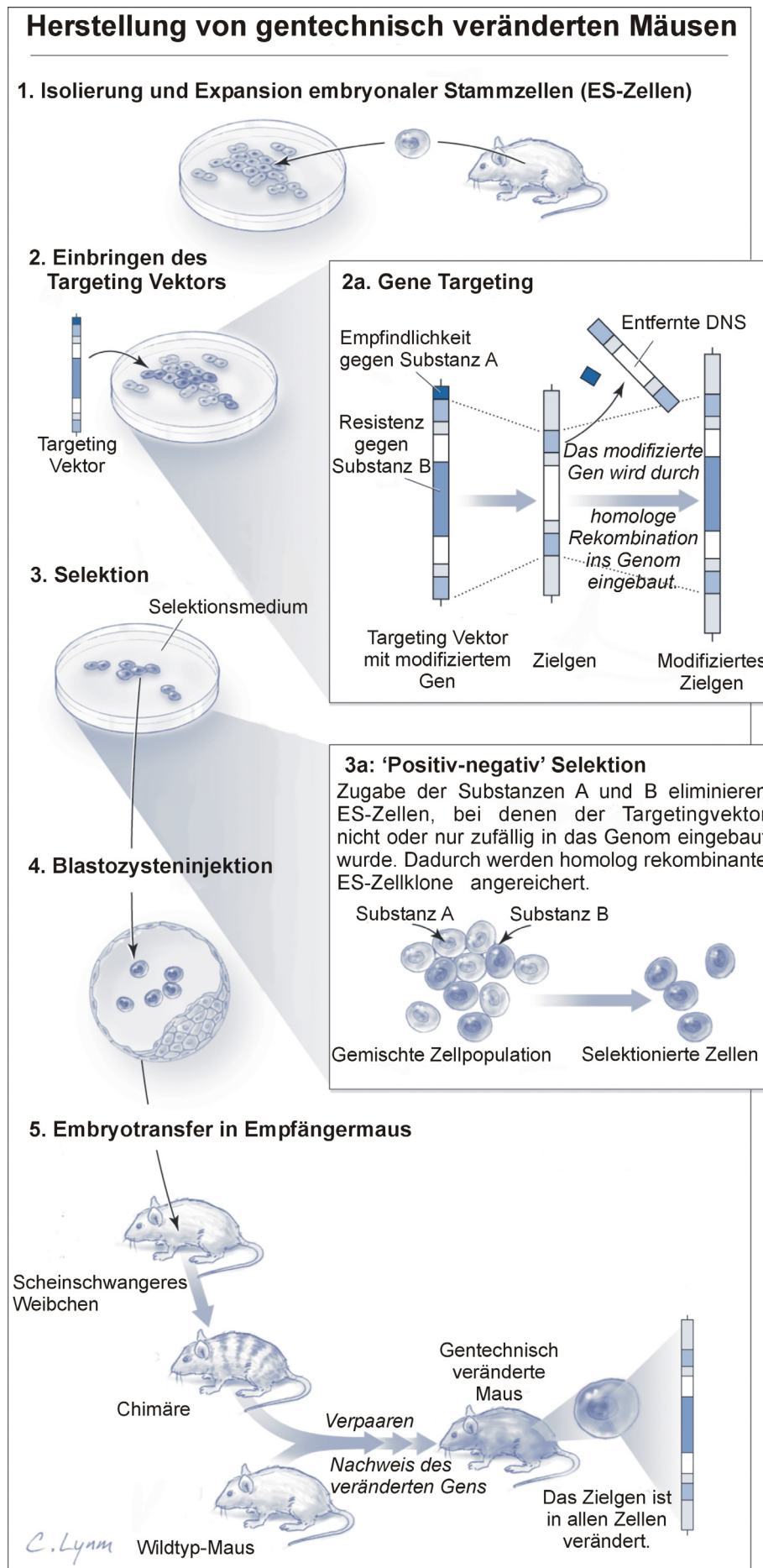


Abbildung 4-2
Vorgehensweise beim Gene-Targeting

Der zu modifizierende DNS Abschnitt des Zielgens wird in einen Vektor kloniert, den sogenannten Targeting-Vektor und die gewünschte Modifikation wird eingefügt.

Im nächsten Schritt wird das Targetingkonstrukt in embryonale Stammzellen, in der Regel mittels Elektroporation, eingeschleust; bei weniger als einer von 1000 Zellen kommt es zur homologen Rekombination.

Diese homolog rekombinanten ES-Zellen werden durch Selektion angereichert und ihre genomische DNS mittels Southern Blot oder PCR auf das korrekte Rekombinationsereignis hin kontrolliert.

ES-Zellen, in denen korrekte Rekombination erfolgt ist, werden in Blastozyten von Maus injiziert, diese werden in Ammenmütter implantiert, die dann hinsichtlich des veränderten Genlocus chimäre Nachkommen zur Welt bringen.

Durch Verpaaren der chimären Tiere können anschließend Nachkommen erhalten werden, die heterozygot für die eingefügte Mutation sind.

Verwendet und modifiziert mit Erlaubnis des Autors.

Homologe Rekombination:

Die erste erfolgreiche Insertion eines Gens in Säugerzellen wurde bereits 1977 beschrieben (Wigler et al., 1977). Ausgehend von dieser Arbeit entdeckten Capecchi und Mitarbeiter 1982, dass Säugerzellen dazu in der Lage sind, homologe Rekombination zwischen künstlich eingebrachten DNS-Fragmenten durchzuführen (Folger et al., 1982); Das Einbringen mehrerer Kopien eines HSV-tk Plasmids in eine Säugerzelle resultiert nicht in dem Einbau einzelner Kopien sondern im Einbau von gleichgerichteten Konkaternen. Diese Ergebnisse

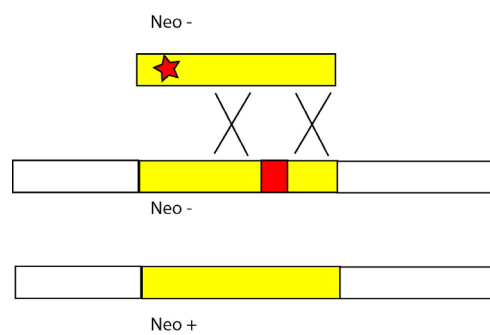


Abbildung 4-3 Das erste Gene-Targeting Experiment in Säugerzellen.

Beschreibung siehe Text.

Abbildung modifiziert nach (Capecchi, 2005).

ermutigten Capecchi Gene-Targeting Experimente in Säugerzellen in Angriff zu nehmen. Dazu wurde zuerst eine Zelllinie mit einem zufällig inserierten, mutierten Neomycin-Resistenzgen (neo^5) hergestellt. Dann wurde in diese Zellen ein Targetingkonstrukt bestehend aus einem Neomycin-Resistenzgen mit einer anderen Mutation injiziert (Abbildung 4-3). Homolog rekombinante Zellen sollten die beiden fehlerhaften neo-Gene zu einem funktionstüchtigen komplementieren und damit resistent gegen G418 sein (Thomas et al., 1986). Die homologe Rekombination erfolgte mit einer Häufigkeit von 1 bei 1000 injizierten Zellen. Weitere Erkenntnisse aus diesem Experiment waren, dass lineare DNS Moleküle gegenüber zirkulären bevorzugt werden und dass die homologe Rekombinationseffizienz am höchsten in der in der frühen S-Phase ist (Wong and Capecchi, 1986). Eine andere Feststellung war, dass die Anzahl der eingebrachten DNA-Moleküle pro Zelle nicht die Rekombinationseffizienz beeinflusst, dass der limitierende Schritt also lediglich die homologe Rekombinationsmaschinerie ist (Thomas et al., 1986). Außerdem stellten diese Autoren fest, dass nichtreziproke Rekombination gegenüber reziproker bevorzugt wird (Folger et al., 1985). Als nichtreziproke oder ungleiche Rekombination bezeichnet den ungleichen Austausch von genetischem Material zwischen homologen Chromosomen bzw. Sequenzen. Dies führt beim Crossing over dazu das ein Chromosom seine genetische Information verdoppelt während das andere es verliert. Ein ähnlicher Versuch wurde von einer anderen Gruppe publiziert (Lin et al., 1985): Hier wurde ein trunkiertes Thymidinkinase-Gen durch einen den fehlenden Teil des Thymidinkinase-Gens enthaltenden Targetingvektor komplettiert. Im Jahre 1985 konnten dann Smithies und Mitarbeiter den endogenen β -Hämoglobin-Genlocus durch homologe Rekombination gezielt mutieren (Smithies et al., 1985). Nachdem die homologe Rekombination in Säugerzellen möglich geworden war, war der nächste Schritt die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen.

Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen sind Zellen, die aus der inneren Zellmasse von Mausembryonen im Blastozystenstadium, d.h. am Tag 3,5 nach Koitus, isoliert werden. Sie können *in vitro* expandiert werden ohne dabei die Funktionalität des pluripotenten frühen Embryongewebes zu verlieren. Insbesondere können sie, wenn sie in einen Embryo wiedereingefügt werden, zu allen Zellen und Geweben des Embryos beitragen. Bedingt durch ihre Herkunft vom Epiblast können sie allerdings nicht zu extraembryonalem Endoderm und nicht zum Trophoblast beitragen (Beddington and Robertson, 1989). Sie sind also pluripotent, nicht totipotent. Embryonale Stammzellen wurden zu ersten Mal 1981 von Evans und Mitarbeitern und von Martin und Mitarbeitern beschrieben (Evans and Kaufman, 1981), (Martin, 1981). Ihnen gelang es, Isolations- und Kulturprotokolle zu entwickeln, unter denen die ES-Zellen ihre Pluripotenz beibehalten, d.h. sich zu allen Geweben entwickeln können. Die Mehrzahl der etablierten ES Zellen haben den Chromosomensatz 40 XY. In XX ES Zellen sind wie im Epiblast beide X Chromosome aktiv, was zu Instabilitäten oder anderen Nachteilen für die ES-Zell-Vermehrung zu führen scheint (Rastan and Robertson, 1985). Die Erhaltung des undifferenzierten Phänotyps ist nicht zellautonom; es genügt also nicht, die Zellen mit allen notwendigen Nährstoffen zu versorgen. Die Kokultur mit so genannten Feederzellen wurde als essentiell erachtet. Feederzellen sind aus Mausembryonen gewonnene Fibroblasten, die ursprünglich dazu verwendet wurden, um die Pluripotenz von embryonalen Karzinomzellen, so genannten EC-Zellen, zu erhalten. Später wurde entdeckt dass embryonale Fibroblasten ein Zytokin, den Leukemia inhibitory factor oder LIF freisetzen, auf dem die Erhaltung des undifferenzierten Zustandes beruht (Smith et al., 1988), (Williams et al., 1988). Durch Zugabe von LIF in das Medium können embryonale Stammzellen auch in der Abwesenheit von Feederzellen im undifferenzierten Zustand kultiviert werden. Allerdings verändern die ES-Zellen dabei anfänglich ihre Morphologie; man spricht von einer so genannten ‚Krise‘: die Zellen bekommen ein differenziertes Aussehen (Nagy, 2003). Diese morphologischen Veränderungen sind in der Regel reversibel. Trotzdem hat es sich durchgesetzt, dass ES-Zellen in der Regel auf Feederzellen unter Zugabe von LIF kultiviert werden. Im Jahr 1984 konnten Bradley und Mitarbeiter zeigen, dass embryonale Stammzellen zu allen Geweben in chimären Tieren beitragen können, die durch Injektion von embryonalen Stammzellen in Blastozysten erzeugt werden (Bradley et al., 1984). Chimäre Tiere sind Mosaiktiere, d.h. Tiere die aus Zellen verschiedenen Ursprungs zusammengesetzt sind. In dem oben beschriebenen Fall besteht die durch Injektion der ES-Zellen in eine Blastozyste entstandene Maus zum einen aus Zellen und Geweben, die aus den injizierten ES-Zellen hervorgegangen sind. Zum anderen besteht sie aus Zellen und Geweben, die sich aus der für die Injektion verwendete Blastozyste entwickelt haben. Wenn die verwendeten embryonalen Stammzellen und die Blastozyste aus Tieren mit verschiedenen Fellfarben stammen, kann man an der Fellfarbe der chimären Maus den Grad des Chimarismus abschätzen. Man geht also

davon aus, dass in den inneren Geweben das Verteilungsmuster von aus ES-Zellen bzw. aus Blastozysten hervorgegangenen Zellen ähnlich ist wie in der Haut. Ein hoher Grad an Chimärismus ist definiert als ein großer Prozentsatz an aus ES-Zellen hervorgegangenen Geweben. Damit das chimäre Tier die Mutation an seine Nachkommen vererben kann, müssen auch Zellen der Keimbahn aus den injizierten ES-Zellen entstanden sein. Bei einem hohen Grad an Chimärismus ist dies wahrscheinlicher als bei einem niedrigen, es stellt aber keine Garantie dar.

Gene-Targeting in embryonalen Stammzellen

1986 zeigten Gossler und Mitarbeiter, dass embryonale Stammzellen, die mit einem Neomycin-Resistenzgen mit Hilfe der Kalziumphosphatmethode transfiziert wurden, nach Blastozysteninjektion zu Zellen aller Gewebe, inklusive der Keimbahn, in den chimären Tieren beitrugen (Gossler et al., 1986). Das Gleiche gelang mit retroviraler Transfektion (Robertson et al., 1986). Die erste homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen wurde im *Hprt1* Genlocus beschrieben, der für das am Purinstoffwechsels beteiligte Enzym Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase kodiert (Thomas and Capecchi, 1987). Schließlich gelang 1989 die Generierung von genetisch veränderten Mäusen durch homologe Rekombination (Koller et al., 1989). Ein wesentliches Hindernis bei Gene-Targeting-Experimenten war die Effizienz der homologen Rekombination. Von 10^6 ES-Zellen, die einem Transfektionsprotokoll unterworfen wurden, nehmen nur 1000 das Targetingkonstrukt auf (Lin et al., 1985); von diesen 1000 ES-Zellen ist dann eine Zelle homolog rekombinant, d.h. hier ist das eingeschleuste exakt gegen den entsprechenden Abschnitt des Wildtyp-Allels ausgetauscht worden. Bei den restlichen 999 Zellen erfolgte eine zufällige Integration in das Genom (Thomas et al., 1986). Um die eine Zelle unter all den anderen zu identifizieren war es notwendig, Selektionsstrategien zu entwickeln. So konnten die ersten Gene-Targeting Experimente an embryonalen Stammzellen auch nur an Genen durchgeführt werden, für die eine solche Selektionsmöglichkeit bestand (Koller et al., 1989). In der weitem Entwicklung wurde eine so genannte Positivselektionskassette etabliert, mit der man Klone mit integriertem Targetingkonstrukt von nicht-transfizierten Zellen unterscheiden konnte (Abbildung 4-4). Da das Neomycin-Resistenzgen *neo* sich bereits als geeignet für die Selektion erwiesen hatte (Thomas et al., 1986), wurde dieses Resistenzgen mit einem

Transkriptionsverstärker, einem so genannten Enhancer, dem mutant polyoma-virus enhancer

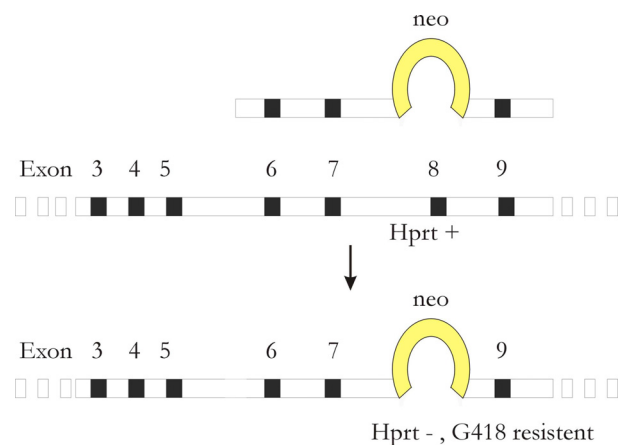


Abbildung 4-4 Positivselektion.

Positivselektion am Beispiel des Gene-Targeting des *hprt* Gens. Abbildung modifiziert nach (Capecchi, 2005).

versehen, der in embryonalen Karzinomzellen der Maus zu starken Expressionsraten führt (Thomas and Capecchi, 1987). Diese optimierte Positivselektionskassette wurde dann verwendet, um damit das *hprt1* Gen gezielt zu inaktivieren indem ein Exon dieses Gens durch die oben genannte Positivselektionskassette ersetzt wurde (Thomas and Capecchi, 1987).

Die Inaktivierung von Genen durch Ersetzen eines für die Genfunktion essentiellen Teils durch die Neomycinresistenzkassette blieb einige Zeit die gängige Gene-Targeting-Strategie, die auch als so genannter Gen-Knock-out bezeichnet wird. 1988 folgte eine verbesserte Methode, bei der zusätzlich zu der Positivselektion noch ein Negativselektions-Gen in das Targetingkonstrukt eingebaut wurde (Mansour et al., 1988). Das Negativselektions-Gen, in diesem Fall das HSV-tk Gen, kodiert für die Thymidinkinase. Es wird an das 3'-Ende der so genannten 3'-Homologie eingefügt. Im Fall einer homologen Rekombination wird die Negativselektionskassette nicht inseriert, d.h. nur die zum Wildtyp-Allel homologen Abschnitte des Targeting Vektors unterliegen der homologen Rekombination. Dagegen wird bei zufälliger Insertion in das Genom das

Negativselektions-Gen oft mit eingefügt, die resultierenden ES-Zellklone exprimieren die Thymidinkinase und sterben in Gegenwart des Nucleosidanalogs Gancyclovir ab (Abbildung 4-5). Der Faktor der Anreicherung über die Positiv- und Negativselektion variiert; eine realistische Annahme ist eine zehnfache Anreicherung von homolog rekombinanten ES-Zellen.

Konditioniertes Gene-Targeting

Nachdem es möglich geworden war, Gene gezielt zu inaktivieren, war das nächste Ziel diese Inaktivierung zeitlich zu steuern und gezielt in einzelnen Zellen und Geweben einzuschalten. Diese Vorgehensweise bezeichnet man als konditioniertes Gene-Targeting. Der Nachteil bei der totalen Inaktivierung ist oft, dass ein Gen verschiedene Aufgaben während der Embryogenese und im erwachsenen Tier hat. Der Knock-out von Genen die für die Embryonalentwicklung wichtig sind führt häufig zu einem embryonal-letalen Phänotyp, was die Erforschung der Aufgaben dieses Gens im erwachsenen Tier unmöglich macht. Ein weiterer Nachteil ist, dass bei Ausschaltung eines Gens schon

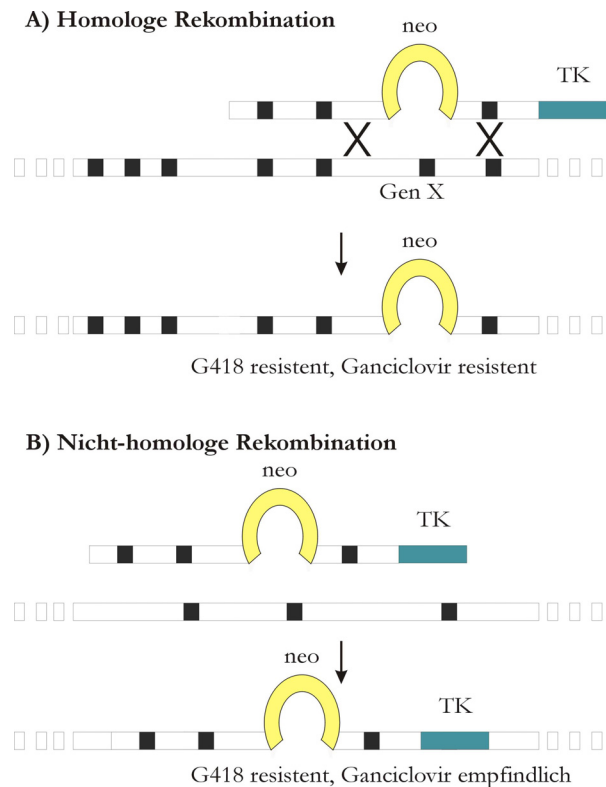


Abbildung 4-5 Positiv-Negativ Selektion.

Positiv-Negativ Selektion mit dem Neomycinresistenzgen (*neo*) und der Thymidinkinase (TK). Abbildung modifiziert nach (Capecchi, 2005).

im frühen Embryonalstadium andere Gene kompensatorisch dessen Funktion übernehmen können (Lewandoski, 2001). Durch Ausschaltung der Expression des Gens gezielt in einem einzelnen Organ oder Zelltyp, möglichst noch in einem bestimmten Zeitfenster, kann deshalb das Verständnis um eine Genfunktion verbessert werden.

Damit begann die Suche nach so genannten genetischen Schaltern. Der ideale Schalter würde in der Aus-Position überhaupt keine Genexpression zulassen, in der An-Position dagegen die gleiche Genexpression wie im nicht-veränderten Tier bewirken. Die ersten Versuche beinhalteten Transgene die mit einem Promotor gekoppelt waren, der durch Schwermetalle, Hitzeschock oder Steroide angeschaltet werden konnte (Lewandoski, 2001). Sie waren schlecht regulierbar und erlaubten in der Regel auch in der Aus-Position eine gewisse Genexpression. Man bezeichnet diese noch nicht idealen Schalter als ‚durchlässig‘ oder englisch ‚leaky‘.

Mittlerweile haben sich zwei Systeme für die konditionierte Regulierung der Genexpression etabliert: Im ersten System werden in das Gen Erkennungssequenzen für eine sequenzspezifische Rekombinase eingebaut, die später die Zielsequenzen herausschneidet, die so genannten Cre/loxP und FLP/frt-Systeme. In weiteren Systemen kann die Transkription durch einen Effektor reguliert werden, die so genannten Tet-ON- und Tet-OFF-Systeme. Beide Systeme haben ihre Vor- und Nachteile und sind seit ihren ersten Publikationen erheblich verbessert worden.

Das Cre/loxP- und FLP/frt-System

Hierzu werden zwei Mitglieder der Integrase-Familie verwendet. Integrasen sind sequenzspezifische Rekombinasen: Es handelt sich um die Cre-Rekombinase, welche ‚causes recombination in P1‘ aus dem Bakteriophagen P1 (Sauer and Henderson, 1989) sowie die FLP-Rekombinase, die DNS-Sequenzen ‚flipp‘, aus *Saccharomyces cerevisiae* (O’Gorman et al., 1991). Die Cre- und Flp-Rekombinase katalysieren eine konservative DNS-Rekombination zwischen zwei 34 bp langen Erkennungssequenzen, locus of recombination in P1 oder loxP-Sequenzen im Fall der Cre-Rekombinase und die Flp recognition target oder frt-Sequenzen im Falle der Flp-Rekombinase. (Abbildung 4-6). Als konservative Rekombination bezeichnet man eine Rekombination bei der die Summe der Basenpaare aus den Edukten und den Produkten gleich bleibt. Da die Rekombinasen keine akzessorischen Proteine oder andere Kofaktoren benötigen, können sie auch in fremden Umgebungen, z.B. in Mauszellen, eingesetzt werden. Die FLP-Rekombinase musste allerdings zuerst modifiziert werden um auch bei 37 °C optimal zu arbeiten (Buchholz et al., 1998). Die Verwendung der Rekombinasen ist nicht auf die Deletion von Exons oder Selektionskassetten beschränkt, vielmehr können ganze Chromosomenteile deletiert werden. Dabei ist die Rekombinationsreaktion in der Regel unabhängig vom Genlocus. In den Targeting Vektoren werden die Erkennungssequenzen meist in die Introns kloniert die das zu entfernende Exon flankieren; in den meisten Fällen ändert sich allein durch das Einfügen der Erkennungssequenzen die Genexpression nicht. Sie können aber auch in das 5’-

Ende des Gens (Dragatsis et al., 2000; Sakai et al., 2001) oder das 3' Ende des Gens (Brakebusch et al., 2000; Guy et al., 2001) kloniert werden ohne dass die Expression des Gens dadurch beeinträchtigt wäre. Mäuse, welche ein mit loxP- bzw. frt-flankiertes Allel tragen, müssen im anschließenden Schritt mit einer Mauslinie verpaart werden, welche die entsprechende Rekombinase transgen exprimiert.

Das Cre/loxP System war das erste verfügbare Rekombinase-System und mittlerweile gibt es eine große Anzahl von Mauslinien, die das Cre-Transgen gewebe-spezifisch oder auch zeitlich steuerbar exprimieren. Eine Zusammenstellung findet sich unter <http://www.mshri.on.ca/nagy/>. Über Verpaarung mit der geeigneten Cre-Mauslinie ist es auf diese Weise möglich aus einer einmal über homologe Rekombination hergestellten Mauslinie verschiedene gewebespezifische Geninaktivierungen vornehmen zu können. Mauslinien, die gewebespezifisch Cre-Rekombinase exprimieren ermöglichen embryonal-letale Phänotypen zu umgehen; sie erlauben es, auf eine bestimmte Funktion eines Gens zu fokussieren ohne Gefahr zu laufen, kompensatorische Epiphänomene zu studieren.

Seit der ersten Publikation eines gewebsspezifischen Knock-Outs in T-Zellen (Gu et al., 1994) ist die Zahl der verfügbaren Mauslinien stetig angestiegen die Cre Gewebe-spezifisch exprimieren. Eine weitere wichtige Erweiterung der Rekombinase-Systeme lieferte die Entwicklung der zeitlich

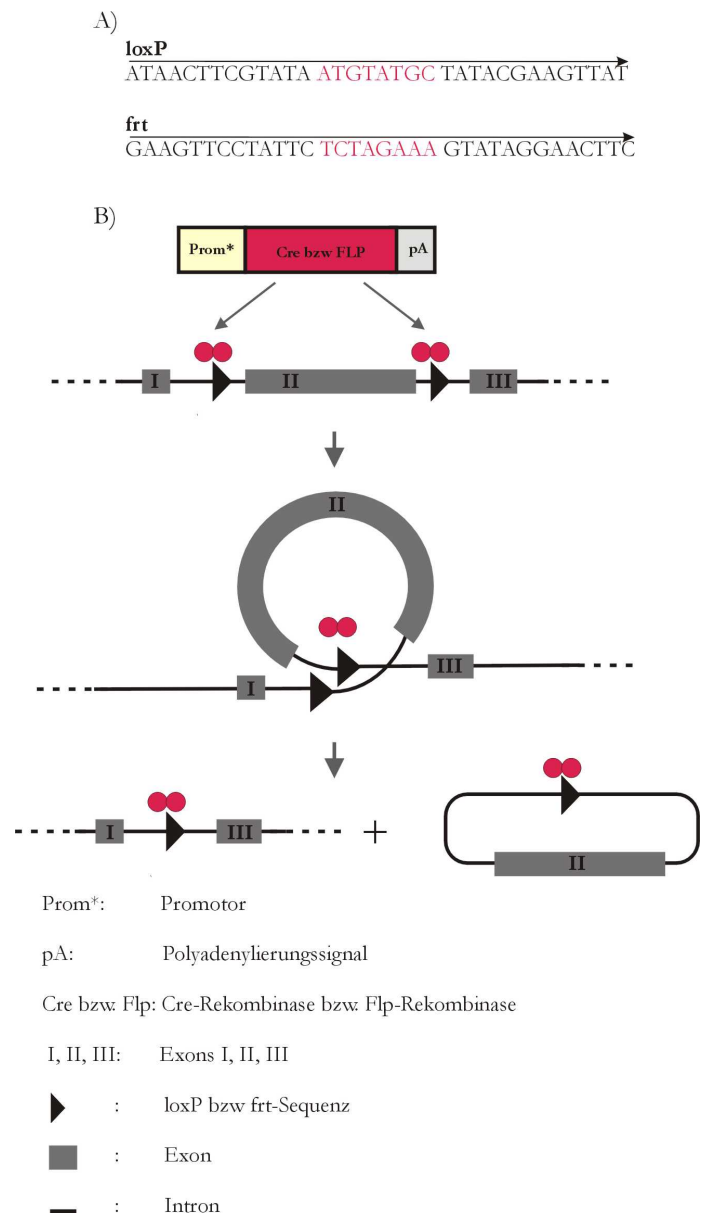


Abbildung 4-6 Funktionsweise der DNA-Rekombinasen.

A): Die 34-bp umfassenden loxP- und frt- Sequenzen bestehen jeweils aus zwei 13 bp langen inversen Sequenzen (schwarz) die eine 8 bp lange Kernsequenz (rot) flankieren. B): Dimere der Cre- bzw. FLP-Rekombinase (rote Kugeln) katalysieren bei gleichsinniger Ausrichtung der entsprechenden Erkennungssequenzen (schwarze Dreiecke) die konservative Rekombination. Dabei wird nach einem Übergangszustand das Exon II herausgeschnitten. Ist das Exon II essentiell für die Genfunktion kommt es auf diese Weise zur Inaktivierung des Gens. Modifizierte Abbildung nach (Lewandoski, 2001).

steuerbaren Cre-Aktivität durch gezielte Induktion des Cre-Transgens. Bei dem ersten publizierten Beispiel war der Mx1 Promotor verwendet worden, der durch Gabe von Interferon aktiviert werden kann (Kuhn et al., 1995). Eine andere Möglichkeit ist die Fusion einer Steroid-Bindedomäne an die Rekombinase (Danielian et al., 1998; Feil et al., 1996; Kellendonk et al., 1999; Kellendonk et al., 1996). Ohne Induktor wird die Rekombinase im Zytoplasma zurückgehalten, mit Induktor – entweder RU486 oder Tamoxifen – wird sie freigesetzt und kann in den Zellkern diffundieren. Ein Problem dieser Anwendungen ist die mögliche Toxizität der Induktoren. Alternativ kann das Rekombinase System mit dem TetR-System kombiniert werden. Dabei wird die Expression der Rekombinase durch einen mit dem Tetracyclin Doxycyclin regulierbaren Promotor auf eine Weise kontrolliert, dass durch Hinzugabe bzw. durch Weglassen von Doxycyclin im Trinkwasser die Cre-Rekombinase aktiviert wird (Holzenberger et al., 2000b; St-Onge et al., 1996).

Mithilfe der Cre-Rekombinase ist es weiterhin möglich die Selektionsgene zu entfernen. So ist beispielsweise für das Neomycin-Resistenzgen bekannt, dass es zu hypomorphen Allelen führen kann. Dies bedeutet, dass bei sonst unverändertem Allel allein die Anwesenheit des Neomycin-Resistenzgens zu einer verminderten Expression desjenigen Gens führt, in dessen Intron das Neomycin-Resistenzgen inseriert wurde (Meyers et al., 1998; Nagy et al., 1998; Xu et al., 2001). Dies kann z.B. erwünscht sein, wenn der Einfluss der Proteinmenge auf dem Phänotyp untersucht werden soll. In der Regel wird aber angestrebt, das Wildtyp-Allel bzw. dessen Funktion allein mit der Funktion des korrespondierenden und gezielt mutierten Allels zu vergleichen. Eine elegante Möglichkeit zur Entfernung der Selektionsgene ist die Verwendung von drei loxP Sequenzen, so dass nicht nur die Genregion, die entfernt werden soll sondern auch die Selektionskassette mit loxP flankiert ist (Gu et al., 1994) (Abbildung 4-7 A)). Durch partielle Cre-vermittelte Rekombination kann die Neomycinkassette entfernt werden, um so das mit loxP flankierte Exon zu erhalten. Partielle Cre-vermittelte Rekombination kann durch Verpaaren mit Mäusen erreicht werden welche die Cre-Rekombinase mosaikförmig in der Keimbahn exprimieren (Holzenberger et al., 2000a; Xu et al., 2001). Das Flp/frt System ist nicht so weit verbreitet wie das Cre/loxP System. In der vorliegenden Arbeit wurde das Flp/frt-System als Alternative zu der 3-loxP Strategie zu Entfernung der Selektionskassette verwendet (Abbildung 4-7 B).

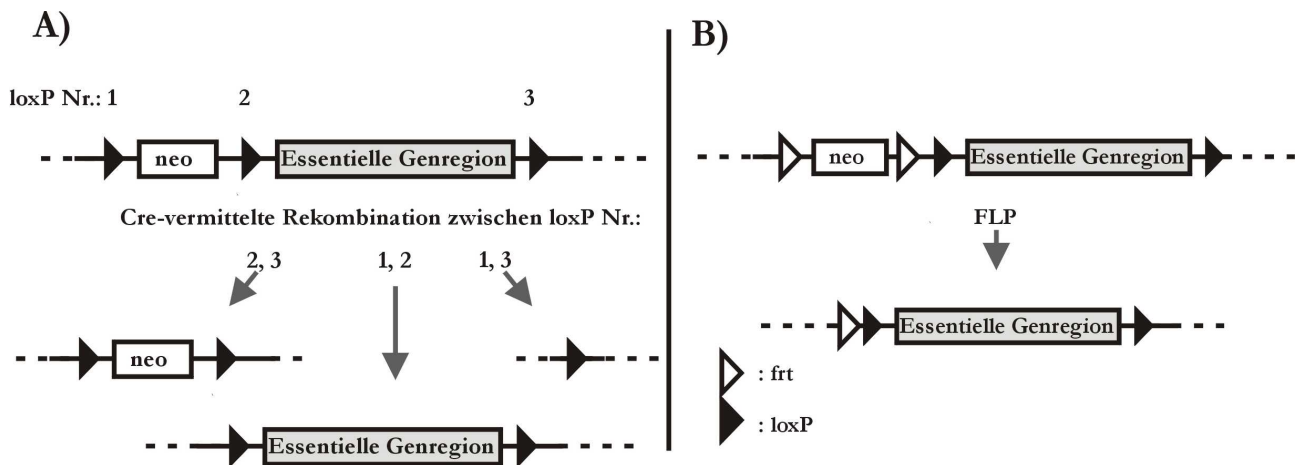


Abbildung 4-7 Entfernen der Selektionskassette

A) Verwendung von 3 loxP-Sequenzen zur Entfernung des Neomycin-Resistenzgens (neo). Modifiziert nach (Lewandoski, 2001). Cre vermittelte Rekombination zwischen der loxP Nr.1/2 führt zur Gen-Inaktivierung bei Erhalt der essentiellen Genregion, zwischen loxP Nr.2/3 zur Gen-Inaktivierung bei Erhalt des Resistenzgens und zwischen loxP Nr1/3 zur Gen-Inaktivierung unter Verlust von essentieller Genregion und Resistenzgen. Der kleinste Eingriff in die Integrität des Gens ist durch Rekombination zwischen loxP Nr.1/2 gewährleistet. das modifizierte Allel unterscheidet sich vom Wildtyp-Allel allein in den beiden eingefügten 34 bp loxP Sequenzabschnitten. Durch anschließende Verpaarung einer Maus mit diesem Rekombinationsereignis mit einer transgenen Cre-Maus wird exakt die essentielle Genregion deletiert.

B) Verwendung der FLP/frt-Systems zur Entfernung der Selektionskassette

Tetracyclin sensitive Regulation und deren Einsatz beim Gene-Targeting

Dieses Regulationssystem besteht aus einem tetracyclinabhängigen Transaktivator (tTA); dieser bindet an einen tet-Operator und kontrolliert über einen daran gekoppelten Promotor die Expression des Zielgens (Gossen and Bujard, 1992). Der Tetracyclintransaktivator wurde durch Fusion des Transaktivatorproteins VP16 aus dem Herpes simplex Virus und dem Tetracyclin Repressor (TetR) aus Escherichia coli hergestellt. Der Tetracyclinoperator tetO bindet sowohl Tetracyclin als auch den Tetracyclintransaktivator tTA. Durch Bindung des Transaktivators an den Tetracyclinoperator wird ein an letzteren gekoppelter Promotor aktiviert (Abbildung 4-8). Das tetracyclinabhängige System existiert in zwei Versionen: In der ursprünglichen Version, der ‚tet-Off‘-Version, kann der Transaktivator tTA nicht bei Anwesenheit des Induktors Tetracyclin binden – die Genexpression ist ausgeschaltet. Später wurde das ‚tet-On‘ System entwickelt, bei dem der Transaktivator nur in Anwesenheit des Induktors Tetracyclin an den Operator tetO binden kann (Gossen et al., 1995). Die Unterschiede der beiden Systeme liegen in der Kinetik mit der die Expression des Zielgens induziert wird: in dem ‚tet-Off‘ System ist kontinuierliche Doxycyclingabe zur Inaktivierung der Genexpression notwendig. Nach Doxycyclin-Entzug ist die Induktion der Genexpression von der Eliminationsrate des Doxycyclins abhängig; je nach Gewebe kann dies bis zu einer Woche dauern (Kistner et al., 1996). Bei dem ‚tet-On‘ System dagegen erfolgt die Induktion der Genexpression durch Gabe von Doxycyclin. Durch das schnelle Anfluten kann die Genexpression innerhalb einer Stunde eingeschaltet

werden (Hasan et al., 2001). Ein detaillierter Vergleich der beiden Systeme ist in (Shin et al., 1999) beschrieben. Statt dem ursprünglichen Induktor Tetracyclin wird heute Doxycyclin verwendet, das eine bessere Bioverfügbarkeit hat. Das Doxycyclin kann über das Trinkwasser appliziert werden, je nach Gewebe sind Dosierungen von 200 ng/ml bis 2 mg/ml Trinkwasser wirksam (Bond et al., 2000; Hasan et al., 2001; Kistner et al., 1996; Krestel et al., 2001; Mack et al., 2001).

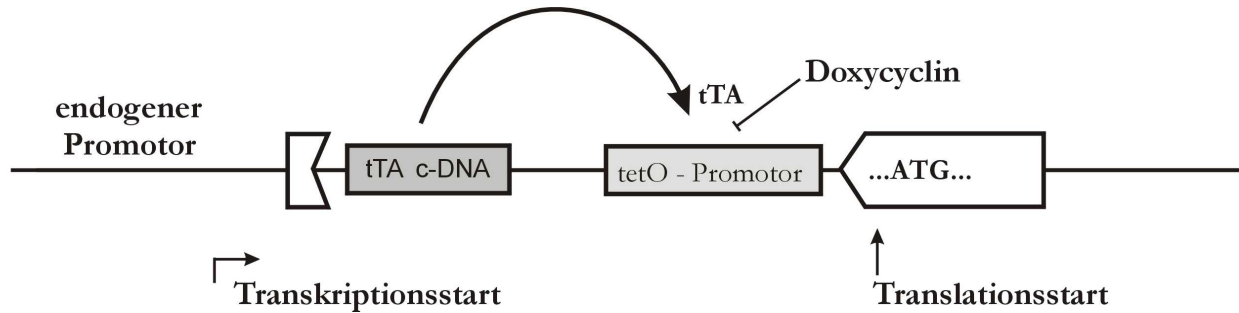


Abbildung 4-8 Das Tetracyclinabhängige Regulationssystem Tet-Off.

Der endogene Promotor des Zielgens reguliert die Expression des Tetracyclintransaktivators tTA. tTA wird gebildet und bindet an den Tetracyclinoperator tetO. An diesem Operator ist ein beliebiger Promotor gekoppelt, der nach Aktivierung die Expression des Zielgens bewirkt. Solange Doxycyclin anwesend ist kann der Tetracyclintransaktivator tTA diesen Promotor nicht aktivieren: Das Zielgen wird nicht exprimiert. Wird Doxycyclin entfernt – indem es beispielsweise nicht länger über das Trinkwasser zugeführt wird – kann der Transaktivator den Promotor aktivieren: Das Zielgen wird exprimiert.

5 FRAGESTELLUNG

Die einzelnen Mitglieder der im vorausgehenden Kapitel beschriebenen TRP-Genfamilie wurden in Säugergeweben ausnahmslos erst in den letzten zehn Jahren identifiziert. Trotz einer Reihe von Einzelbefunden, die oben beschrieben sind, sind ihre Funktionen im Organismus noch keineswegs verstanden. Spezifische Agonisten oder Antagonisten liegen eigentlich nur für TRPM8 (Menthol, Icillin), TRPA1 (Tetrahydrocannabinol, Senföl) und TRPV1 (Capsaicin, Resiniferatoxin) vor. Agonisten bzw. Antagonisten sind aber notwendig um die Funktion einzelner TRP-Proteine in intakten Zellen, Geweben und Organismen zu untersuchen. So könnte durch einen spezifischen Antagonisten die Funktion eines TRP-Proteins blockiert werden und aus der vergleichenden Untersuchung von Zellen, die in Abwesenheit und in Anwesenheit des Antagonisten durchgeführt werden, könnte auf die Funktion des TRP-Proteins geschlossen werden.

Da jedoch solche Antagonisten bzw. Agonisten für die meisten TRP-Proteine nicht vorliegen, ist es notwendig alternative Strategien zu verwenden. Eine dieser Strategien besteht darin, das jeweilige Gen – hier das Gen eines bestimmten TRP-Proteins – gezielt im Gesamtorganismus zu inaktivieren. Es sollte dadurch ein Organismus entstehen, der bis auf dieses eine Gen, das ihm fehlt, identisch hinsichtlich einer genetischen Ausstattung mit dem so genannten Wildtyp-Organismus ist. Aus den Defiziten des Organismus, dem das eine Gen fehlt, im Vergleich zum Wildtyp-Organismus lässt sich dann auf die Funktion des ausgeschalteten Gens schließen.

Diese gezielte Inaktivierung eines Gens bezeichnet man als Gene-Targeting und bisher ist diese Vorgehensweise insbesondere für die Maus etabliert. Im Detail ist die Vorgehensweise unten beschrieben.

Um die Funktion einzelner TRP-Proteine zu charakterisieren wurde die Methode des Gene-Targeting schon sehr bald eingesetzt. So wurde als eines der ersten TRP-Gene bereits im Jahr 2000 das TRPV1 Gen inaktiviert (Caterina et al., 2000), dann 2001 von unserer Arbeitsgruppe das TRPC4 Gen (Freichel et al., 2001) und 2002 das TRPC2 Gen (Stowers et al., 2002). Zu Beginn meiner Doktorarbeit lagen somit drei Maus-Tiermodelle vor, bei denen einzelne TRP-Gene ausgeschaltet waren.

Meine Aufgabe war es im Rahmen meiner Doktorarbeit das Gen, das für TRPV6 kodiert, gezielt am Maus-Tiermodell zu inaktivieren. Das TRPV6-Gen war in unserer Arbeitsgruppe parallel zu einer Arbeitsgruppe in Nijmegen und einer weiteren Gruppe in Harvard entdeckt worden. TRPV6 kodiert einen Kationenkanal, der in erster Linie für Ca^{2+} -Ionen permeabel ist. Obwohl dieser Kanal nach Expression der cDNA in üblichen Kulturzellen mit elektrophysiologischen Methoden gut messbar ist, können selbst unter Anwendung der gleichen Messprotokolle entsprechende Ströme in Zellen, die TRPV6 normalerweise exprimieren, nicht nachgewiesen werden. Ich habe deshalb zunächst

untersucht, in welchen Geweben von Maus TRPV6 exprimiert wird. Dazu musste ich zunächst die cDNS von TRPV6 von Maus klonieren – sie lag zu Beginn meiner Arbeit nicht vor. Des Weiteren habe ich die Expression von TRPV6-Transkripten untersucht und konnte zeigen, dass sie in mRNS von Plazenten, Niere und Pankreas vorkommt. In den nächsten Schritten habe ich dann die weiter unten beschriebenen Strategien angewendet, um das TRPV6-Gen im Mausorganismus gezielt zu inaktivieren. Die oben beschriebenen Geninaktivierungen von TRPC2, TRPV1 und TRPC4 sind so genannte klassische oder globale Geninaktivierungen; dies bedeutet, dass das jeweilige Gen im Gesamtorganismus ausgeschaltet ist. Weitreichendere Interpretationen lassen sich jedoch erzielen, wenn das einzelne Gen gezielt nur in einem bestimmten Zelltyp inaktiviert wird. Eine Weiterentwicklung dieser Methode erlaubt es zudem, das Gen gezielt zu einem bestimmten Zeitpunkt entweder am Gesamtorganismus oder in einzelnen Zellen auszuschalten.

In meiner Arbeit habe ich letztere Strategien zu Inaktivierung des TRPV6-Gens aufgegriffen und angewandt. Zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Arbeit existieren Mäuse die homozygot für die eingeführte Mutation sind.

Parallel zu diesen Arbeiten habe ich an zwei weiteren Gene-Targeting Projekten in unserer Arbeitsgruppe mitgearbeitet, an der Inaktivierung von TRPM4 und TRPM7. Auch TRPM4 wurde von unserer Arbeitsgruppe mitentdeckt. Es handelt sich um einen Kationenkanal, der selbst für Ca^{2+} -Ionen nicht permeabel ist, aber durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration aktiviert wird. Er ist somit prädestiniert ein chemisches Signal – z.B. Acetylcholin, das über den muskarinergen M1-Rezeptor zu einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Ionenkonzentration führt – in ein elektrisches Signal umzuwandeln: Der Ca^{2+} -Anstieg aktiviert TRPM4, es kommt zur Öffnung des Kanals, Na^+ -Ionen strömen ins Zytosol und die Zelle wird depolarisiert. Diese Depolarisation ist das elektrische Signal, das wiederum spannungsabhängige Ionenkanäle aktiviert; durch die Aktivität der letzteren Kanäle wird das elektrische Signal weiter verstärkt.

Zum Zeitpunkt des Abfassens dieser Doktorarbeit haben wir bereits Maus-Tiermodelle, bei denen das TRPM4 Gen im gesamten Organismus inaktiviert ist, gezüchtet. Wir konnten zeigen, dass TRPM4 normalerweise in Mastzellen exprimiert wird; aus den Defiziten von TRPM4-defizienten Mastzellen konnten wir schließen, dass die Funktion von TRPM4 wesentlich für die gesteuerte Freisetzung von Histamin verantwortlich ist. Ein zweites Projekt, an dem ich neben meiner Hauptarbeit an TRPV6 beteiligt war, ist die Inaktivierung von TRPM7. Hier zeigte sich dass TRPM7 für das Überleben des Mausorganismus essentiell ist. Tiere, bei denen TRPM7 inaktiviert ist, sterben sehr früh in der Embryonalperiode. Somit ist TRPM7 das bisher einzige Gen der TRP-Familie, das für das Überleben des Mausorganismus essentiell ist.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 MATERIAL

6.1.1 GERÄTE UND ARBEITSMATERIAL

Bezugsquellen:

Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)	Merck (Darmstadt, D)
Applied Biosystems (Foster City, USA)	MWG Biotech (Ebersberg, D)
BD Biosciences (Bedford, USA)	National Band & Tag Company (Newport, USA)
Beckman (München, D)	New England Biolabs (NEB, Frankfurt, D)
Berthold Technologies (Bad Wilbad, D)	New Brunswick Scientific (Edison NJ, USA)
Biochrom (Berlin, D)	Nunc (Roskilde, DK)
Bio-Rad Laboratories (München, D)	Peqlab (Erlangen, D)
Brand (Wertheim, D)	Operon (Köln, D)
Charles River Laboratories (Wilmington, USA)	Qiagen (Hilden, D)
Chemicon (Hampshire, UK)	Roche (Basel, CH)
Fermentas (St. Leon-Rot, D)	Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, USA)
Fuji (Düsseldorf, D)	Roth (Karlsruhe, D)
GFL (Burgwedel, D)	Thermo Electron Corporation (Waltham, USA)
Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)	Sarstedt (Nürnbrecht, D)
Heraeus (Hanau, D)	Serva (Heidelberg, D)
Hermle (St. Leon-Rot, D)	Sigma (Deisenhofen, D)
Holten (Allerod, DK)	Strobel (Saarbrücken, D)
Integra Biosciences (Chur, CH)	Stratagene (Heidelberg, D)
Invitrogen (San Diego, USA)	Uniequip (Martinsried, D)
Jackson Laboratory (Main, USA)	VWR (Darmstadt, D)
Kinematica AG (Littau-Lucerne, CH)	Wallac Perkin Elmer (Boston, USA)
Köttermann (Uetze/Hänigsen)	Whatman (Brentford, UK)
Li-Cor (Lincoln, USA)	Zeiss (Oberkochen, D)
	Zinsser Analytic (Frankfurt, D)

Materialien:

96-Lochplatten mit Filtrationseinheit:	Whatman Microplate Devices Unifilter (Whatman)
Elektrophorese Küvetten:	Gene Pulser Cuvette 0,4 cm electrode gap 50 (Biorad)
Gestopfte Spitzen:	Filter Tip FT 20, 200 und 1000 (Greiner bio-one)
Hybridisierungsbeutel:	Metzgereigrosshandel Strobel
Kryobehälter:	Cryotube Vials 1,8 ml (Nunc)
Kulturgefässe für die Zellkultur:	Alle von Falcon (BD Biosciences)
Neubauer Zählkammer:	Neubauer Improved (Brand)
Nick-Säulen:	Nick TM Columns (Amersham Pharmacia)
Nitrocellulose-Membran:	Hybond N (Amersham Pharmacia)
Ohrnummern für Mäuse:	Small Animal Ear Tag (National Band&Tag Company)
Phosphorimagerfilme:	BAS-IP-MP 2040 (Fuji)
Röntgenfilme:	Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia)
Sepharose zum Befüllen der Filterplatten:	Sephadex TM G-50 (Amersham Pharmacia)
Steril Distritips:	Distritip Mini und Maxi (Gilson)
Sterile Einmalpipetten für die Zellkultur:	Serological pipettes (Sarstedt)
Szintilationsröhrchen:	Szintilationsröhrchen (Zinsser Analytic)

Geräte:

DNS Sequenzierautomat:	DNS Analyzer GENE REDIR 4200 (Li-Cor) Abi Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
Elektroporationsgerät:	Gene Pulser (Bio-Rad)
Flächenzähler:	LB 122 Counter (Berthold Technologies)
Flüssiger Stickstoff Behälter:	Cryoplus (Thermo)
Gelelektrophorese-Apperatur:	Biorad Model 3000 Xi (Bio-Rad)
Gewebehomogenisator nach Potter-Elvehjem:	(VWR)
Mikroskop:	Axiovert 25 (Zeiss) Stemi 2000-C (Zeiss)
Phosphoimager:	Fujifilm BAS-2500 (Fuji)
Photometer:	Gene quant II (Pharmacia Biotech)
Pipetten:	Pipetman(Gilson) Pipetman Multichannel (Gilson) Distriman (Gilson)
Pippettierhilfe für die Zellkultur:	Pipetboy acu (Integra Biosciences)
Schüttelinkubator:	Scientific Series 25 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific)
Schüttelwasserbad:	Wasserbad (GFL)
Sicherheitswerkbank:	Kötterman 8511 (Köttermann)
Szinitillationszähler:	Wallac 1410 Liquid Scintillation Counter (Wallac Perkin Elmer)
Thermocycler :	Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems)
Thermomixer:	Vortem 56 EVC (Uniequip)
Ultra Turrax::	Polytron PT1200 (Kinematica)
UV-Crosslinker:	UV-Stratalinker 1800 (Stratagene)
Zentrifugen:	Tischzentrifuge Hermle Z 233 MK (Hermle) Tischzentrifuge Biofuge pico (Heraeus) J2-HS centrifuge (Beckman) 96-well Plattenzentrifuge 4-15C (Sigma)

6.1.2 CHEMIKALIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Pharmacia, Boehringer Ingelheim, Invitrogen, Merck, Roth oder Sigma bezogen.

6.1.3 REAGENZIENSYSTEME

ABI Prism BigDye™ FS Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V1.1 (Applied Biosystems)
 DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit with 7-deaza-d-GTP (Amersham Pharmacia)
 Eppendorf Fast Plasmid Mini Kit (Eppendorf)
 MasterAmp™ Extra-Long PCR Kit
 polyA Spin™ mRNA Isolation (NEB)
 Qiagen Plasmid Mini und Maxi Kit (Qiagen)
 Qiagen DNeasy 96 Tissue Kit (Qiagen)
 Rediprime II DNS Labelling System (Amersham Pharmacia)
 Superscript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)

6.1.4 NUKLEOTIDE UND OLIGODEOXYNUKLEOTIDE

6.1.4.1 NUKLEOTIDE

dNTP- Mix (Peqlab)

DNS-Größenmarker: 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)

RNS-Größenmarker: 0,24-9,5 kb RNA Ladder (Invitrogen)

6.1.4.2 RADIOAKTIV MARKIERTE NUKLEOTIDE

Redivue [α -³²P] dCTP (Amersham Pharmacia)

6.1.4.3 OLIGODEOXYNUKLEOTID-PRIMER

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Primer wurden entweder von der Firma MWG oder der Firma Operon synthetisiert. Alle mit dem Kürzel „i“ versehenen Primer sind am 5'-Ende mit einem Infrarot-Farbstoff (IRD, infrared dye) gekoppelt und wurden von der Firma MWG geliefert.

Tabelle 6-1 Liste der verwendeten Primer

Name	Sequenz	Verwendung	TM (°C)
FVi 79	CAC GAC GTT GTA AAA CGA C	Sequenzierung in MCS von pUC18 und pBlue	56
FVi 80	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Sequenzierung in MCS von pUC18 und pBlue	50
Tri-taubi-loxP1_for _i	TAA CCG GCC TCT TCA TCG GG	Sequenzierung der 1. loxP Sequenzierung in triTaubi.AF (forward)	64
Tri-taubi-loxP2_for _i	ATT TGA GAA GAT GCG GCC AGC'	Sequenzierung der 2. loxP Sequenzierung in triTaubi.AF (forward)	64
Tri-taubi-loxP2_rev _i	GCA CTG GAG TGG CAA CTT CC	Sequenzierung der 2. loxP Sequenzierung in triTaubi.AF (reverse)	64
TK-1	GCA GCG GCC AAT AGC AGC	Sequenzierung TK-Kassette	60
TK-2	CGC AAC TGC TGG TGG CCC	Sequenzierung TK-Kassette	62
TK-3	GCG GTA CCT TAT GGG CAG C	Sequenzierung TK-Kassette	62
TK-4	CAA CGG CGA CCT GTA TAA CG	Sequenzierung TK-Kassette	62
TK-5	AGG GCT GGC ACT CTG TCG	Sequenzierung TK-Kassette	60
TK-6	TGG GAC CGA ACC CCG CG	Sequenzierung TK-Kassette	60
TK-7	AGC AAC TCG GGG GCC CG	Sequenzierung TK-Kassette	60
TK-8	GCT GCC CAT AAG GTA CCG C	Sequenzierung TK-Kassette	62
TK-9	GGG CCA CCA GCA GTT GCG	Sequenzierung TK-Kassette	62
TK-10	GCT GCT ATT GGC CGC TGC	Sequenzierung TK-Kassette	60
EGFP-pA	ACC TCC CAC ACC TCC CCC	Sequenzierung EGFP-N1 bp 1475 for	62
EGFP-prom	CGT TGG GCG GTC AGC CAG	Sequenzierung EGFP-N1 bp100 rev	62
M4-194	ATG TGG AAT GTG TGC GAG GC	Genotypisierung	60
mcat1	CGG AAT TCA TGG GGT GGT CCC TGC C	Amplifikation mTRPV6 cDNS, for	58
mcat2	CGG AAT TCG TGC TGA ACA GTG CCA TGG	Amplifikation mTRPV6 cDNS, rev	60
mcat3	CGG AAT TCT AAT GCG ATT TTC TGC TGG C	Amplifikation mTRPV6 cDNS, for	58
mcat4	CGG AAT TCT CAG ATC TGG TAC TCC CAG	Amplifikation mTRPV6 cDNS, rev	72
mcat5	GCT CCT AGG GGC AGC CAC G	PCR mTRPV6 cDNS, for	66
mcat6	GGA AGC CTC AGC AGC TCC AC	PCR mTRPV6 cDNS, for	66
mcat7	TCT GTA GAG GTC CCG TCT CC	PCR mTRPV6 cDNS, rev	64
mcat8	ACC CCA ACT GGG CTC GAC C	PCR mTRPV6 cDNS, rev	64
mcat9	GCA GGG ACC ACC CCA TGG	PCR mTRPV6 cDNS, rev	62

Name	Sequenz	Verwendung	TM (°C)
mc10i	GAC TTC GGA GCT ATA TGA AGG	Sequenzierung mTRPV6 cDNS for	62
mc11i	TCT GAC CTT CAT ATA GCT CCG	Sequenzierung mTRPV6 cDNS rev	62
mc12i	GAA CTT GTG CCA AAT AAC CAG G	Sequenzierung mTRPV6 cDNS for	64
mc13i	CTG GTT ATT TGG CAC AAG TTC C	Sequenzierung mTRPV6 cDNS rev	64
mc14i	AAG CTC CTT CAG GAG GCC	Sequenzierung mTRPV6 cDNS for	62
mc15i	TAG GCC TCC TGA AGG AGC	Sequenzierung mTRPV6 cDNS rev	62
mc16i	CTT AAT GCG ATT TTC TGC TGG C	Sequenzierung mTRPV6 cDNS for	64
mc17i	TAC CAC AGC CAT GAG CCA GC	Sequenzierung mTRPV6 cDNS rev	64
mc18i	GGC GAG AGT ATG GTC TTG GC	Sequenzierung mTRPV6 cDNS for	64
mc19i	GCC AAG ACC ATA CTC TCG CC	Sequenzierung mTRPV6 cDNS rev	64
mc20	CTT GTC TGT GGA ACC ATC TGC	Sequenzierung mTRPV6 cDNS rev	64
mc21	GAT TCC CAG ATC CTC TTC TGC	Sequenzierung mTRPV6 cDNS rev	64
mc22	CTT CAA ACT TGA GCA GCT TGC	Sequenzierung mTRPV6 cDNS rev	62
mc23	GCC TCC ATT AGC ACC ATT GC	Sequenzierung mTRPV6 cDNS rev	62
mc30	CGGGATCC TCA TAT AGC TCC GAA GTC ATG G	Exon3, BamH1	64
mc31	CGGGATCC TGG TAG GAT CTG GGA ATC ACC	Exon 2, BamH1	64
mc32	CGGGATCC GGA GCA GCC TAG AGA CAG TG	Intron, für 3'-Sonde ,BamH1	64
mc33	CGG AAT TC TCC CAG TGA CAG CAT GAG GC	Intron, für 5'-Sonde, EcoR1	64
mc34	CGG AAT TC GGG AAG ATT CTG AGC CCT GG	Intron, für 5'-Sonde,EcoR1	64
mc35	GGC AAA CAT GCT TCT GAT CAC C	Intron, für 5'-Sonde	66
mc16i_ neu	CTT GAT GCG ATT CTG CTG GCT	Sequenzierung mTRPV6 cDNS for	64
mc36	CTGTAGGACTGCCGCTCACC	ForP1, 5'Homologie	66
mc37	AGGCGCGCCTGCTGAGGCTGATGCCAGACC	Revers, P2, mit AscI 5'Homologie	66
mc38	CA TGG GGT GGT CCC TGC C	P5, 3'Homologie	62
mc39	TATCAAGGCAAGAAGCTGAGGTC	P6, 3'-Homologie	64
mc40	GGAATTCCCAGGAGTCCATGCCAACC	P4, 3'Homologie	66
mc41	GGAATTCCGGCGCGCCGGAACCAGCCTTCCA CCCCATGGGATGGAGCCTACCCAAGG	P3, 3'-Homologie	182
mc42i	AGA TAC TGC CAG AGA ACA GGG	Sequenzierung pmCatL_08, for	64
mc43i	ACA TAC CCA GCT GCA GGA CAC	Sequenzierung pmCatL_08, rev	64
mc44i	ATTT GGC TTC AGG CCC TGC C	Sequenzierung pmCatL_07, for	62
mc45i	AAG GGC AGC CGG TGA GGT G	Sequenzierung pmCatL_07, rev	64
mc46	GC TCT AGA GC GAT ATC CTC GAG GCC GCC ACC A TGG GGT GGT CCC TGC C	Kozak	58
mc47	ACTACCCACACAGGCAGC	Nach Spe I	58
mc48i	TTATGTATCTCTACTCCATGCC	Sequenzierung 3'-Homologie ,for	62
mc49i	GTCTGCTGTAGGGGCATGG	Sequenzierung 3'-Homologie, rev	62
mc50i	GGAAGTCCCTGCTTTTGTGGC	Sequenzierung 3'-Homologie, for	62
mc51i	GCCACAAAAGCAGGACTTCC	Sequenzierung 3'-Homologie, rev	62
mc52i	GCAGGCAGCCTGGTTAAGC	Sequenzierung 3'-Homologie, for	62
mc53i	GCITTAACCAGGCTGCCTGC	Sequenzierung 3'-Homologie, rev	62
mc54i	TAGGAACAGGCCTGGATAGG	Sequenzierung 3'-Homologie , for	62
mc55i	ATCCTATCCAGGCCTGTTC	Sequenzierung 3'-Homologie, rev	62
mc56i	GGTACAATAGCAACTGATAGAGC	Sequenzierung 3'-Homologie, for	66
mc57i	GCTCTATCAGTTGCTATTGTACC	Sequenzierung 3'-Homologie, rev	66
mc58i	AGC TCT GCA AGG AAT TAG ACC	Sequenzierung 5'-Homologie, for	62
mc59i	AGG TCT AAT TCC TTG CAG AGC	Sequenzierung 5'-Homologie, rev	62
mc60i	TGG GCA GAG AGA GTC ACT AG	Sequenzierung 5'-Homologie, for	62
mc61i	AGT GAC TCT CTC TGC CCA TG	Sequenzierung 5'-Homologie, rev	62
mc62i	TAC CAC CCC CAC ATA CAT TTC	Sequenzierung 5'-Homologie, for	62

Name	Sequenz	Verwendung	TM (°C)
mcat63i	AAA TGT ATG TGG GGG TGG TAC	Sequenzierung 5'-Homologie, rev	62
mcat64i	GCC TCC CCA TCA CCC CAG	Sequenzierung 5'-Homologie, for	62
mcat65i	CTG GGG TGA TGG GGA GGC	Sequenzierung 5'-Homologie, rev	62
mcat66i	TCT ACA GCC TCA TTC TGC CC	Sequenzierung 5'-Homologie, for	62
mcat67i	AGG GCA GAA TGA GGC TGT AG	Sequenzierung 5'-Homologie, rev	62
mcat68i	GCC TTT CCA TAC CCC ACC C	Sequenzierung 5'-Homologie, for	62
mcat69i	GGG TGG GGT ATG GAA AGG C	Sequenzierung 5'-Homologie, rev	62
mcat70i	TAG CAC CCA GAG CAC AGG C	Sequenzierung 5'-Homologie, for	62
mcat71i	ATG CC TGT GCT CTG GGT GC	Sequenzierung 5'-Homologie, rev	62
mcat72i	CTG CCT TAT AGG TTC CAC GTG	Sequenzierung 5'-Homologie, for	64
mcat73i	CAC GTG GAA CCT ATA AGG CAG	Sequenzierung 5'-Homologie, rev	64
mcat74i	CCA GTG CTA ACT CAA AGT GGG	Sequenzierung 5'-Homologie, for	64
mcat75i	CCC ACT TTG AGT TAG CAC TGG	Sequenzierung 5'-Homologie, rev	64
mcat76i	GAG GGA GGG AGT GCC CAC	Sequenzierung 5'-Homologie, for	62
mcat77i	GTG GGC ACT CCC TCC CTC	Sequenzierung 5'-Homologie, rev	62
mcat78i	AGG GAG TGG TAA ACT CGA CC	Sequenzierung triTaubi.AF, for in 3'Hom	62
mcat79i	GGG AAG GGC GAT CGG TGC	Sequenzierung triTaubi.AF, rev in 3'Hom	62
mcat80i	TGC TTC CGG CTC GTA TGT TG	Sequenzierung triTaubi.AF, for in 5'Hom	62
mcat81i	TTA GCG CAG AAG TCA TGC CC -	Sequenzierung triTaubi.AF, rev in 5'Hom	62
mcat37a	GGACTAGTCC GCT GAG GCT GAT GCC AGA CC	wie mcat37i aber mit SpeI Überhang zur Blunt-Klonierung der 5'Hom in pUC/SmaI	66
mcat37b	CG GAA TTC C GCT AGC GCTGAGGCTGATGCCAGACC	Revers, P2, mit NheI + Eco RI 5'Homologie	66
mcat82_loxP	CGCG GGCCGGCC ATAACCTTCGTATA AT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TGA GG	5'-Phosphat Forward, AscI-NotI-loxP-AscI	148
mcat83_loxP	CGCGCC TCATAACTTCGTATA G CAT ACA T TA TAC GAA GTT AT GGCCGGCC	5'-Phosphat Reverse komplementär zu mCaT-L-loxP_1	148
mcat84	ACC GCC ACG AGT AAT GTG GC	PCR 5' Hom (0-HindIII) for	64
mcat85	CTT ATG TGG AAG AAC CTC TGC C	PCR 5' Hom (0-HindIII) rev	66
mcat86_loxP	C AGATCT ATA ACT TCG TAT A AT GTA TGC TAT ACG AAG TTA T GCA	BglII, loxP, mit BsmI Überhang, for, 5'-Phosphat	176
mcat87_loxP	C ATA ACT TCG TAT A GCATACAT TAT ACG AAG TTAT AGATCT GTG	loxP, BglII, mit BsmI Überhang, rev, 5'-Phosphat	116
mcat88	CGGGATCC ATG GGG TGG TCC CTG CC	N-term GST-Fusionsprotein; for, BamHI MGWSLP	58
mcat89	GGAATTC TCA GGG CCG CCC ATA CCT CT	N-term GST-Fusionsprotein, rev, EcoRI stop PRGYR	58
mcat90	CGGGATCC TGG AGA GTT GCC CAT GAG C	C-term GST-Fusionsprotein, for, BamHI WRVAHE für PCR mit mcat4 (rev)	60
mcat91	ATAAGAAT GCGGCCGC ATG GGG TGG TCC CTG CC	N-term in pIVEX2.3 (iVT + Histag) for, NotI MGWSLP	58
mcat92	TCCC CCCGGG GGG CCG CCC ATA CCT CT	N-term in pIVEX2.3 (iVT + Histag) rev, XmaI PRGYR	58
mcat93	GGAATTC CATATG TGG AGA GTT GCC CAT GAG C	C-term in pIVEX2.3 (iVT + Histag) for, NdeI WRVAHE	60
mcat94	TCCC CCCGGG GAT CTG GTA CTC CCA GCC	C-term in pIVEX2.3 (iVT + Histag) rev, XmaI IQYEWG	58
mcat95	p- CGCGC CGGCCG CGTCCG GCGGCCGC G	BsshII-EagI-RsrII-NotI-BsshII_for; Backbone für Klonierung von DT-A	104
mcat96	p- CGCGC GCGGCCG CGGACCG GCGCCG G	BsshII-EagI-RsrII-NotI-BsshII_revers; Backbone für Klonierung von DT-A	104
mcat97	AAC GTG GCC AAG ATG CGA TG	Sequenzierung DT-A Kasette rev	62
mcat98	TAC ATC GCA TCT TGG CCA CG	Sequenzierung DT-A Kasette for	62
mcat99	TCG TAC CAC GGG ACT AAA CC	Sequenzierung DT-A Kasette rev	62

Name	Sequenz	Verwendung	TM (°C)
mc100	AGG TTT AGT CCC GTG GTA CG	Sequenzierung DT-A Kasette for	62
mc101	CCA TCC ACA GGA CCA CAT GC	PCR 3'-Sonde neues Targeting, for	64
mc102	GAG CTC AGC CCT GAC CCT C	3'Sonde neues Targeting, rev	64
mc103 for	CGCGC CCCGGG GGA CCGCGG GGA GCTAGC TGATCA CCG CTCGAG GCGCGCC ACGC GTCGAC G	Oligo für pmCaTL_38 BssII-SmaI-SstII-NheI-BclI-XhoI-AscI-SalI- BssII; 5' Phosphat	226
mc104 rev	CGCGC GTCGAC GCGT GCGCGCC CTCGAG CGG TGATCA GCTAGC TCC CCGCGG TCC CCCGGG G	Oligo für pmCaTL_38 BssII-SmaI-SstII-NheI-BclI-XhoI-AscI-SalI- BssII; 5' Phosphat	226
mc105 for	CGCGC GATATC TGC ATGCAT GCA GCTGAGC CTCGAG ATAAC TTCGTATA GCATACAT TATACGAAGTTAT CCGCGG G	Oligo für pmCaTL_39 BssII-EcoRV-NsiI-CelIII-XhoI-Loxp-SstII- BssII; 5' Phosphat	230
mc106 rev	CGCGC CCGCGG ATAAC TTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT CTCGAG GCTCAGC TGC ATGCAT GCA GATATC G	Oligo für pmCaTL_39 BssII-EcoRV-NsiI-CelIII-XhoI-Loxp-SstII- BssII; 5' Phosphat	230
mc107 for	CGCGC CCGCGG GCTGAGC TGC ATGCAT TCCC CCCGGG CTCGAG GCTAGC G	Oligo für pmCaTL_40 BssII-SstII-CelIII-NsiI-XmaI-XhoI-NheI-BssII, 5' Phosphat	176
mc108 rev	CGCGC GCTAGC CTCGAG CCCGGG GGGA ATGCAT GCA GCTCAGC CCGCGG G	Oligo für pmCaTL_40 BssII-SstII-CelIII-NsiI-XmaI-XhoI-NheI-BssII, 5' Phosphat	176
mc109 for	CGCGC GCGCGCC GGATCC ATAAC TTCGTATA GCATACAT TATACGAAGTTAT CCCGGG GGGA GAGCTC G	Oligo für pmCaTL_41 BssII-AscI-BamHI-loxp-XmaI-SstI-BssII; 5' Phosphat	220
mc110 rev	CGCGC GAGCTC TCCC CCCGGG ATAAC TTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT GGATCC GCGCGCC G	Oligo für pmCaTL_41 BssII-AscI-BamHI-loxp-XmaI-SstI-BssII; 5' Phosphat	220
mc111 for	CGCGC GCGCGCC T GAGCTC GA AGATCT GCGGCCG GTCGAC G	Oligo für pmCaTL_42 BssII-AscI-SstI-BglIII-NotI-SalI-BssII; 5' Phosphat	152
mc112 rev	CGCGC GTCGAC GCGGCCG AGATCT TC GAGCTC A GCGCGCC G	Oligo für pmCaTL_42 BssII-AscI-SstI-BglIII-NotI-SalI-BssII; 5' Phosphat	152
mc113	CAA GCT GAG ATG TGG GAG GG	Neues Targetingkonstrukt., for	64
mc114	AAG TCC CTG GCT CTT TCA GG	Neues Targetingkonstrukt., rev	62
mc115	CCC CTC TCA CCT AGA TCT CC	Neues Targetingkonstrukt., for	64
mc116	GGC CAG CTC AGT CTT ACA ATG	Neues Targetingkonstrukt., rev	64
mc117	TGG AGG GAG GCC AGA CAT G	Neues Targetingkonstrukt., for	62
mc118	ACC TTG ATC CCA GGT ACA GG	Neues Targetingkonstrukt., rev	62
mc119	GCT AAG AAG AAG GGT TTG CTG G	Neues Targetingkonstrukt., for	66
mc120	GCC TGA TAC TCT CCA GGC TG	Neues Targetingkonstrukt., rev.; Genotypisierung	64
mc121	GAT GGG GAG GAG CAA GCA AG	Neues Targetingkonstrukt., for; Genotypisierung	64
mc122	GCC ACC TGG TGT GTA AGG TG	Neues Targetingkonstrukt., rev	64
mc123	CCC TAC CTG AAG CAC CCA TC	Neues Targetingkonstrukt., for	64
mc124	GAG AGG AAG CCT AGA TGG GC	Neues Targetingkonstrukt., rev	64
mc125 for	CGCGC GCTGAGC GA AGATCT CG GGATCC CTCGAG A ACCGGT AA CTAAAG CCGCGG G	Oligo für pmCaTL_55 BssIII-CelIII-BglIII-BamHI-XhoI-AgeI-AflIII- SstII-BssII; 5' Phosphat	188
mc126 rev	CGCGC CCGCGG CTAAAG TT ACCGGT T CTCGAG GGATCC CG AGATCT TC GCTCAGC G	Oligo für pmCaTL_55 BssIII-CelIII-BglIII-BamHI-XhoI-AgeI-AflIII- SstII-BssII; 5' Phosphat	188
mc127	GGT CAT GGT GAA GGA GTG GG	Sequenzierung neue 3'Sonde, for	64
mc128	GCA GTT GGG GCA CCT GAG C	Sequenzierung neue 3'Sonde, rev	64
mc129	CTC ACC ATC ATC GCC GGC CCT GCC AAC	Für Einfügen der D541A-Mutation, for	90
mc130	GTT GGC AGG GCC GGC GAT GAT GGT GAG	Für Einfügen der D541A-Mutation, rev	90
mc131	CTC ACC ATC ATC ATG GGC CCT GCC AAC	Für Einfügen der D541M-Mutation, for	86

Name	Sequenz	Verwendung	TM (°C)
mcat132	GTT GGC AGG GCC CAT GAT GAT GGT GAG	Für Einfügen der D541M-Mutation, rev	86
mcat133	AGT CAC CAG GGA ACC TGA TG	Sequenzierung 113/114 for	62
mcat134	CCT GCA TGT TTA CTC CTA GTG	Sequenzierung 113/114 for	62
mcat135	GAG ATT GAC TCC TCA GGA G	Sequenzierung 113/114 for	58
mcat136	CAC CTG GGG AGG GAC AG	Sequenzierung 113/114 for	58
mcat137	CIT CCA CIT GAG GCT CAC C	Sequenzierung 113/114 rev	60
mcat138	GAA CAC AGC CIT TGG AAA GCC	Sequenzierung 113/114 rev	64
mcat139	CCA GCC AAC TTG AAG GGG G	Sequenzierung 113/114 rev	62
mcat140	CCT CAT CCC AGC TCT TAC CC	Sequenzierung 113/114 rev	64
mcat141	CAG GTT GGG GGT CAC TCG	Sequenzierung 115/116 for	64
mcat142	GTT GGG CTG GTG CAA TGT C	Sequenzierung 115/116 for	60
mcat143	AGG TAG TGT TCT CTG CCT CC	Sequenzierung 115/116 for	62
mcat144	GGC CAG GAA ATG TCT AAA GAT GG	Sequenzierung 115/116 for	68
mcat145	CCA TCA GCC AGC AGA ATC GC	Sequenzierung 115/116 rev	64
mcat146	GGG GAG GAA CTG ACC TTC TG	Sequenzierung 115/116 rev	64
mcat147	CAT GAT GAC ATG AAT GGC CC	Sequenzierung 115/116 rev	62
mcat148	AAT GGA CAA GTG GTG GGC	Sequenzierung 117/118 for	56
mcat149	CAT CTA TCT GGC CAT GCT CAG	Sequenzierung 117/118 for	64
mcat149_a	GGT GAG CCC TCT GGC GGC	Sequenzierung 117/118 for	64
mcat150	ACC CTC TCT TTA GCA GCA G	Sequenzierung 117/118 for	58
mcat151	TGC AGG CIT CAG TGT GTT G	Sequenzierung 117/118 rev	58
mcat152	CCA TCA TGG CAA TGA GGA GG	Sequenzierung 117/118 rev	62
mcat153	CCT CCC TTC ATT TTT CTC C	Sequenzierung 117/118 rev	56
mcat154	GAG CGG AAG CTA CCT CGT TG	Sequenzierung 119/120 for	64
mcat155	TCC CIT CIT CCG CTC TCC C	Sequenzierung 119/120 for	62
mcat156	GCG AGT CCA AGG GAG AAG G	Sequenzierung 119/120 for	62
mcat157	TGA TCC CCA CCC AAC TCC C	Sequenzierung 119/120 for	62
mcat158	TTC TGG TGG CCA GCT AGG G	Sequenzierung 119/120 for	62
mcat159	CCA GAG ACC TGC CAG GCC	Sequenzierung 119/120 rev	62
mcat160	CGT GAC AGG GTG GGC CAG	Sequenzierung 119/120 rev	62
mcat161	GTT GTG GAG CCC TGG AGC	Sequenzierung 119/120 rev	60
mcat162	CGG ATG CGT TGT CTG TTG AG	Sequenzierung 119/120 rev	62
mcat163	GCC CAC ATA TCC CAG AGC G	Sequenzierung 119/120 rev	62
mcat164	GCC CCG AAA AGG GTG GGC	Sequenzierung 121/122 for	62
mcat165	GCT GAC TCG GCA GCC TGC	Sequenzierung 121/122 for	62
mcat166	AGA TGC TGA TGG GAA ACT CCC	Sequenzierung 121/122 rev	64
mcat167	TCA ACT CCA CGC TGC AGC C	Sequenzierung 121/122 rev	62
mcat168	CAT CIT TCC TCA ACC CAC GG	Sequenzierung 123/124 for	62
mcat169	CTG ATG GCC TGG CAG GGG	Sequenzierung 123/124 for	62
mcat170	GGA TCT AAG GAT TGA GGG GAC	Sequenzierung 123/124 for	64
mcat171	GGG CCT TGG CCT TCC TTC	Sequenzierung 123/124 rev	60
mcat172	GTG GGC TTG GAG CTA GGC	Sequenzierung 123/124 rev	60
mcat173	AAG GAG GGA ACA AGC TGT GG	Sequenzierung 123/124 rev	62
mcat174	CCC CAA CTG CCA TTG TTT GC	Sequenzierung 123/124 rev	62
mcat175	CGCGCGGATCCCCAGAGACACCATGGCTTAA GGAAGTTCCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAA CTTCGTCGACG	Backboneoligo für Klonierung von SA-EGFP (for) BsshII- BamHI- XcmI- frt- SalI-BsshII	148
mcat176	CGCGCGTCGACGAAGTTCCCTATACTTTCTAG AGAATAGGAACCTCCCTAAGCCATGGTGTCT CTGGGGATCCG	Backboneoligo für Klonierung von SA-EGFP (rev) BsshII- BamHI- XcmI- frt- SalI-BsshII	148
mcat177	CGA TGA ATT CGA GCT CGG	Ampl. SA loxP, for	56
mcat178	GA AGATCT TC GGT GTC TCT GGG GAG GG	Ampl. SA loxP, rev; BglIII Überhang	58
mcat179	CCGGGGAAGTTCCCTATTCTCTAGAAAGTATA GGAACCTCA	Klonierung neue frt-Seite (for) XmaI-frt-AgeI, 5'Phosphat	116

Name	Sequenz	Verwendung	TM (°C)
mcat180	CCGGTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATA GGAACTTCC	Klonierung neue frt-Seite (rev) XmaI-frt-AgeI, 5'Phosphat	116
mcat183	GAT GGA GAA TGA GTC ACC AGG	Verkürzte PCR 113-114, for	64
mcat184	GCG CCC GCG GAT AAC TTC G	Verkürzte PCR 113-114, rev, (Teil v. loxP, SstII, Teil v. BsshII)	64
mcat116-b	CCG CTC GAG GCTG AGC TTT CCC CTG TCC	Zur Korrektur der Mutation in CellIII, rev	94

6.1.4.4 VEKTOREN

BAC-Plasmid aus RPCI-22® Bibliothek:	Roswell
pBluescript II SK (+/-) und KS (+/-) :	Stratagene
pEGFPN1:	BD Biosciences
pKO SelectDT V840:	Überlassen von Prof. Dr. Jentsch, Hamburg
pNTK:	Überlassen von Prof. Dr. Mortensen, Harvard Medical Scool, Boston, USA
pSP-loxPlacZ-FRTneo:	Überlassen von Dr. Kulesa, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, USA
pUC 18:	Fermentas
triTaubi.AF:	Überlassen von Prof. Dr. Sprengel, Heidelberg

6.1.5 RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN UND MODIFIZIERENDE ENZYME

6.1.5.1 RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Die für die Experimente verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche (CellIII), Invitrogen (SstI, SstII) und New England Biolabs (alle weiteren) bezogen.

6.1.5.2 MODIFIZIERENDE ENZYME

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (Roche)	T4-DNS-Polymerase (Roche)
Pfu (Proofreading Polymerase) (Stratagene)	T4-DNS-Ligase (New England Biolabs)
Proteinase K (Peqlab)	T4-Polynukleotidkinase (New England Biolabs)
RNS-Nuklease A (Sigma)	Taq-Polymerase (aus eigener Herstellung)

6.1.6 PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGISCHE EXPERIMENTE

Für das Ansetzen der Puffer und Lösungen wurde entionisiertes, sterilfiltriertes ($\geq 45\mu\text{m}$) und autoklaviertes Wasser verwendet. Die Puffer und Lösungen wurden – wenn nicht anders angegeben – autoklaviert (121 °C, 1 bar, 20 Minuten).

Häufig benutzte Puffer und Lösungen:

▪ 10 x DNS-Auftragspuffer

Für 100 ml	Substanz	Endkonzentration
40 g	Harnstoff	40% (w/v)
40 g	Glycerol, wasserfrei	40% (w/v)
10 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0	50 mM
1 ml	1M Tris-HCl, pH 7,0	10 mM
0,25 g	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
0,25 g	Xylencyanol FF	0,25 % (w/v)

▪ 10 x RNS-Auftragspuffer

Für 100 ml	Substanz	Endkonzentration
40 g	Harnstoff	40% (w/v)
40 g	Glycerol, wasserfrei	40% (w/v)
10 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0	50 mM
1 ml	1M Tris-HCl, pH 7,0	10 mM
0,25 g	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)

▪ 0,5 M EDTA

186,1 g/l Na-EDTA

▪ Lysozymlösung

10 mg Lysozym (10 mg/ml)
1 ml H₂O

▪ Lysis-Puffer für Isolierung genomischer DNS aus ES-Zellen:

Für 50 ml	Substanz	Endkonzentration
5 ml	1 M Tris, pH 8.5	100 mM
500 μl	0,5 M EDTA	5 mM
2 ml	5 M NaCl	200 mM
500 μl	20 % SDS	0,2 %
41,75 ml	H ₂ O	
Erst kurz vor der Verwendung zugeben:		
500 μl	Proteinase K (10 mg/ml)	100 $\mu\text{g/ml}$

▪ **Lysis-Puffer für die Isolierung genomischer DNS aus einem Gewebestück:**

Pro Gewebestück:	Substanz	Endkonzentration
5 µl	10 x PCR Puffer	1 x
44 µl	H ₂ O	
Erst kurz vor der Verwendung zugeben:		
1,0 µl	Proteinase K (10 mg/ml)	0,2 mg/ml

▪ **5 M NaCl**

292,2 g/l NaCl

▪ **3 M Natriumacetat, pH 5,2**

408 g/l Natriumacetat

Mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen.

▪ **RNS-Nuklease Lösung**

Für 10 ml:	Substanz	Endkonzentration
100 ml	RNS-Nuklease A	10 mg/ml
50 µl	10 mM Tris pH7,5	0,05 mM
30 µl	15 mM NaCl	0,045 mM
Auf 10 ml	mit H ₂ O auffüllen.	

▪ **Sequenzgellösung**

Für 2 l:	Substanz	Endkonzentration
200 ml	10 x TBE	1 x
840 g	Harnstoff	7 M
300 ml	Acrylamid 40%	6 %
	(Acrylamid : Bisacrylamid 29:1)	
Auf 2 l	mit H ₂ O auffüllen.	

▪ **STET-L-Puffer**

Für 50 ml	Substanz:	Endkonzentration
4 g	Saccharose	8%
2,5 ml	Triton X-100	5%
1,25 ml	2 M Tris pH8	50 mM
5 ml	0,5 M EDTA 0	50 mM
Auf 50 ml	mit H ₂ O auffüllen.	

Vor dem Verwenden 10 µl/ml frisch angesetzte Lysozymlösung (10 mg/ml) zugeben.

- **TBE (Tris, Borat, EDTA)-Puffer, pH 8,0**

Für 5 l	Substanz	Endkonzentration
540 g	Tris-HCl	89mM
275 g	Borsäure	89 mM
46,5 g	EDTA	1 mM
Auf 5 l	mit H ₂ O auffüllen.	

- **1 x TE**

Für 50 ml	Lösung	Endkonzentration
500 µl	1M Tris-HCl pH 8	10 mM
100 µl	0,5 M EDTA pH 8	1 mM
Auf 50 ml	mit H ₂ O auffüllen.	

- **1 M Tris**

121,1 g/l Tris Base

Mit HCl auf gewünschten pH-Wert einstellen.

Für Southern- und Northern-Blot Experimente benötigte Lösungen:

- **DEPC behandeltes Wasser (H₂O_{DEPC})**

Dazu wird 1 l H₂O mit 100 µl DEPC versetzt und über Nacht unter Rühren bei Raumtemperatur (21 °C) inkubiert. Danach wird das H₂O zweimal autoklaviert (s.o.).

- **0,25 M HCl**

20,76 ml HCl 37 %

Mit H₂O auf 1000 ml auffüllen (keine Autoklavierung).

- **0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCl**

Für 1 l:	Substanz	Endkonzentration
20,05 g	NaOH	0,5 M
87,66 g	NaCl	1,5 M
Auf 1 l	mit H ₂ O auffüllen.	

- **0,5 M Tris/ 3 M NaCl pH 7,5**

Für 1 l:	Substanz	Endkonzentration
60,57 g	Tris-HCl	0,5 M
157,32 g	NaCl	3 M
pH auf 7,5 einstellen.		
Auf 1 l	mit H ₂ O auffüllen.	

- **20 % SDS**

200 g/l SDS

- **20 x SSC, pH 7,0**

Für 1 l	Substanz	Endkonzentration
88,23 g	Natriumcitrat	300 mM
175,32 g	NaCl	3 M
pH auf 7,0 einstellen.		
Auf 1 l	mit H ₂ O auffüllen.	

- **1M Na₂HPO₄**

178,0 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O / 1 Lösung

- **1M NaH₂PO₄**

156,0 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O / 1 Lösung

- **Church Puffer:**

Für 1 l	Substanz	Endkonzentration
500 ml	Na-phosphat Puffer (387 ml 1M Na ₂ HPO ₄ + 113 ml 1M NaH ₂ PO ₄)	0,5M
350 ml	20% SDS-Lösung	7%
110 ml	10% BSA	1%
2 ml	0,5M EDTA	1mM
10 ml	Lachssperma DNS (10 mg/ml) Vor der Zugabe denaturieren durch 10 minütiges Erhitzen auf 95 °C und Abkühlen auf Eis für 3 Minuten:	0,1 mg/ml
Auf 1 l	mit H ₂ O auffüllen.	

- **Deionisiertes Formamid:**

50 ml Formamid in Gegenwart von 5 g Ionenaustauscher Serdolit MB-1 (Serva) mindestens 1h bei 21 °C schütteln. Zum Abtrennen des Ionenaustauschers das Formamid mit einer Kanüle aufsaugen. Bei -20 °C aufbewahren.

- **10 x MOPS pH 7,0**

Für 1 l	Substanz:	Endkonzentration
41,86 g	MOPS	0,2 M
6,804 g	Natriumacetat	0,05 M
20 ml	2 M Tris pH8	50 mM
5 ml	0,5 M EDTA pH8,0	0,01 M
Auf 1 l	mit H ₂ O _{DEPC} auffüllen.	

Nicht autoklavieren, gebackene Flasche und H₂O_{DEPC} verwenden; Bei 2-8 °C aufbewahren.

▪ 5 x PE Puffer

Für 100 ml	Substanz	Endkonzentration
25 ml	1 M Tris-HCL pH 7,5	250 mM
0,5 g	Natriumpyrophosphat	0,5 %
5 g	SDS	5 %
1 g	Polyvidonpyrrolidon 40.000	1 %
1 g	Ficoll 400.000	1 %
5 ml	0,5 M EDTA	25 mM
Auf 80 ml	mit H ₂ O _{DEPC} auffüllen.	
Auf 65 °C erhitzen bis alles gelöst ist, dann auf 37 °C abkühlen lassen.		
20 ml	5 % BSA	1 %
15 min auf 65 °C erhitzen. Anschließend sterilfiltrieren (0,22 µm). Bei -20 °C aufbewahren.		

▪ Prähybridisierungspuffer für Northern Blots

Für 100 ml	Substanz	Endkonzentration
20 ml	5 x PE	1 x
25 ml	20 x SSC	5 x SSC
50 ml	Deionisiertes Formamid 100 %	50 %
1,5 ml	Lachssperma DNS (10 mg/ml)	0,15 mg/ml
Vor der Zugabe denaturieren durch 10 minütiges Erhitzen auf 95 °C und Abkühlen auf Eis für 3 Minuten.		
Auf 100 ml	mit H ₂ O _{DEPC} auffüllen.	

6.1.7 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME

XL1-Blue (Stratagene)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F⁺ proAB lac1^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)] (Bullock, 1987).

Der Stamm XL1-Blue wurde für die Amplifikation von Plasmiden eingesetzt.

DH5α (Invitrogen)

FΦ80lac ZΔM15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(*r_k⁻*, *m_k⁺*) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ (Hanahan, 1983)

Der Stamm DH5α wurde für die Amplifikation von solchen Plasmiden eingesetzt, die im Stamm XL1-Blue nicht effektiv amplifiziert wurden.

GM1855

F dam-4 Δ (lac-pro) XIII thi-1 supE44 (relA1)

Der Stamm GM1855 wurde verwendet wenn Plasmid-DNS ohne Dam-Methylierung benötigt wurde (zum Beispiel für Restriktionsschnitt mit BclI).

6.1.8 NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE KULTUR VON BAKTERIEN

6.1.8.1 FLÜSSIGKULTUR

▪ LB (Luria-Bertani)-Medium, pH7,5

Für 1l	Substanz:	Endkonzentration
10 g	Caseinhydrolysat	1% (w/v)
5 g	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
10 g	NaCl	1% (w/v)

Auf 1l mit H₂O auffüllen.

Autoklavieren bei 121 °C und 1 bar für 20 Minuten. Nach Abkühlen auf 50 °C werden die benötigten Antibiotika zugesetzt.

6.1.8.2 PLATTENKULTUR

▪ LB-Agar

1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium

Autoklavieren bei 121 °C und 1 bar für 20 Minuten. Nach Abkühlen auf 50 °C werden die benötigten Antibiotika zugesetzt.

6.1.8.3 ANTIBIOTIKA

▪ Ampicillin-Stammlösung

50 mg/ml Ampicillin-Na in H₂O (Finale Konzentration im Medium: 50 µg/ml)

▪ Chloramphenicol-Stammlösung

25 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol (Finale Konzentration im Medium: 12,5 µg/ml)

▪ Kanamycin-Stammlösung

50 mg/ml Kanamycin in H₂O (Finale Konzentration im Medium: 50 µg/ml)

6.1.8.4 MEDIUM FÜR DIE KRYOKONSERVIERUNG VON BAKTERIEN

▪ TSS-Puffer

Für 50 ml	Substanz:	Endkonzentration
12,5 ml	PEG 3350 40%	10%
2,5 ml	1 M MgCl ₂	5%
2,5 ml	DMSO	5%

Auf 50 ml mit H₂O auffüllen.

6.1.9 VERSUCHSTIERE UND ZELLINIEN

Mauslinien:

129X1/SvJ	Jackson Laboratory
C57BL/6J	Charles River Laboratories
C57BL/6N	Charles River Laboratories

Zelllinien:

Die embryonalen Stammzellen (ES) R1 (Passage ≥ 9) wurden von Prof. Dr. Nagy, Mount Sinai Hospital (Toronto, Canada) zur Verfügung gestellt.

6.1.10 NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE KULTUR VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN

a) BEZUGSQUELLEN

Substanz	Firma	Katalognummer
10x Trypsin/EDTA	Invitrogen	15400-054
2-Mercaptoethanol	Sigma	M7522
DMEM mit Glutamax	Invitrogen	31966-021
DMSO	Sigma	D2650
Doxycyclin	BD Biosciences	631311
PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Invitrogen	14190-094
PBS ohne NaHCO_3	Invitrogen	14040-091
FCS für ES-Zellen	Biochrom	S 0115, LotNr.: 437 A
FCS für ES-Zellen	Invitrogen	10437028; LotNr.: 1016785
Ganciclovir (Cymeven [®])	Roche	PZN 3851388
Geneticin (G418)	Invitrogen	10131-019
HEPES	Invitrogen	15630-056
LIF (Leukemia Inhibitory factor)	Chemicon	ESG1107
MEM NEAA (Non essential amino acids)	Invitrogen	11140-035
PenStrep	Invitrogen	15140-122
In TE-Puffer äquilibriertes Phenol	Roth	0038.1
Trichlormethan/Chloroform	Roth	3313.4

b) HERSTELLUNG DER ZELLKULTURMEDIEN:

▪ **Feeder-Medium**

(wird nur bei der Präparation der Feederzellen verwendet)

	Endkonzentration
450 ml DMEM mit Glutamax	
50 ml FCS	10 %

▪ **EF-Medium**

(zur Inkulturnahme von Feederzellen)

	Endkonzentration
450 ml DMEM mit Glutamax	
50 ml FCS	10 %
5 ml MEM NEAA	1 x (0,1 mM)

▪ ESL-Medium

(für Kultivierung von embryonalen Stammzellen)

		Endkonzentration
450 ml	DMEM mit Glutamax	
100 ml	FCS	20 %
5 ml	MEM NEAA	1 x (0,1 mM)
1 ml	LIF-Stammlösung (5×10^5 U/ml)	1000 U/ml
3,5 µl	β – Mercaptoethanol	0,1 mM

Für das EF-Medium und das ESL-Medium wurden FCS-Chargen verwendet, die zuvor auf ES-Zell-Verträglichkeit getestet worden waren (Firma und Chargen siehe 6.1.10 a). Die jeweils verwendete FCS-Charge ist im Ergebnisteil aufgeführt.

▪ ESL/ HEPES/P-S: (für Transport der ES-Zellen)

		Endkonzentration:
19,5 ml	ESL-Medium	
0,4 ml	1 M HEPES	20 mM
0,1 ml	PenStrep (10.000 U/ml)	50U und 50 µg/ml

▪ ES-Einfriermedium

Einfriermedium für embryonale Stammzellen

80 % (v/v) ESL-Medium

20 % (v/v) DMSO

▪ EF-Einfriermedium

Einfriermedium für Feederzellen

80 % (v/v) EF-Medium

20 % (v/v) DMSO

▪ Doxycyclin Medium

ESL Medium mit 10 ng/ml Doxycyclin

▪ G 418-Selektionsmedium

ESL Medium mit 250 - 350 µg/ml Geneticin (G418).

Zu 500 ml ESL Medium werden 2,5 ml (für 250 µg/ml) bzw. 3,5 ml (für 350 µg/ml) Geneticin hinzugefügt.

▪ Ganciclovir-G418-Selektionsmedium

G418-Selektionsmedium mit 2 µM Ganciclovir.

Zu 500 ml G418-Selektionsmedium werden 100 µl 10 mM Ganciclovir-Gebrauchslösung gegeben.

c) SONSTIGES

▪ **FCS hitzeinaktivieren**

Für alle Medien wird ausschließlich hitzeinaktiviertes FCS verwendet.
FCS für 20 min auf 56°C erhitzen. Aliquots zu 50 ml bei -20°C einfrieren.

▪ **10 mM Ganciclovir-Gebrauchslösung:**

- 543 mg Ganciclovir-Natrium werden in 9,4 ml H₂O gelöst (-> 0,2 M).
- Von dieser 0,2 M Stammlösung werden 50 µl in einem Eppendorfgemäß mit 950 µl H₂O vermischt (-> 10 mM).
- Von dieser 10 mM Gebrauchslösung werden Aliquots zu 100µl bei -20°C eingefroren.

▪ **LIF-Stammlösung ansetzen**

		Endkonzentration
1 ml (10 ⁷ U)	LIF	5 x 10 ⁵ U/ml
19 ml	ES-Medium (400 ml DMEM, 100 ml FCS, 3,5 µl β-Mercaptoethanol)	

Aliquots zu 1 ml bei 4 °C lagern.

▪ **PBS ohne NaHCO₃**

	Konzentration (mg/l)	Konzentration (mM)
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	100	0,9
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	100	0,49
Kaliumchlorid (KCl)	200	2,67
Kalium-dihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	200	1,47
Natriumchlorid (NaCl)	8000	137,93
Dinatrium-monohydrogenphosphat (Na ₂ PO ₄ x 7H ₂ O)	2160	8,06

▪ **PBS ohne Ca²⁺ /Mg²⁺**

	Konzentration (mg/l)	Konzentration (mM)
Kaliumchlorid (KCl)	200	2,67
Kalium-dihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	200	1,47
Natriumchlorid (NaCl)	8000	137,93
Dinatrium-monohydrogenphosphat (Na ₂ PO ₄ x 7H ₂ O)	2160	8,06

▪ **PBS ohne Ca²⁺ /Mg²⁺ + EDTA**

		Endkonzentration
500 ml	PBS ohne Ca/Mg	
200 µl	EDTA 0,5 M pH 8,0	0,2 mM

▪ PenStrep	Konzentration
PenicillinG-Natrium	10 000 U/ml
Streptomycin-sulfat	10 000 µg/ml
NaCl	8,5 mg/ml

▪ Phenol/Chloroform-Gemisch

Dazu werden gleiche Volumina von in TE-Puffer gelöstem Phenol und Chloroform/Trichlormethan gemischt. Das Gemisch wird bei -20°C gelagert.

▪ 1 x Trypsin ansetzen	Endkonzentration
5 ml 10 x Trypsin/EDTA	1 x
(5 g/l Trypsin; 5.3 mM EDTA)	(0,5 g/l Trypsin)
45 ml PBS ohne Ca/Mg + EDTA	

6.2 METHODEN FÜR DIE MOLEKULARBIOLOGISCHEN EXPERIMENTE

Die folgenden Methoden orientieren sich an den Protokollen von (Sambrook, 2001).

6.2.1 KULTURBEDINGUNGEN FÜR BAKTERIEN

Transformierte Bakterien werden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz unter zu Hilfenahme eines Trigalski-Spatels verteilt und dann 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Von diesen Platten werden einzelne Klone mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in Glasröhrchen mit 5 ml LB-Medium und Antibiotikazusatz überführt und in einem Schüttelinkubator 16 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach analytischer Isolierung von Plasmid-DNS werden von den Klonen die das gewünschte Plasmid enthalten 500 µl in einen Erlenmeyerkolben mit 400 ml LB-Medium und Antibiotikazusatz überführt und in einem Schüttelinkubator 16 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

6.2.2 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN

Unter kompetenten Bakterien versteht man Bakterien in die - aufgrund einer chemischen Vorbehandlung - das Einschleusen von fremder DNS, zum Beispiel von Plasmiden, erleichtert erfolgt. Für die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurde ein Protokoll von (Chung et al., 1989) verwendet. Hierzu wird von dem gewünschten Bakterienstamm ein fraktionierter Ausstrich hergestellt, von diesem wird dann eine einzelne Kolonie in ein Röhrchen mit 5 ml LB-Medium überführt und für 16 Stunden bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Von dieser Kultur wird 1 ml in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD_{600nm} von 0,35 – 0,4 bei 37 °C unter schütteln inkubiert. Die Bakterien werden durch Zentrifugieren bei 4 °C und 4500 x g für 15 Minuten sedimentiert, der Überstand wird verworfen und das Zellpellett in 15 ml eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird dann in Portionen von 300 µl in

eiskalte Eppendorfgläser pipettiert und durch Übergießen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu ihrer Verwendung werden die Bakterien bei -80 °C gelagert. Zur Bestimmung der Kompetenz, also der Anzahl Kolonien je µg eingesetzter DNS, wird eine Aliquot kompetenter Bakterienzellen mit 50 ng des Plasmids pUC18 transformiert. Von dem Transformationsansatz werden jeweils zweimal 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen auf LB-Agar/Ampicillin Platten ausplattiert. Am nächsten Morgen werden die Kolonien ausgezählt, die Kompetenz berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Transformanden}}{\mu\text{gDNS}} = n(\text{Kolonien}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{\text{Gesamtvolumen}}{\text{ausplattiertes Volumen}} \times \frac{1}{\text{eingesetzte DNS in } \mu\text{g}}$$

Formel 6-1 Berechnung der Kompetenz

Um die Bakterien für Transformationen von Ligationsansätzen verwenden zu können sollte die Kompetenz mindestens zwischen 10^6 und 10^7 liegen.

6.2.3 TRANSFORMATION VON PLASMID DNS IN KOMPETENTE BAKTERIENZELLEN

Um fremde DNS in kompetente Bakterien einzuschleusen wurde das von Chung und Mitarbeitern (Chung et al., 1989) entwickelte Protokoll verwendet bei dem die Bakterien einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt werden. Anschließend lässt man die Bakterien eine kurze Zeit ohne Antibiotika wachsen um sie dann auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum auszuplattieren. Die Effizienz der Transformation ist bei Ligationsansätzen viel geringer als bei intakten Plasmiden, außerdem verringert sich die Effizienz mit der Größe der einzuschleusenden DNS.

- Ein Aliquot kompetente Bakterien mit dem gesamten Ligationsansatz oder 10 ng geschlossenem Plasmid mischen.
- 30 Min auf Eis inkubieren.
- 2 Minuten bei 42 °C inkubieren.
- 900 µl LB-Medium dazugeben und 1-2 Stunden bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubieren.
- Von dem Transformationsansatz 200 µl ausplattieren.
- Die restliche Bakteriensuspension durch 2 minütige Zentrifugation bei 3500 rpm in einer Tischzentrifuge pelletieren, das Pellet in wenig LB-Medium resuspendieren und ebenfalls ausplattieren.

6.2.4 ISOLIERUNG VON PLASMID DNS AUS BAKTERIEN

6.2.4.1 ANALYTISCHE ISOLIERUNG VON PLASMID DNS

Um nach der Transformation eines Ligationsansatzes in Bakterien Klone mit dem gewünschten Plasmid zu identifizieren wird zunächst von einer größeren Anzahl Bakterienklonen, in der Regel von 24, eine analytische Isolierung von Plasmid-DNS durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, dass man in kurzer Zeit die Plasmid-DNS vieler Klone isolieren kann. Der Nachteil ist, dass die DNS noch zahlreiche Verunreinigungen enthält und daher nicht für empfindlichere Methoden, beispielsweise für Sequenzierungen, eingesetzt werden kann. Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll beruht auf der von Holmes und Quigley (Holmes and Quigley, 1981) entwickelten ‚Boiling method‘. Dabei werden

die Bakterien in einem Puffer resuspendiert der Detergens und Lysozym enthält und so die Bakterienzellwände aufschließt. Durch einen Hitzeschock werden die Proteine und die genomische DNS denaturiert, sie können anschließend durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die im Überstand bleibende Plasmid-DNS wird durch Zugabe von Isopropanol gefällt und Salzreste mit 70% Ethanol entfernt.

- In Röhrchen mit 5 ml LB-Medium das entsprechende Antibiotikum geben und Bakterienkulturen mit sterilen Zahnstochern überimpfen.
- Am nächsten Morgen das Pellet von 1,5 ml Bakterienkultur in 300 µl STET-L resuspendieren und 5 Minuten auf Eis inkubieren.
- 1 Minute auf 95 °C erhitzen.
- 15 Minuten bei maximaler Drehzahl in der Tischzentrifuge zentrifugieren, das Protein/genomische DNS enthaltende Sediment mit einem sterilen Zahnstocher entfernen.
- 300 µl Isopropanol zugeben, gut mischen und 30 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugieren.
- Überstand abkippen, 500 µl 70% Ethanol auf das Plasmid-DNS Pellet geben und 15 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugieren.
- Pellet trocknen und in 50 µl RNS-Nuklease-Lösung lösen.
- Die so erhaltene Plasmid-DNS wird mit Hilfe eines Restriktionsschnittes kontrolliert. Dazu wird ein Restriktionsenzym gewählt, das eindeutig die gewünschten Plasmidfragmente ergibt. Die DNS-Fragmente werden anschließend mit einem Agarosegel oder einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

6.2.4.2 PRÄPARATIVE PLASMID-ISOLIERUNG NACH IDENTIFIZIERUNG DES GEWÜNSCHTEN DNS-KLONS

Nach analytischer Isolierung von Plasmid DNS wurde eine 400 ml Übernachtskultur mit 500 µl der ursprünglichen Kultur angeimpft und für 16 Stunden bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die anschließende Aufreinigung der Plasmid-DNS erfolgte mit dem ‚Qiagen Plasmid Kit‘ nach Anweisung des Herstellers. Bei dieser von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) entwickelten Methode werden die Bakterien zunächst durch einen alkalischen, Detergens enthaltenden Puffer lysiert. Dabei kommt es zum Freisetzen des Zellinhalts und Proteine, chromosomale DNS und Plasmid-DNS werden denaturiert. Durch anschließende Zugabe von Kaliumacetatlösung fällt das unlösliche Kaliumsalz von Dodecylsulfat zusammen mit denaturierten Proteinen, chromosomaler DNS und Zellwandbestandteilen aus. Die kleinere zirkuläre Plasmid-DNS bleibt dagegen nach Zentrifugation im Überstand. Sie wird anschließend über eine Anionenaustauscher-Säule von weiteren Verunreinigungen abgetrennt, präzipitiert, gewaschen und in TE-Puffer resuspendiert; sie kann für alle molekularbiologischen Anwendungen benutzt werden.

6.2.4.3 PRÄPARATIVE BAC-PLASMID-ISOLIERUNG

Bacterial Artificial Chromosomes oder BAC Plasmide, basieren auf den F-Faktoren, den natürlich vorkommenden Sexfaktor-Plasmiden von E.coli. Sie können Fragmente von bis zu 300 kb Länge aufnehmen und sind deshalb besonders gut zur Herstellung von genomischen DNS-Banken geeignet. Sie wurden in dieser Arbeit mit dem Qiagen Plasmid Kit unter Anwendung des Very Low-Copy Plasmid Protokolls aufgereinigt, das Prinzip der Aufreinigung entspricht dem unter 6.2.4.3 (Präparative Plasmid Isolierung) beschriebenen.

6.2.5 REINIGUNG VON PLASMID-DNS UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNS

6.2.5.1 DIE ALKOHOLFÄLLUNG

DNS ist aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppe leicht löslich in wässrigen Lösungsmitteln, dagegen nur schlecht in organischen Lösungsmitteln wie Ethanol und Isopropanol, insbesondere nach Zugabe von einwertigen Ionen. Um Plasmid-DNS zu konzentrieren, wird wässrige DNS-Lösung mit einer Natriumchlorid-Lösung bis zu einer Konzentration von 0,2 M NaCl versetzt. Die Na⁺-Ionen neutralisieren die negativ geladenen Gruppen der DNS, so dass sich die DNS-Moleküle nicht mehr abstoßen und weniger gut löslich werden. Nach sorgfältigem Mischen wird dann das 2,5-fache Volumen an reinem Ethanol zugesetzt so dass die Endkonzentration von Ethanol 70% beträgt. Ethanol entzieht der DNS Wasser, wodurch ihre Löslichkeit weiter abnimmt und sie ausfällt. Für die Fällung der DNS wird unvergällter Alkohol verwendet da Vergällungsmittel z.B. die weitere Analyse der DNS mit Enzymen stören. Danach kann die ausgefällte DNS bei Raumtemperatur abzentrifugiert werden. Das erhaltene DNS-Pellet wird anschließend mit 70% Ethanol gewaschen, um eventuell noch vorhandene Salze zu entfernen. Im Einzelnen wurde folgendermaßen verfahren:

- DNS-Lösung mit H₂O auf 400 µl auffüllen.
- 40 µl 5 M NaCl zugeben, gut mischen.
- 1100 µl 100 % Ethanol zugeben, gut mischen.
- 30 Minuten bei 12 000 g zentrifugieren.
- Überstand abkippen, 1000 µl 70% Ethanol auf das Pellet geben.
- 10 Minuten bei 12 000 g zentrifugieren.
- Überstand abkippen, Pellet über Kopf bei Raumtemperatur trocknen lassen, in geeignetem Volumen H₂O aufnehmen.

6.2.5.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNS MITTELS LICHTABSORPTION IM UV-BEREICH

Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der enthaltenen aromatischen Basen Licht der Wellenlänge von 260 nm. Zum Vermessen muss eine Quarzküvette verwendet werden, da Normalglas- oder Plastik-Küvetten Licht dieser Wellenlänge absorbieren. Die DNS Konzentration in der untersuchten Lösung ergibt sich nach $c = A_{260\text{nm}} \times V \times F$ wobei c für die DNS-Konzentration in µg/ml, $A_{260\text{nm}}$ für die

Absorption bei 260 nm, V für den Verdünnungsfaktor und F für 50 µg/ml (DNS) bzw. 40 µg/ml (RNS) steht. Dabei ist zu beachten dass entsprechend dem Lambert-Beerschen A_{260nm} zwischen 0,1 und 1 liegen muss, da nur in diesem Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Lichtabsorption besteht. Zusätzlich zur Konzentration kann man über die Lichtabsorption auch die Reinheit der DNS abschätzen. So absorbieren Proteine Licht der Wellenlänge 280 nm, DNS jedoch nicht im gleichen Ausmaß. Der Quotient A_{260}/A_{280} einer DNS-Lösung sollte also möglichst groß sein; bei einer guten Isolation liegt er zwischen 1,8 und 2,0, wobei diese Methode aber insgesamt wenig aussagekräftig ist.

6.2.5.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNS MITTELS AGAROSEGEL

Alternativ lässt sich die Konzentration von DNS-Fragmenten im Vergleich zu einer definierten Menge eines eingesetzten DNS-Größenmarkers mit Hilfe eines Agarosegels bestimmen. Dazu wird ein Aliquot des Größenmarkers so aufgetragen, dass sein 1000 bp Fragment einer Masse von 100 ng entspricht. Dann werden einige Verdünnungen der mit Restriktionsenzymen fragmentierten Plasmid-DNS aufgetragen und nach Anfärben mit Ethidiumbromid die Konzentration der DNS-Fragmente im Vergleich zur 1000 bp Markerbande abgeschätzt.

6.2.6 MODIFIKATION VON PLASMID-DNS MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Restriktionsendonuklasen wurden zum ersten Mal von Luria und Mitarbeitern Anfang der 1950er Jahre beschrieben (Bertani and Weigle, 1953). Sie entdeckten, dass es Endonukleasen gibt, die bakterieneigene von fremder DNS unterscheiden. Restriktionsendonukleasen erkennen in der Regel vier bis acht Basen lange, palindromische DNS-Sequenzen und schneiden die DNS innerhalb dieser Sequenz an einer definierten Stelle. Die einzelnen Enzyme haben unterschiedliche Anforderungen an pH, Salzkonzentration und Reaktionstemperatur. Die Konzentration der Enzyme wird in Units (U) pro ml angegeben. 1 Unit Enzym ist diejenige Menge an Enzym, die benötigt wird um 1 µg DNS in einer Stunde bei der angegebenen Temperatur, und im korrekten Puffer in einem 50 µl Ansatz vollständig zu schneiden. Da die Enzyme in 50% Glycerol gelöst sind, Glycerol aber in Konzentrationen $\geq 5\%$ die Aktivität der Enzyme hemmt, muss darauf geachtet werden, dass der Anteil der Enzymlösung $< 5\%$ des Gesamtvolumens der Reaktion ist. Nach der enzymatischen Reaktion werden die resultierenden DNS-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Um nach einer analytischen Plasmid-Isolierung die erhaltene DNS zu überprüfen, wurde folgendes Protokoll verwendet:

- 2,5 µl DNS,
- 0,5 µl Enzym,
- 2,0 µl 10 x Puffer,
- 2,0 µl 10 x BSA (falls notwendig),
- mit H₂O auf 20 µl auffüllen. 1 Stunde bei optimaler Temperatur inkubieren.

Um im präparativen Maßstab DNS-Fragmente aus einem DNS-Klon freizusetzen oder um Plasmid-DNS zu linearisieren wurde folgendes Protokoll verwendet:

1000 fmol DNS,
2 U Enzym pro 1000 fmol DNS,
doppeltes Enzymvolumen an 10 x Puffer,
doppeltes Enzymvolumen an 10 x BSA (falls notwendig),
mit H₂O auf das zwanzigfache Enzymvolumen auffüllen. 3 Stunden bei optimaler Temperatur inkubieren.

6.2.7 MODIFIKATION VON PLASMID-DNS MIT ANDEREN ENZYMEN

6.2.7.1 ENTFERNEN VON 5'- ODER 3'- ÜBERHÄNGENDEN ENDEN

Wenn ein DNS-Fragment in ein Plasmid ligiert werden soll, jedoch keine geeigneten Restriktionsenzymstellen vorhanden sind, können beide DNS-Fragmente - das Plasmid und das in Frage kommende Fragment - zunächst mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten werden. Die möglicherweise 5'- und 3'- Überhänge können im nächsten Schritt entfernt werden und die resultierenden, so genannten blunt-end-Fragmente anschließend – freilich mit geringer Effizienz – ligiert werden. Um die 5'- und 3'- Überhänge zu entfernen, inkubiert man das DNS-Fragment mit T4 DNS-Polymerase, T4 Polynukleotidkinase, Nukleotide und Puffer für 20 Minuten bei 37 °C. Da die T4 DNS-Polymerase von 3' nach 5' den DNS-Strang verlängert werden die komplementären Stränge von 5'-Überhängen aufgefüllt. 3'-Überhänge werden durch ihre 3'-5' Exonukleaseaktivität entfernt. Die T4-Polynukleotidkinase dient dazu, die DNS-Enden zu phosphorylieren, Voraussetzung dafür, dass das Fragment anschließend ligiert werden kann. Anschließend werden die Enzyme durch kurzes inkubieren bei 72 °C inaktiviert. Folgendes Protokoll wurde in dieser Arbeit verwendet:

- Die DNS (maximal 500 fmol) wird in 22,75 µl H₂O resuspendiert.
 - 22,75 µl DNS-Lösung,
 - 1,25 µl dNTPs (1,25 mM),
 - 2 µl T4 PNK (10U/µl),
 - 1 µl T4 DNS-Polymerase (1 U/µl),
 - 3 µl 10 x Ligasepuffer
- werden vermischt und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert.
- Anschließend wird der Reaktionsansatz 10 Minuten bei 72 °C inkubiert, um die Enzyme zu inaktivieren.

6.2.7.2 DEPHOSPHORYLIEREN VON PLASMID-DNS

Wenn man den Vektor mit nur einem Restriktionsenzym schneidet, entstehen kompatible Enden. Diese konkurrieren bei der Ligation mit den Enden des gewünschten DNS-Fragments. Um dies zu verhindern muss der Vektor vor der Ligation dephosphoryliert werden. Da die Verknüpfung von zwei Nukleotiden immer von 3'-Desoxyribose auf 5'-Phosphat erfolgt, kann der Vektor sich nach der Entfernung seiner 5'-terminalen Phosphatgruppen nicht mehr mit sich selbst verbinden sondern nur

noch mit dem zu inserierendem DNS-Fragment. Dazu wird die Plasmid-DNS mit Alkalischer Phosphatase bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase muss anschließend vollständig entfernt werden, da sie anderenfalls während der Ligierung auch das zu inserierende Fragment dephosphorylieren würde. Der Reaktionsansatz bzw. die DNS wurde deshalb nach der Dephosphorylierung über ein Agarosegel gereinigt. Die Dephosphorylierungsreaktion lief wie folgt ab:

35 µl in H₂O resuspendierte und geschnittene DNS (maximal 500 fmol),
 4,0 µl 10 x alkalischer Puffer,
 1,0 µl Alkalische Phosphatase.

- 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.
- Zugabe von weiteren 0,5 µl Alkalischer Phosphatase.
- 15 Minuten bei 37°C inkubieren.
- Danach die DNS des Reaktionsansatz wie in (6.2.9) beschrieben über ein Agarosegel reinigen.

6.2.8 GELELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG UND NACHWEIS VON DNS

Bei der Gelelektrophorese werden geladene Teilchen nach Auftragen auf eine Trägersubstanz in einem elektrischen Feld aufgetrennt, die Trennung erfolgt also aufgrund der elektrischen Ladung und aufgrund der Größe der zu trennenden Moleküle. DNS ist aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladen, so dass eine Trennung linearisierter DNS-Fragmente allein nach der Größe erfolgt. Zum Auftrennen und Nachweis von DNS-Fragmenten werden als Trägersubstanzen Agarosegele oder Polyacrylamidgele eingesetzt. Der Elektrophoresepuffer dient als Leitmedium und stabilisiert den pH-Wert. Es wurde 1 x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer pH 8 verwendet, da dieser Puffer eine hohe Pufferkapazität besitzt und damit eine schnelle Elektrophorese erlaubt. DNS wandert bei pH 8 zur Anode. Zum Sichtbarmachen von DNS wird Ethidiumbromid verwendet. Ethidiumbromid adsorbiert aufgrund seines delokalisierten π -Elektronensystems - das Grundgerüst ist das trizyklische Phenantren - UV-Licht der Wellenlängen 302 und 366 nm. Die Energie wird als Fluoreszenz im rot-orange Bereich des sichtbaren Lichtes abgegeben. Aufgrund seiner planaren Struktur inseriert Ethidiumbromid in die DNS-Doppelhelix, es liegt waagrecht zwischen den Basen der beiden DNS-Stränge und bildet van-der-Waals Bindungen mit diesen aus. Wegen der großen Nähe des Ethidiumbromid-Ringsystems zu den Basen kann das von den Basen adsorbierte UV-Licht der Wellenlänge 254 nm nach bathochromer Verschiebung an Ethidiumbromid abgegeben werden, dadurch vergrößert sich die Fluoreszenzstrahlung erheblich und die DNS wird sichtbar. Ethidiumbromid kann auch zur Detektion von RNS und einzelsträngiger DNS verwendet werden. Hier wird das Interkalieren dadurch erklärt dass sich durch intramolekulare Wechselwirkungen helikale Regionen bilden. Die so sichtbar gemachte DNS kann mit einer geeigneten Kamera fotografiert werden. Bevor die DNS-Probe auf das Gel aufgetragen wird, wird sie mit dem 0,1 fachen

Probenvolumen an 10 x Ladepuffer versetzt; dieser enthält Glycerol zur Erhöhung der spezifischen Dichte, sowie Farbstoffe um die Laufweite der DNS im Gel abschätzen zu können.

Agarosegele

Für DNS-Fragmente mit einer Länge von mehr als 1 kb wurden Agarosegele verwendet; je nach erwarteter Fragmentlänge wurden 1,2 bis 0,6% (w/v) Gele gegossen. Die Agarose wird hierzu in 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst, auf 55 °C abgekühlt und nach Zugabe von 10 µg Ethidiumbromid /100ml in eine Horizontalkammer mit Platzhalter für die Probentaschen gegossen. Nach Aushärten des Gels wird es in eine Elektrophoresekammer mit 1 x TBE gelegt. Die Proben werden mit dem 0,1-fachen Volumen an 10 x Gelladepuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Dann erfolgt die elektrophoretische Auftrennung bei ca. 10V/cm Gellänge.

Polyacrylamidgele

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten die kleiner als 1000 bp sind wurden Polyacrylamid-Gele verwendet. Diese werden durch Polymerisierung von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Um die Polymerisierung zu starten gibt man zu den Monomeren den Radikalbildner Ammoniumperoxydisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethyl-diamin (TEMED). TEMED reduziert APS, das dadurch Radikale freisetzt und die Polymerisierung in Gang setzt. Da Ethidiumbromid die Polymerisierung des Acrylamids inhibiert wird das Gel erst nach Beendigung der Elektrophorese gefärbt. Es wurden 6 %ige Gele verwendet:

22 ml	H ₂ O
5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid
3 ml	10x TBE
35 µl	TEMED
80 µl	30% APS

Sofort nach dem Mischen wird die Lösung zwischen zwei Glasplatten gegossen und das Ende der Polymerisierung abgewartet. Das Auftragen der Probe und die Elektrophorese erfolgt entsprechend der Verfahrensweise für Agarosegele. Nach vollendeter Auftrennung wird das Gel für 5 Minuten in eine 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung gelegt, kurz mit Wasser ab gespült und photographiert.

6.2.9 ISOLIERUNG EINZELNER DNS-FRAGMENTE

Mit Hilfe der Gelelektrophorese kann man DNS-Fragmente trennen; man kann aber auch die DNS von Proteinverunreinigungen und Enzymen z.B. nach einem Restriktionsschnitt befreien. Die Isolierung einzelner DNS-Fragmente wird mit der gleichen Methode bei Agarosegelen und Polyacrylamidgelen durchgeführt. Dazu wird das Gel auf eine UV-Lichtplatte gelegt und das gewünschte DNS-Fragment mit einem Skalpell herausgeschnitten. Das Gelstück wird dann in einen 3 cm langen Dialyseschlauch gelegt, der Schlauch mit 1 x TBE gefüllt und mit einer zweiten Klammer

luftblasenfrei verschlossen. Danach wird der Dialyseschlauch in eine mit 1 x TBE gefüllte Elektroelutionskammer gelegt und die DNS bei 4 °C und 135 mA für 30 Minuten aus dem Gel eluiert.

6.2.10 AMPLIFIZIERUNG VON DNS MIT HILFE DER POLYMERASEKETTENREAKTION

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis and Faloona, 1987) dient dazu ein bestimmtes DNS-Fragment enzymatisch zu vervielfältigen. Dies ist zum Beispiel notwendig um aus der genomischen DNS ein bestimmtes DNS-Fragment zu erhalten. Um eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchzuführen werden in einem 0,2 ml Eppendorffgefäß folgende Komponenten gemischt:

		Endkonzentration
	Matrizen-DNS	100.000 Moleküle ($0,17 \times 10^{-3}$ fmol)
2,5 µl	Oligonukleotidprimer 1 (10 pmol/µl)	0,5 pmol/µl
2,5 µl	Oligonukleotidprimer 2 (10 pmol/µl)	0,5 pmol/µl
5 µl	10 x Puffer	1 x
1 µl	dNTPs (10 mM)	0,2 mM
1 µl	Polymerase	2 U
Auf 50 µl	mit H ₂ O auffüllen	

Matrizen-DNS

Diese DNS dient als Matrize für die Amplifikation - theoretisch ist hiervon nur ein Molekül notwendig, doch wurden als Richtwert etwa 100.000 Moleküle eingesetzt, dies entspricht in etwa 1 pg eines DNS Plasmids von 10 000 bp. In der Regel wurde die optimale Menge durch Versuchsreihen mit steigender DNS-Menge ermittelt.

Oligodesoxynukleotidprimer

Die Oligonukleotidprimer sind so gewählt, dass sie die zu amplifizierende Sequenz flankieren. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 6-1 aufgeführt. Sie sind in der Regel so ausgewählt dass sie einen Guanin/Cytosin-Gehalt von mindestens 60% besitzen und ihre Schmelztemperaturen zwischen 58 und 64 °C liegen.

dNTPs

Es wurde ein Mix aus äquimolaren Mengen von dATP, TTP, dCTP und dGTP verwendet.

10 x PCR-Puffer

Der Puffer enthält Magnesiumionen, die für die Funktionsfähigkeit der Polymerase benötigt werden, und Puffer, um den pH-Wert konstant zu halten. Wenn gekaufte Polymerasen verwendet wurden, wurde der mitgelieferte Puffer verwendet, ansonsten ein Standard PCR-Puffer.

Polymerase

Thermostabile DNS-Polymerasen werden aus thermophilen Archaeobakterien gewonnen. Der älteste bekannte Vertreter ist die Taq-Polymerase. Sie wurde in unserem Labor nach dem Protokoll von

(Engelke et al., 1990) rekombinant hergestellt. Der Vorteil der Taq-Polymerase liegt in ihrer hohen Prozessivität und ihrem geringen Preis, deshalb wird sie für die häufig durchzuführende Genotypisierung von Mäusen verwendet sowie für DNS Amplifizierungen bei denen mit anderen Polymerasen kein Produkt erhalten wurde. Ihr Nachteil liegt in der relativ hohen Fehlerrate von mindestens einem Fehler pro 1000 eingebauten Basen, weshalb sie sich für die Amplifikation der Targetingkonstrukte (s.u.) nicht eignet. Bei der Herstellung der so genannten Targetingkonstrukte muss die verwendete DNS fehlerfrei sein, weshalb zur Amplifizierung solcher DNS die Pfu-Polymerase verwendet wurde. Sie macht praktisch keine Fehler, benötigt aber größere Mengen an Matrize, weshalb es oft schwierig ist aus genomischer DNS Teilfragmente zu amplifizieren.

Amplifizierungs-Protokoll:

94 °C	Denaturieren	2 Minuten	} 30 bis 40 Zyklen
94 °C	Denaturieren	30 Sekunden	
55°C-65°C	Annealen	45 Sekunden	
72°C (Taq)	Elongation	1 Minute pro 1000 bp (Taq)	
bzw. 68°C (Pfu)		bzw. 1,5 Minuten pro 1000 bp (Pfu)	
72°C (Taq) bzw. 68°C (Pfu)	Elongation	10 Minuten	

Beim ‚Denaturieren‘ werden die DNS-Doppelstränge voneinander getrennt. Beim anschließenden ‚Annealen‘ lagern sich die Oligodesoxynukleotidprimer an die komplementären Sequenzen an. Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer: Je weiter sie unter der jeweiligen Schmelztemperatur liegt, desto wahrscheinlicher wird es, dass der Primer sich an DNS-Bereiche anlagert, die nicht exakt komplementär zu seiner Sequenz sind. Bei der ‚Elongation‘ verlängert die DNS-Polymerase ausgehend von dem Oligonukleotidprimer eine zur Matrize komplementäre Sequenz. Die Abfolge Denaturieren-Annealen-Elongation wird 30- bis 40-mal wiederholt. damit ist es möglich einen DNS-Abschnitt auf einem einzigen Matrizenmolekül bis zu 4 Milliarden-fach (d.h. 2^{32} -fach bei 32 Zyklen) zu amplifizieren.

6.2.11 EINFÜGEN VON GEZIELTEN PUNKTMUTATIONEN IN DNS

Zum Einfügen von Punktmutationen wurde die von (Weiner et al., 1994) entwickelte Variante der ‚site-directed-mutagenesis‘ verwendet. Bei diesem Protokoll werden 2 zueinander komplementäre Primer, die beide die gewünschte Mutation tragen, benötigt, außerdem die zu mutierende Plasmid-DNS, dNTPs, Puffer und Pfu-Polymerase. Man führt eine PCR-Reaktion durch und verdaut das Produkt anschließend mit DpnI, einem Restriktionsenzym, das spezifisch methylierte DNS schneidet. Der für das Gewinnen der Plasmid-DNS verwendete Bakterienstamm, XL-1 Blue, besitzen das dam-

Methylierungssystem. Die Substrat-DNS ist also im Gegenteil zu der *in vitro* synthetisierten, mutierten DNS methyliert und wird degradiert. 20 µl des mit DpnI inkubierte Reaktionsansatzes werden dann in Bakterien transformiert. Am nächsten Tag können mit den erhaltenen Kolonien Übernachtskulturen angeimpft werden. Diese werden dann mit einem geeigneten Restriktionsschnitt auf das Vorhandensein des Plasmids überprüft. Das erhaltene Plasmid muss vor weiterer Verwendung auf das Vorhandensein der Mutation und die Abwesenheit von PCR-Fehlern überprüft werden, in der Regel durch Sequenzierung. Zum Einführen der D541A Punktmutation in den Vektor pmCaTL_48 wurde folgendermaßen verfahren:

Reaktionsgemisch:

		Endkonzentration
50 ng (15 fmol)	pmCaTL_48	50 ng/µl
2,5 µl	mcat129 (10 pmol/µl)	0,5 pmol/µl
2,5 µl	mcat130 (10 pmol/µl)	0,5 pmol/µl
5 µl	10 x Pfu Puffer	1 x
1 µl	dNTPs (10 mM)	0,2 mM
1 µl	Pfu Polymerase	2 U
Auf 50 µl mit	H ₂ O auffüllen	

Amplifizierungs-Protokoll:

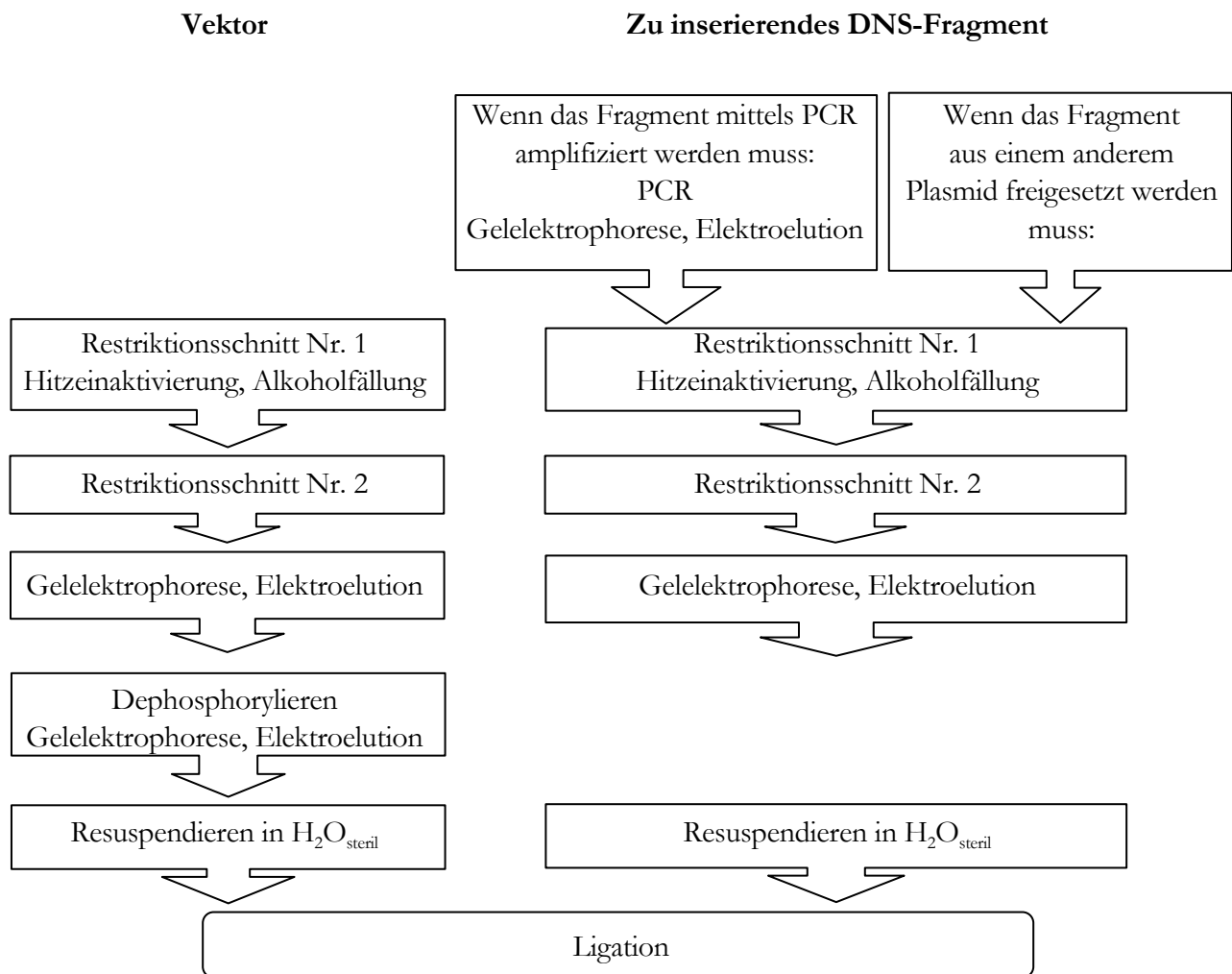
94 °C	Denaturieren	2 Minuten	} 40 Zyklen
94 °C	Denaturieren	30 Sekunden	
72 °C	Annealen	30 Sekunden	
68 °C	Elongation	8 Minuten	
68°C	Elongation	10 Minuten	

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wird 1 µl DpnI (20 U/µl) zugegeben und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach werden 20 µl des Reaktionsgemisches in XL-1 blue Bakterien transformiert.

6.2.12 HERSTELLUNG REKOMBINANTER PLASMIDE DURCH LIGATION

Unter der Herstellung rekombinanter Plasmide, dem Klonieren, versteht man die Einführung eines DNS-Fragmentes in ein Plasmid und dessen anschließende Vermehrung in Bakterien. Dadurch ist das DNS-Fragment in unbegrenzter Menge herstellbar. Ein Plasmid ist ein extrachromosomales DNS-Molekül. Seine Größe variiert von 1 kb bis zu 200 kb; Plasmide sind in der Regel doppelsträngig und zirkulär geschlossen. Plasmide kommen in den meisten Bakterien vor, oft kodieren sie für akzessorische Gene. Sie replizieren unabhängig vom bakteriellen Chromosom und werden auch unabhängig davon vererbt. Oft enthalten Plasmide Gene, die für Enzyme codieren, die ihrem bakteriellen Wirt Selektionsvorteile bringen, indem sie zum Beispiel Resistenz gegen Antibiotika vermitteln, Degradierung organischer Substanzen ermöglichen oder Toxine produzieren. Aufgrund ihrer Fähigkeit, sich unabhängig vom chromosomalen Genom zu vermehren, und ihrer relativ kleinen Größe werden Plasmide in der Molekularbiologie dazu verwendet, bestimmte DNS-Sequenzen in

Form rekombinanter Plasmide herzustellen. Dafür verwendete Plasmide bestehen mindestens aus folgenden Bestandteilen: Einem Selektionsmarker, einem Replikationsstart, dem origin of replication oder ori, und einer Klonierungsstelle. Die Klonierungsstelle ist ein DNS-Fragment mit einer dichten Abfolge von Erkennungssequenzen für eine Reihe von Restriktionsenzymen, die nur in diesem DNS-Fragment vorkommen, nicht aber in dem restlichen Plasmid. Zur Herstellung rekombinanter Plasmide wurde nach dem folgendem Schema vorgegangen:



Das zu inserierende DNS-Fragment wird mit dem Vektor mit Hilfe einer DNS-Ligase kovalent verbunden. Ligasen sind Enzyme, die die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 3'-Hydroxyl- und einer direkt benachbarten 5'-Phosphat-Gruppe katalysieren. Als Substrat kann sowohl DNS als auch RNS dienen, als Energielieferant ATP oder NAD⁺. Für alle hier gezeigten Experimente wurde die T4-Ligase verwendet, ein Enzym, das von dem Gen 30 des Bakteriophagen T4 kodiert wird und für eine optimale Aktivität ATP und 10 mM Mg²⁺ benötigt. Die Ligationen wurden bei 16°C über Nacht inkubiert, es wurde in der Regel das DNS-Fragment im dreifach molarem Überschuss zum Vektorfragment eingesetzt. Ein Ligationsansatz wird folgendermaßen zusammengesetzt:

25 fmol Vector,
 75 fmol Insert,
 2 µl 10 x Ligasepuffer,
 1 µl 4-DNS Ligase,
 mit H₂O auf 20 µl auffüllen, dann 16 Stunden bei 16 °C inkubieren.

Die Stoffmenge an DNS lässt sich mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$N(\text{mol}) = \frac{m(\text{g})}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot n}$$

wobei N die DNS-Menge in Mol, m die DNS-Menge in Gramm angibt und n die Anzahl der Basenpaare des in Frage kommenden DNS-Moleküls. 660 ist das durchschnittliche relative Molekulargewicht eines Basenpaares.

6.2.12.1 ERSTELLEN VON HILFSVEKTOREN DURCH AUSTAUCH DER MULTIPLEN

KLONIERUNGSSTELLE DES VEKTORS pBLUESCRIPT SK

Für einige Klonierungen wurden Abfolgen von Restriktionsenzym-Schnittstellen benötigt die in keinem käuflichen Klonierungsplasmid enthalten sind. Deshalb wurden auf pBluescript II SK basierende Hilfsvektoren konstruiert. Hierzu wurde die multiple Klonierungsstelle, auch MCS genannt, mit BssII entfernt und durch ein kurzes BssII-DNS-Fragment mit Schnittstellen für die benötigten Restriktionsenzyme ersetzt. Dazu wurden zwei komplementäre Oligodesoxynukleotide bei der Firma Operon bestellt welche die gewünschten Restriktionsschnittstellen enthielten, außerdem an den 3'- und 5'-Enden BssII-Überhänge besaßen und an dem 5'-Ende phosphoryliert waren.

- Oligodesoxynukleotide in Wasser zu 10 pmol/µl aufnehmen.
- Je 30µl der zu hybridisierenden Oligodesoxynukleotide mischen und für 5 Minuten auf 75°C erhitzen.
- Anschließend langsam auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Beim unterschreiten der Schmelztemperatur lagern sich die komplementären Einzelstränge zu einem Doppelstrang zusammen.
- 10 µl dieses Ansatzes mit 25 fmol des mit BssII geschnittenen und dephosphorylierten pBluescript ligieren.

6.2.13 SEQUENZIERUNG VON DNS

6.2.13.1 FLUORESCENZ-MARKIERTE SEQUENZIERUNG VON DNS – CYCLE SEQUENCING

Diese enzymatische Sequenzierungsmethode wurde ursprünglich von Sanger (Sanger et al., 1977) entwickelt. Dabei wird, ähnlich wie bei der PCR (6.2.10) die zu sequenzierende DNS denaturiert, mit einem Oligonukleotidprimer hybridisiert und dieser mit einer Polymerase verlängert. Zusätzlich zu den üblichen 2'-Desoxynucleotiden enthält der Ansatz auch noch eine gewisse Menge eines 2',3'-Didesoxynucleotids, dem die 3'-Hydroxygruppe, über die normalerweise die Phosphodiesterbindung zwischen zwei Basen gebildet wird, fehlt. Wird statt einem der dNTPs ein solches 2',3'-Didesoxynucleotid eingebaut, kann der Strang nicht weiter verlängert werden. Der Einbau erfolgt zufällig, es entstehen also unterschiedlich lange DNS-Stränge. Das Didesoxynucleotid, das eingesetzt

wird, entweder ddATP, ddCTP, ddGTP oder dTTP, bestimmt, mit welcher Base die neusynthetisierten DNS-Fragmente enden. Daher setzt man parallel vier Ansätze an mit jeweils einem ddNTP und trennt die so synthetisierten DNS-Fragmente über einem denaturierendem Acrylamidgel auf. Um die DNS-Fragmente sichtbar zu machen sind an die verwendeten Primer ein fluoreszierender Farbstoff (IRD400) kovalent gebunden. Die Proben werden auf einem Gel aufgetragen, das in eine Apparatur eingebaut wird in dem sich ein Laser befindet, der über das Gel läuft. Über den Laser wird der in das DNS-Fragment eingebaute Farbstoff zur Anregung gebracht; ein Detektor empfängt das ausgestrahlte Licht.

Sequenzreaktionsgemisch:

1 µg DNS
 2 µl Oligodesoxynukleotidprimer (1 pmol/µl)
 auf 18 µl mit H₂O auffüllen

In 4 verschiedenen Eppendorfgefäßen mischen:

1 µl Termination Mix (jeweils 3'-Desoxy- A, C, G, oder T)
 4 µl Sequenzreaktionsmix

Amplifizierungs-Protokoll:

94 °C	Denaturieren	3 Minuten	} 35 Zyklen
94 °C	Denaturieren	30 Sekunden	
T _{AN} *	Annealen	30 Sekunden	
72°C	Elongation	30 Sekunden	
72°C	Elongation	5 Minuten	

$$* T_{AN} = T_M + 5^{\circ}C$$

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wird zu jeder Sequenzreaktion 2 µl Auftragspuffer zugegeben. Der Auftragspuffer enthält Formamid, zur Denaturierung der DNS-Doppelstränge, Glycerin und einen roten Farbstoff. Vor dem Gießen des Gels wird die Polymerisierung gestartet:

Zu 50 ml Sequenzgellösung
 wird 17,5 µl TMED
 und 100 µl 30 % APS gegeben.

Das Gel wird zwischen zwei durch 0,25 mm dicke Abstandhalter getrennte Glasplatten gegossen. Zuletzt wird ein Platzhalter für das spätere Auftragen der Proben eingefügt. Nach beendeter Polymerisierung wird das Gel in den Sequenzierapparat eingebaut und die Sequenzreaktionen werden aufgetragen.

6.2.13.2 FLUORESZENZ-MARKIERTE SEQUENZIERUNG VON DNS - ABI

Diese Variante des Sequenzierens bedient sich einer Kapillarelektrophorese anstelle einer Plattengelelektrophorese; weiterhin sind die ddNTP nicht die Primer mit vier verschiedenen

Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Ein Vorteil gegenüber der Sequenzierung mit den fluoreszenzfarbstoffmarkierten Oligonuklotidprimern ist, dass die Sequenzreaktion mit allen vier ddNTP in einem Reaktionsgefäß durchgeführt wird. Ein weiterer, dass diese Methode besser als die vorhergehende erlaubt, Kompressionen in der zu analysierenden DNS-Sequenz aufzulösen. Nach Ende der Sequenzreaktion werden die nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten Nukleotide abgetrennt und anschließend die DNS durch Zugabe von Formamid denaturiert. Danach werden die Proben in den Sequenzierapparat gestellt und automatisch in eine mit Polyacrylamidgel gefüllte Kapillare aufgesogen. Dort werden die während der PCR-Reaktion synthetisierten DNS-Fragmente entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Die an die ddNTPs gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Anregung mit Laserlicht detektiert.

Sequenzreaktionsmix:

500 ng DNS
 1,5 µl Big Dye® (enthält die fluoreszenzmarkierten ddNTPs)
 1 µl Oligonukleotidprimer (10pmol/µl)
 auf 12 µl mit H₂O auffüllen

Amplifizierungs-Protokoll:

95 °C	Denaturieren	1 Minuten	} 35 Zyklen
95 °C	Denaturieren	10 Sekunden	
55°C	Annealen	2,5 Minuten	
	Elongation		
15°C	Stoppen	Unendlich	

Abtrennung der nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten ddNTPs über Sepharosesäulen:

Äquilibrieren der Sepharose:

96-Lochplatten mit Sepharose befüllen. Dann in jede der Sepharose-gefüllten Vertiefungen 300 µl H₂O_{HPLC} geben. 3 h bei Raumtemperatur inkubieren.

Reinigen der Sequenzreaktion:

- Sepharose-Platte zentrifugieren (5 min bei 910 g).
- Eluat verwerfen.
- In jede Vertiefung 150 µl H₂O_{HPLC} geben.
- Platte zentrifugieren (5 min bei 910 g)
- Eluat verwerfen.
- Neue PCR-Gefäße auf die passende Position stellen.
- In diese PCR-Gefäße je 8 µl HiDi-Formamid vorlegen.
- Sepharose-Platte mittels Halterung auf die PCR-Reagenzgefäße stellen
- Sequenzreaktion auf die äquilibrierte Sepharose geben.
- Platte zentrifugieren (5 min bei 910 g)
- Eluat auf Sequenzautomat geben oder bei 4 °C lagern.

6.2.14 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNS

Doppelsträngige DNS ist zwar chemisch stabil, kann aber leicht durch Scherkräfte, z.B. beim Pipettieren, in kleine Fragmente zerbrochen werden. Entsprechend sorgfältig ist vorzugehen um Fragmente >150 kb zu isolieren.

Bei der Isolierung der genomischen DNS wird die eukaryotische Zelle mit einem Puffer, der sich aus SDS, Proteinase K und EDTA zusammensetzt, inkubiert. SDS solubilisiert die Membran und denaturiert Proteine. Proteinase K dient zur Degradierung dieser Proteine. EDTA bindet die für die Aktivität der DNS-Nukleasen wichtigen divalenten Kationen. Anschließend wird die DNS durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels gefällt oder über Anionenaustauschersäulen aufgereinigt.

6.2.14.1 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNS AUS EMBRYONALEN STAMMZELLEN VON MAUS

Präparation genomischer DNS aus ES-Zellen, die auf 96 Loch Platte kultiviert wurden.

- Das DNeasy 96 Tissue Kit -

Die Präparation wurde entsprechend der Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dabei werden zunächst die Zellwände durch einen Proteinase K- und Detergens-haltigen Lysis-Puffer zerstört. Das Zelllysate wird dann mit Hilfe einer Mehrkanalpipette auf eine Silica-Gel-Membran gegeben. Die genomische DNS bindet an dieser Membran, alle anderen Zellbestandteile werden durch mehrmaliges Waschen mit verschiedenen Waschpuffern entfernt. Anschließend wird die gereinigte genomische DNS eluiert. Für die Analyse der DNS mit Hilfe der Southern-Blot Technik wurden jeweils 30 µl eines solchen Eluats (insgesamt 100 µl) anschließend mit einem Restriktionsenzym inkubiert.

- Die 'Flöckchen'-Methode -

Auch bei dieser Methode werden die ES-Zellen in der 96-Loch-Platte mit einem Detergens- und Proteinase K-haltigem Lysis-Puffer aufgeschlossen. Die genomische DNS wird dann durch Zugabe von Isopropanol ausgefällt und durch Kreisbewegungen als Flöckchen in der Mitte des Loches ankonzentriert. Danach wird das Flöckchen mit Hilfe einer Kanüle in ein Eppendorfgefäß überführt und die DNS gelöst.

- Auf jedes Loch einer 96 Lochplatte 150 µl Lysis-Puffer geben und 6-8 Stunden bei 37 °C inkubieren.
- 200 µl Isopropanol auf jedes Loch geben.
- Die Platte über Nacht im Kühlraum auf einen Kreis-Horizontalschüttler stellen. Die genomische DNS konzentriert sich als sichtbares weißes Flöckchen.
- Die so präparierte genomische DNS kann bei 4 °C gelagert werden.
- Um die genomische DNS zu lösen wird unter einem Stereomikroskop die DNS-Flocke mit einer Kanüle aufgewickelt und in ein Eppendorfgefäß gegeben.
- DNS 10 min bei 37 °C trocknen.

- DNS Flocke in 80 µl TE-Puffer lösen. Dazu das DNS-TE Gemisch mindestens 30 min bei 37 °C inkubieren, dazwischen mehrmals vorsichtig schütteln.
- Gelöste DNS bei 4 °C aufbewahren

Zur Analyse der DNS mit Hilfe der Southern Blot Technik wurden jeweils 30 µl der DNS-Lösung mit einem Restriktionsenzym inkubiert.

- Nach (Ramirez-Solis et al., 1992) -

Diese Präparationsmethode unterscheidet sich von dem vorherigen Protokoll darin, dass die genomische DNS nach dem Fällern mit Isopropanol in der Lochplatte belassen wird. Es folgen mehrere Waschschrirte und abschließend wird die DNS durch Zugabe von TE-Puffer und Inkubation in einem Thermomixer gelöst.

- Auf jedes Loch einer 96 Lochplatte 150 µl Lysis-Puffer geben und 6-8 Stunden bei 37 °C inkubieren.
- 200 µl Isopropanol auf jedes Loch geben.
- Die Platte über Nacht im Kühlraum auf einen Kreisel-Horizontalschüttler stellen. Die genomische DNS konzentriert sich als sichtbares weißes Flöckchen.
- 96 Lochplatte zentrifugieren: 10 min bei 1200 g.
- Überstand vorsichtig abkippen; mit der 8-Kanal Pipette vorsichtig in jedes Well 200 µl 70% Ethanol geben.
- 96 Lochplatte zentrifugieren: 5 min bei 1200 g.
- Überstand vorsichtig abkippen; mit der 8-Kanal Pipette vorsichtig in jedes Well 200 µl 70% Ethanol geben.
- 96 Lochplatte zentrifugieren: 5 min bei 1200 g.
- Überstand vorsichtig abkippen; mit der 8-Kanal Pipette vorsichtig in jedes Well 200 µl 70% Ethanol geben.
- 96 Lochplatte zentrifugieren: 5 min bei 1200 g.
- Überstand vorsichtig abkippen, die DNS für 30 Minuten bei 37 °C trocknen.
- Die Flocken in 80 µl TE-Puffer lösen. Dazu die 96-Lochplatte in dem Thermomixer mindestens eine Stunde bei 37 °C und starker Kreiselbewegung inkubieren.
- Gelöste DNS bei 4 °C aufbewahren.

Zur Analyse der DNS mit Hilfe der Southern-Blot Technik wurde jeweils 30 µl der DNS-Lösung mit einem Restriktionsenzym inkubiert.

6.2.14.2 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNS AUS BIOPSIEGEWEBE VON MAUS

Zur Bestimmung des Genotyps bei neugeborenen Mäusen wird diesen im Alter zwischen 3 und 10 Tagen ein Stück Gewebe entnommen.

- Biopsiematerial in ein steriles Eppendorfgefäß geben, mit der Nummer der Maus beschriften.
- 50 µl Lysis-Puffer zugeben.
- In einem Thermomixer über Nacht bei 55 °C inkubieren.

- Am nächsten Morgen für 20 Minuten bei 95 °C inkubieren.
- Kurz an zentrifugieren.
- Für Analyse der genomischen DNS mittels PCR wird 5 µl DNS-Lösung eingesetzt.

6.2.15 SOUTHERN-BLOT-ANALYSE

Die Southern Blot Technik und die Southern Blot Hybridisierung (Southern, 1975) werden zur Analyse des Genoms eingesetzt. Dabei wird die genomische DNS zuerst mit einem Restriktionsenzym inkubiert. Die so entstandenen DNS-Fragmente werden anschließend durch Elektrophorese in einem Agarosegel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die DNS wird dann im Gel denaturiert, d.h. in Einzelstränge getrennt, und von dem Gel auf eine Membran, (Nitrocellulose oder Nylon) transferiert. Die auf der Membran immobilisierte DNS wird dann mit einer meist radioaktiv markierten DNS- oder RNS-Sonde hybridisiert. Nichtgebundene Sonde wird abgetrennt und die vom Komplementärstrang gebundene Sonde über deren Markierung sichtbar gemacht.

6.2.15.1 VORBEREITUNG DER PROBE

Bei der Analyse von genomischer DNS aus (in 96-Lochplatten kultivierten) ES-Zellen wurden immer 30 µl DNS-Lösung verwendet (vergleiche 6.2.14.1). Wurde genomische DNS anderer Herkunft untersucht, so wurde die einzusetzende DNS-Menge durch vergleichende Inkubation verschiedener Volumina von DNS-Lösungen ermittelt. Die DNS wurde mit 40-50 U Restriktionsenzym über Nacht in einem Volumen von 35 µl inkubiert.

6.2.15.2 SOUTHERN-GEL

Zur Southern Blot Analyse wurden 0,6 % GTG-Agarose Gele von 1 cm Schichtdicke und verwendet. Die Taschen zur Aufnahme der Probe hatten die Dimension 3,5 mm x 9 mm x 1,5 mm (Breite x Höhe x Länge). Die geschnittene genomische DNS wurde mit 3,5 µl 10x DNS-Ladepuffer versehen und bei 120 V über eine Laufstrecke von 8 bis 12 cm (je nach Größe der erwarteten Fragmente) aufgetrennt. Zur späteren Bestimmung der Fragmentgröße wurde das Gel mit einem Lineal fotografiert.

6.2.15.3 IMMOBILISIERUNG VON DNS-FRAGMENTEN AUF NYLONMEMBRANEN

Für einen optimalen Transfer der DNS Fragmente wird das Southern Gel in folgenden Puffern auf einem Kreiselerschüttler inkubiert:

- 15 Minuten in 0,25 M HCl. Die DNS wird depuriniert und zerbricht in kleinere Fragmente. Dieser Schritt ist wichtig um Fragmente, die größer als 5000 bp sind, effektiv zu transferieren.
- 30 Min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl. Dabei werden die DNS Doppelstränge denaturiert, d.h. in Einzelstränge zerlegt.
- 30 Minuten in 0,5 M Tris/3,0 M NaCl. Neutralisierung der 0,5 M NaOH vom vorhergehenden Schritt.

Anschließend wird der so genannte Kapillarblot aufgebaut. Dabei wird das Southern-Gel auf einen mit 10x SSC getränkten Schwamm gelegt der in einer Wanne mit 10x SSC liegt. Danach wird eine Nylonmembran auf das Gel gelegt, anschließend ein Stapel Papiertücher auf das Gel und zuletzt ein Gewicht (1kg). Jetzt wird der Puffer durch das Gel in das ursprünglich trockene Papier gesaugt, die dabei mitgenommene DNS bleibt an der Oberfläche des Nylonfilter hängen. Nach dem Transfer, der über Nacht erfolgt, wird die Nylonmembran mit UV-Licht von 120 mJ bestrahlt. Dies führt zu einer kovalenten Bindung der DNS an die Membran. Zur besseren Fixierung der DNS auf der Membran wird diese noch 2 h bei 80 °C gebacken.

6.2.15.4 HERSTELLUNG VON ^{32}P -MARKIERTEN DNS-SONDEN MIT ZUFALLSPRIMERN

Die radioaktive Markierung von DNS wurde mit dem Rediprime II DNS Labelling System durchgeführt. Hierzu werden diejenigen Hexanukleotidprimer, die sich an komplementäre Stränge der Sonde angelagert haben mit einer Polymerase verlängert. Der Rediprime Mix enthält die Primer, die Polymerase, Puffer sowie dATP, TTP und GTP. dCTP wird als radioaktives Nukleotid zugegeben.

- Zu markierende DNS-Sonde (~ 50 ng) mit TE-Puffer in einem Eppendorfgefäß auf 45 µl auffüllen.
- 5 min auf 95°C erhitzen zum Denaturieren der DNS.
- 5 min auf Eis stellen.
- Eppendorfgefäß an zentrifugieren.
- Denaturierte Sonde in das Rediprime-Gefäß geben.
- 5µl [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (6000 Ci/mmol) dazugeben und mischen.
- 30 min bei 37°C inkubieren.

Nichtgebundenes [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP wurde mit Hilfe von Sepharosesäulen abgetrennt. Hierzu wurden so genannte NICK-Säulen verwendet:

- NICK Säule mit doppelten Säulenvolumen TE-Puffer waschen.
- Pro NICK Säule sechs Eppendorfgefäße bereitstellen und von eins bis sechs nummerieren.
- Radioaktiv markierte Sonde auf NICK Säule geben. Es können maximal zwei identische Markierungsansätze über eine Säule gereinigt werden.
- 400µl TE-Puffer auf die Säule geben, in Eppendorfgefäß Nr. 1 auffangen.
- Säule mit 5 x 200 µl TE-Puffer waschen, in Eppendorfgefäßen Nr. 2-6 auffangen.
- Von jeder Fraktion 1 µl in ein Szintillationsröhrchen geben und im Szintillationsmessgerät aufgrund ihrer Cherenkov-Strahlung vermessen. Die radioaktiv markierte Sonde befindet sich im Ausschlussvolumen der Säule, d.h. in der zweiten und dritten Fraktion. Um die Radiolyse zu verringern werden diese beiden Eppendorfgefäße auf Eis gestellt.
- Die markierte Sonde sollte mindestens eine Aktivität von 2×10^5 bis 1×10^6 cpm/µl aufweisen.

6.2.15.5 PRÄHYBRIDISERUNG UND HYBRIDISIERUNG

Um Hintergrundsignale aufgrund unspezifischen Bindens der Sonde zu verringern wird der Southern Blot zunächst eine Stunde bei 65 °C in Church-Puffer prähybridisiert. Pro 100 cm² Oberfläche werden 10 ml Puffer verwendet. Dazu wird der Blot zusammen mit dem Puffer in einen Beutel luftblasenfrei eingeschweißt und in ein Schüttelwasserbad gelegt. Zur Hybridisierung des Blots wird eine Konzentration an markierter Sonde von 3-5 x 10⁶ cpm/ml benötigt. Für 100 cm² Blot wird 10 ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Die benötigte Menge an Sonde wird durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C und anschließendes dreiminütiges Abkühlen auf Eis denaturiert und dann zum Church-Puffer gegeben. Dann wird die Hybridisierungslösung mit dem Blot luftblasenfrei eingeschweißt und über Nacht (16 h) bei 65 °C inkubiert.

6.2.15.6 ENTFERNUNG VON NICHTSPEZIFISCH GEBUNDENER SONDE

Am nächsten Morgen wird nicht gebundene Sonde durch mehrere Waschschrte entfernt. Dazu wird der Southern Blot in Puffern mit abnehmender Salzkonzentration inkubiert. Das in der Hybridisierungslösung enthaltene Salz stabilisiert die Bindung der komplementären DNS-Stränge durch Verringerung der zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen wirkenden Abstoßungskräfte. Die abnehmende Salzkonzentration führt also zu einer kontinuierlichen Destabilisierung und Ablösung zuerst der nichtspezifisch gebundenen Sondenmolekülen.

Herstellung verschiedener SSC Waschlösungen (mit Wasser auf 1 l auffüllen)

SSC Waschlösungen	20x SSC	20% SDS
2x SSC, 1% SDS	100 ml	50 ml
0,4x SSC, 1% SDS	20 ml	50 ml

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Southern Blot Analysen wurden die folgenden Waschschrte durchgeführt:

- 2 x SSC/1%SDS: 10 min bei 65 °C
- 2 x SSC/1%SDS: 30 min bei 65 °C
- 0,4 x SSC/1%SDS: 30 min bei 65 °C

Danach lag die Strahlung der Southern Blots bei 0,2 bis 0,7 Becquerel/Fläche bei dem von uns verwendeten Flächenzähler. Die Blots wurden dann in Plastikfolie eingeschlagen und einem Phosphorimagerscreen oder Röntgenfilm exponiert. Die Filme wurden nach 24h entwickelt.

6.2.16 ISOLIERUNG VON RIBONUKLEINSÄUREN

6.2.16.1 ISOLIERUNG VON GESAMT-RNS AUS VERSCHIEDENEN MAUSGEWEBEN

Die in einer Säugerzelle enthaltene RNS setzt sich zusammen aus ungefähr 80% ribosomaler RNS (rRNS). Dazu kommen etwa 15 % RNS eines niedrigen Molekulargewichts, Transfer RNS (tRNS) und kleiner nukleärer RNS (snRNS). Die Boten RNS (mRNS) macht maximal 5% aus. Der in der RNS

verwendete Zuckerbaustein, die Ribose, hat sowohl an der 2'- als auch an der 3'-Position Hydroxylgruppen. Deshalb ist RNS chemisch reaktiver als DNS, weiterhin liegt sie als Einzelstrang vor und ist damit anfälliger für die Degradierung durch anfällige Nukleasen. RNS-Nukleasen werden bei der Lyse von Zellen freigesetzt; so sind sie z.B. auch auf der Haut und auf den meisten Oberflächen vorhanden. Ein wichtiger Teilschritt bei der Isolierung der RNS ist deshalb neben der Inaktivierung der in der Zelle enthaltenen RNS-Nukleasen oder RNasen das Verhindern der Kontaminierung der verwendeten Geräte, Gefäße und Lösungen mit RNS-Nukleasen. Ein Problem bei der Inaktivierung der RNS-Nukleasen ist ihre relativ große Stabilität. RNS-Nukleasen sind durch Disulfidbrücken stabilisiert. Sie können trotz langem Erhitzen oder trotz Einwirken von chaotropen Salzen oder Detergenzien renaturieren. Außerdem benötigen sie im Gegensatz zu den meisten DNS-Nukleasen keine divalenten Kationen für ihre Aktivität, so dass man sie nicht durch Zugabe von EDTA oder anderen Chelatbildnern inaktivieren kann. Entscheidend für die erfolgreiche Isolierung von RNS ist also zum einen die möglichst schnelle Zerstörung der endogenen RNS-Nukleasen und zum anderen das Verhindern von Kontamination mit RNS-Nukleasen bei den einzelnen Arbeitsschritten. Zur Zerstörung der endogenen RNS-Nukleasen werden sehr starke Detergenzien wie Guanidinium Salze verwendet. Um das Einbringen von exogenen RNS-Nukleasen zu verhindern werden alle Glasgeräte bei 250 °C über Nacht gebacken, für Pipettierschritte werden gestopfte sterile Pipetten bzw. gestopfte sterile Pipettenspitzen verwendet. Wasser, das für das Arbeiten mit RNS verwendet werden soll, wird mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. DEPC inaktiviert die RNS-Nukleasen durch Bildung von Carbamaten mit einem der Stickstoffatome im Imidazolrest der Histidine. Ebenso werden die Puffer mit DEPC behandelt oder mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt. Für die Isolierung der Gesamt-RNS wurde wie folgt vorgegangen:

- Zu 1 g Gewebe 10 ml RNS-Clean® geben. Zuerst mit einem Ultra Turrax, dann mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisieren.
- 1 ml Chloroform dazugeben, mit Potter homogenisieren.
- 5 Minuten bei 4 °C inkubieren.
- 15 Minuten bei 12 000 rpm zentrifugieren.
- Obere Phase in neues Corex-Röhrchen überführen, 1 Volumen Chloroform dazugeben.
- 15 Minuten bei 12 000 rpm zentrifugieren.
- Obere Phase in neues Corex-Röhrchen überführen, 1 Volumen Isopropanol dazugeben, mit Pipette homogenisieren.
- 15 Minuten bei 4 °C inkubieren.
- 15 Minuten bei 12 000 rpm zentrifugieren.
- Überstand verwerfen.
- Sediment mit 10 ml 70% Ethanol überschichten.
- 10 Minuten bei 12 000 rpm zentrifugieren.
- Überstand verwerfen.

- Sediment 5 Minuten bei Raumtemperatur trocknen.
- Sediment in 3 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ lösen.
- 330 μl (w/v) 20% Kaliumacetat hinzugeben; gut mischen.
- 8, 325 ml 99,8% Ethanol hinzugeben; gut mischen.
- 60 Minuten bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ inkubieren.
- 30 Minuten bei 12 000 rpm zentrifugieren.
- Überstand verwerfen.
- Sediment mit 10 ml 70% Ethanol überschichten.
- 10 Minuten bei 12 000 rpm zentrifugieren.
- Überstand verwerfen.
- Sediment 5 Minuten bei Raumtemperatur trocken.
- Sediment in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ lösen.
- Konzentration der RNS bestimmen (vergleiche 6.2.5.2).

6.2.16.2 ISOLIERUNG VON POLYA⁺-RNS AUS GESAMT-RNS

Von den $10^{-5}\mu\text{g}$ Gesamt RNS, die eine Säugerzelle enthält, sind nur 1- bis 5% mRNS. Diese ist extrem variabel in ihrer Länge, je nach dem Protein für das sie kodiert. Die meisten eukaryotischen mRNS-Moleküle weisen eine Abfolge von Adeninnukleotiden an ihrem 3' Ende in variabler Zahl auf, den so genannten PolyA⁺-Schwanz. Dieser ermöglicht es, die mRNS durch Affinitätschromatographie über oligo-dT-Zellulose 10- bis 30-fach anzureichern. Die oligo(dT)-Ketten sind kovalent an eine Zellulosematrix gebunden. Dabei bildet die poly(A) Kette der RNS stabile RNS-DNS Hybride zu den komplementären oligo(dT)-Ketten zu. Über Oligo(dT)-angereicherte poly(A)-RNS nennt man poly(A)⁺-RNS.

Zuerst wird die zu reinigende RNS in einem Hochsalzpuffer gelöst, der die wenigen A-dT Basenpaare stabilisiert. Nachdem die nichtgebundene RNS von der Matrix heruntergewaschen worden ist, wird über Erniedrigung der Salzkonzentration die Basenpaarbindung destabilisiert und auf diese Weise die poly(A)⁺-RNS von der Säule eluiert. Für die Expressionsanalyse von Genen mit Hilfe der Northern-Blot-Technik wurde immer diese angereicherte poly(A)⁺-RNS verwendet.

- In ein Eppendorfgesäß zu 450 μl wässriger Gesamt RNS-Lösung 50 μl 5 M NaCl geben und sorgfältig mischen.
- 5 Minuten bei $65\text{ }^\circ\text{C}$ inkubieren, dann 3 Minuten auf Eis stellen.
- RNS-Lösung auf eine oligo-dT-Zellulose geben, 5 Minuten schütteln.
- 10 Sekunden bei höchster Drehzahl in einer Tischzentrifuge zentrifugieren.
- Überstand in das erste Eppendorfgesäß zurück pipettieren.
- Ein zweites Mal 5 Minuten bei $65\text{ }^\circ\text{C}$ inkubieren, dann 3 Minuten auf Eis stellen.
- Überstand auf die selbe oligo-dT-Säule geben, 5 Minuten schütteln.
- 10 Sekunden bei höchster Drehzahl in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren.

- Überstand verwerfen.
- 400 µl Waschpuffer auf die oligo-dT-Zellulose geben und schütteln.
- Waschpuffer zusammen mit der oligo-dT-Zellulose in eine Zentrifugiersäule geben.
- 2 Minuten schütteln.
- 10 Sekunden bei höchster Drehzahl in einer Tischzentrifuge zentrifugieren.
- Durchlauf verwerfen.
- 400 µl Wasch Puffer auf die oligo-dT-Zellulose geben.
- 2 Minuten schütteln.
- 10 Sekunden bei höchster Drehzahl in einer Tischzentrifuge zentrifugieren.
- Säule in ein neues Eppendorfgesäß stecken.
- 200 µl 70 °C warmen Elutionspuffer zugeben.
- 2 Minuten schütteln.
- 10 Sekunden bei höchster Drehzahl in einer Tischzentrifuge zentrifugieren.
- Weitere 200 µl Elutionspuffer auf die Zentrifugiersäule geben.
- 2 Minuten schütteln.
- 10 Sekunden bei höchster Drehzahl in einer Tischzentrifuge zentrifugieren.
- Von dem Eluat (400µl) 10 µl entnehmen, 1:5 in H₂O verdünnen und Konzentration der RNS bei 260 nm bestimmen.
- Zu dem restlichen Eluat 44 µl 3 M Natriumacetat-Lösung geben und mischen. Anschließend 1000 µl 99,8 % Ethanol zugeben und als Ethanolpräzipitat bei -80 °C aufbewahren.

6.2.16.3 PRÄZIPITATION VON RNS

Ebenso wie DNS ist RNS aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen leicht löslich in wässrigen Lösungsmitteln und schlecht in organischen Lösungsmitteln wie Ethanol und Isopropanol. Um RNS zu präzipitieren wird die wässrige RNS-Lösung mit dem gleichen Volumen Isopropanol vermischt und mindestens eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Um kleine Volumina RNS-Lösung zu präzipitieren, oder für die längerfristige Aufbewahrung von RNS, wird zu der wässrigen RNS-Lösung 1/8 Volumen 3 M Kaliumacetat-Lösung und 2,5 Volumen 99,8 % Ethanol zugegeben. So kann die RNS stabil bei -80 °C aufbewahrt werden.

6.2.16.4 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON RNS

Die Konzentration von RNS wird durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt (siehe 6.2.5).

6.2.17 GELELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG UND NACHWEIS VON RNS

Die Trennung der RNS erfolgt mit einer denaturierenden Gelelektrophorese mittels Agarosegelen. Die denaturierenden Bedingungen sind notwendig, weil die RNS-Moleküle anderenfalls intermolekulare Basenpaarbindungen ausbilden. Bei der Verwendung von Formaldehyd als Denaturierungsmittel wird die RNS-Probe auf ein Agarosegel mit 2,2 M (6%) Formaldehyd aufgetragen. Formaldehyd bildet

Schiffsche Basen mit den Iminogruppen der Guanin Reste. Diese Adukte unterbinden die Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaarbindungen und halten damit die RNS in einem denaturierten Zustand. Die Schiffschen Basen sind reversibel und leicht durch Verdünnen der Lösung zu entfernen, worauf die RNS renaturiert. Das Ethidiumbromid wird nicht wie bei DNS-Gelen der Agaroselösung hinzugefügt (6.2.8) sondern direkt in die RNS-Probe pipettiert und erhitzt. Möglicherweise behindert Ethidiumbromid den Transfer der RNS aus Formaldehydgelen auf die Membran, und führt zusätzlich zu einer hohen Hintergrundfärbung. Unmittelbar vor dem Auftragen auf das Gel wird die RNS-Probe erhitzt, um so die RNS-Stränge zu denaturieren. Für die Gelelektrophorese von RNS wurde immer eine nur für diesen Zweck bestimmte Elektrophoresekammer einschließlich eines Gelträgers verwendet. Diese wurden vor jeder Verwendung über Nacht mit 10% H₂O₂ inkubiert

Vorbereiten der RNS-Probe:

Menge für 12,5 µl:		Endkonzentration
2 µl	RNS (maximal 20 µg)	
6,25 µl	deionisiertes Formamid	50 %
2,0 µl	Formaldehyd 37%	6 %
1,25 µl	10 x MOPS	1 x
1,0 µl	Ethidiumbromid (200 µg/ml)	16 µg/ml

- 15 Minuten auf 55 °C erhitzen.
- 5 Minuten auf Eis abkühlen.
- 2,5 µl 6 x Auftragspuffer für RNS hinzufügen.

RNS-Gel 1,2 %

Menge für 500 ml		Endkonzentration
6 g	GTG Agarose	1,2 %
430 ml	H ₂ O _{DEPC}	50 %
In der Mikrowelle lösen und abkühlen lassen, verdunstetes H ₂ O _{DEPC} ersetzen.		
20 ml	Formaldehyd 37%	6 %
50 ml	10 x MOPS	1 x

Gel in einen horizontalen Gelträger füllen. Die vorbereitete Probe auf das Gel auftragen und in einer mit 1 x MOPS als Laufpuffer gefüllten Kammer bei 120 V 4 – 16 Stunden laufen lassen.

6.2.18 NORTHERN-BLOT-ANALYSE

Die Northern-Blot-Hybridisierung wird dazu verwendet, um die Menge und die Größe der von eukaryotischen Genen transkribierten RNS-Molekülen abschätzen zu können. Sie erfolgt nach dem Prinzip des Kapillarblots und der Southern Blot Hybridisierung (Alwine et al., 1979):

- Isolierung der poly(A)⁺-RNS.
- Trennung der poly(A)⁺-RNS nach Größe über ein denaturierendes Agarose Gel.

- Transfer der poly(A)⁺-RNS von dem Gel auf eine Membran mittels Kapillarblot.
- Hybridisierung der immobilisierten RNS mit einer Sonde die komplementär ist zu der gesuchten Sequenz.
- Entfernen von nichtspezifisch gebundener Sonde.
- Detektion der Sonde.

6.2.18.1 VORBEREITUNG DER PROBE

Wie in (6.2.17) beschrieben.

6.2.18.2 RNS-GELELEKTROPHORESE

Wie in (6.2.17) beschrieben. Nach dem Beenden der Elektrophorese wurde das Gel zusammen mit einem Längenmaßstab photographiert, um später die Größe der im Blot bzw. Film nachgewiesenen Transkripte bestimmen zu können.

6.2.18.3 IMMOBILISIERUNG VON RNS AUF NYLONMEMBRANEN

Nach elektrophoretischer Auftrennung und einem Photo wurde die RNS über einen Kapillarblot (vergleiche 6.2.15.3) auf eine ungeladene Nylon Membran transferiert. Die Nylonmembran wird anschließend mit UV-Licht (120 mJ) bestrahlt und bei 80 °C gebacken, um die RNS auf der Nylonmembran zu immobilisieren.

6.2.18.4 HERSTELLUNG VON ³²P-MARKIERTEN DNS-SONDEN MIT ZUFALLSPRIMERN

Wurde durchgeführt wie in (6.2.15.4) beschrieben.

6.2.18.5 PRÄHYBRIDISIERUNG UND HYBRIDISIERUNG

Nach der Fixierung der RNS auf der Nylonmembran folgt der Hybridisierungsschritt, bei dem mit einer radioaktiv markierten, spezifischen Sonde die gesuchte RNS nachgewiesen werden soll. Dazu wird der Blot im Prähybridisierungsschritt zuerst mit einem Puffer inkubiert, der nichtspezifische Bindungsstellen blockiert. Nach Pufferwechsel wird die radioaktiv markierte Sonde zur Membran gegeben.

- Die Nylonmembran mit der immobilisierten RNS in eine Plastiktüte legen.
- Pro 100 cm² 10 ml Prähybridisierungslösung hinzugeben und luftblasenfrei einschweißen.
- 1 Stunde bei 65 °C inkubieren.
- Prähybridisierungslösung wechseln.
- 1 weitere Stunde bei 42 °C inkubieren.

Herstellung der Hybridisierungslösung:

	Endkonzentration
10 ml/100 cm ² Prähybridisierungslösung	
Sonde	10 ⁷ cpm /ml
Vor der Zugabe denaturieren: 10 min auf 95 °C erhitzen; dann 3 Minuten auf Eis abkühlen.	

- Prähybridisierungslösung entfernen und Blot in neue Tüte legen.
- Hybridisierungslösung zugeben, 16 bis 20 Stunden bei 42 °C inkubieren.

6.2.18.6 ENTFERNUNG NICHTSPEZIFISCH GEBUNDENER SONDE

Dazu wird der Northern Blot in Puffer mit abnehmender Salzkonzentration inkubiert. Die in der Hybridisierungslösung enthaltenen Kationen stabilisieren die RNS-DNS Bindung durch Verringerung der zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen wirkenden Abstoßungskräfte. Die abnehmende Salzkonzentration während des Waschens führt zu einer kontinuierlichen Destabilisierung und Ablösung unspezifisch gebundener Sonde.

Herstellung verschiedener SSC Waschlösungen (mit Wasser auf 1 l auffüllen).

SSC Waschlösungen	20x SSC	20% SDS
2x SSC, 0,1% SDS	100 ml	5 ml
0,4x SSC, 0,1% SDS	20 ml	5 ml

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Northern Blot Analysen wurden in der Regel die unten angegebenen Waschschrte durchgeführt. Es wurde gewaschen bis die Strahlung der Blots, die unter einem Flächenzähler gemessen wurde, bei 0,2 Becquerel/Fläche lag.

- 2 x SSC/0,1%SDS: 20 min 50 °C.
- 2 x SSC/0,1%SDS: 20 min 50 °C.
- 0,4 x SSC/0,1%SDS 20 min 50 °C.
- 0,4 x SSC/0,1%SDS: 20 min 50 °C.

Die Blots wurden anschließend in Plastikfolie eingeschlagen und mit einem Phosphorimagerfilm oder Röntgenfilm in eine Entwicklungskassette gelegt.

6.2.18.7 ENTFERNUNG SPEZIFISCH GEBUNDENER SONDE

Um den Northern Blot mit einer anderen Sonde zu hybridisieren wird die erste Sonde durch 10-minütiges Inkubieren bei 95 °C in einer 0,1 % SDS Lösung entfernt.

6.2.19 SYNTHESE VON cDNS AUS mRNS (ERSTSTRANGSYNTHESE)

Die Synthese von cDNS aus RNS wird als Erststrangsynthese bezeichnet. Dazu benutzt man einen Oligodesoxynukleotidprimer, der an die mRNS bindet und der mit einer RNS abhängigen DNS-Polymerase entsprechend der RNS-Matrize verlängert wird. Als Oligodesoxynukleotidprimer kann man Primer verwenden, die spezifisch zu einem Abschnitt der RNS komplementär sind, Zufalls-Hexamer Primer oder Oligo(dT)-Primer. Als RNS abhängige DNS-Polymerasen oder ‚reverse Transkriptasen‘ werden Polymerasen des Avian Myeloblastitis Virus (AMV) und des Moloney strain des Murine Leukemia Virus (Mo-MLV) verwendet. Für die Synthese von Erststrang DNS aus RNS, die aus verschiedenen Geweben von Maus isoliert worden war, wurde in dieser Arbeit das Superscript™ First-Strand Synthesis System verwendet. Die Synthese wurde in der Regel mit poly(A)⁺-RNS als Matrize und mit Oligo(dT)Primern durchgeführt.

- In sterilen 0,2-ml-Eppendorfgläsern werden folgende Komponenten gemischt:

50-500 ng	mRNS
1 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1 µl	Oligo(dT) Primer (0,5 µg/µl)
Auf 10 µl	mit H ₂ O _{DEPC} auffüllen.
- Inkubieren bei 65 °C für 5 Minuten, anschließend bei 4 °C für 1 Minute inkubieren. Bei diesem Schritt werden die RNS-Stränge denaturiert und der Primer annealt.
- In einem neuen sterilen 0,2-ml-Eppendorfgläser werden folgende Komponenten gemischt:

2µl	10 x RT-Puffer
4 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2 µl	Dithiothreitol (0,1 M)
1 µl	RNS-Nuklease Inhibitor
- Diese Mischung wird zu dem RNS/Primer Gemisch gegeben und sorgfältig gemischt.
- 2 Minuten bei 42 °C inkubieren.
- 1 µl (50 U) Superscript Reverse Transkriptase zugeben, sorgfältig mischen.
- 50 Minuten bei 42 °C inkubieren.
- 15 Minuten bei 70 °C inkubieren (Denaturieren der Reverse Transkriptase).
- Auf Eis stellen.
- 1 µl Ribonuklease H zugeben, 20 Minuten bei 37 °C inkubieren. Ribonuklease H baut spezifisch nur die Matrizen-RNS ab.
- Von dem hergestellten cDNS-Einzelstrang können z.B. 2 µl als Matrize für eine PCR eingesetzt werden.

6.3 METHODEN ZUM GENE-TARGETING IN EMBRYONALEN STAMMZELLEN VON MAUS

Zur Herstellung homolog rekombinanter ES-Zellklone wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

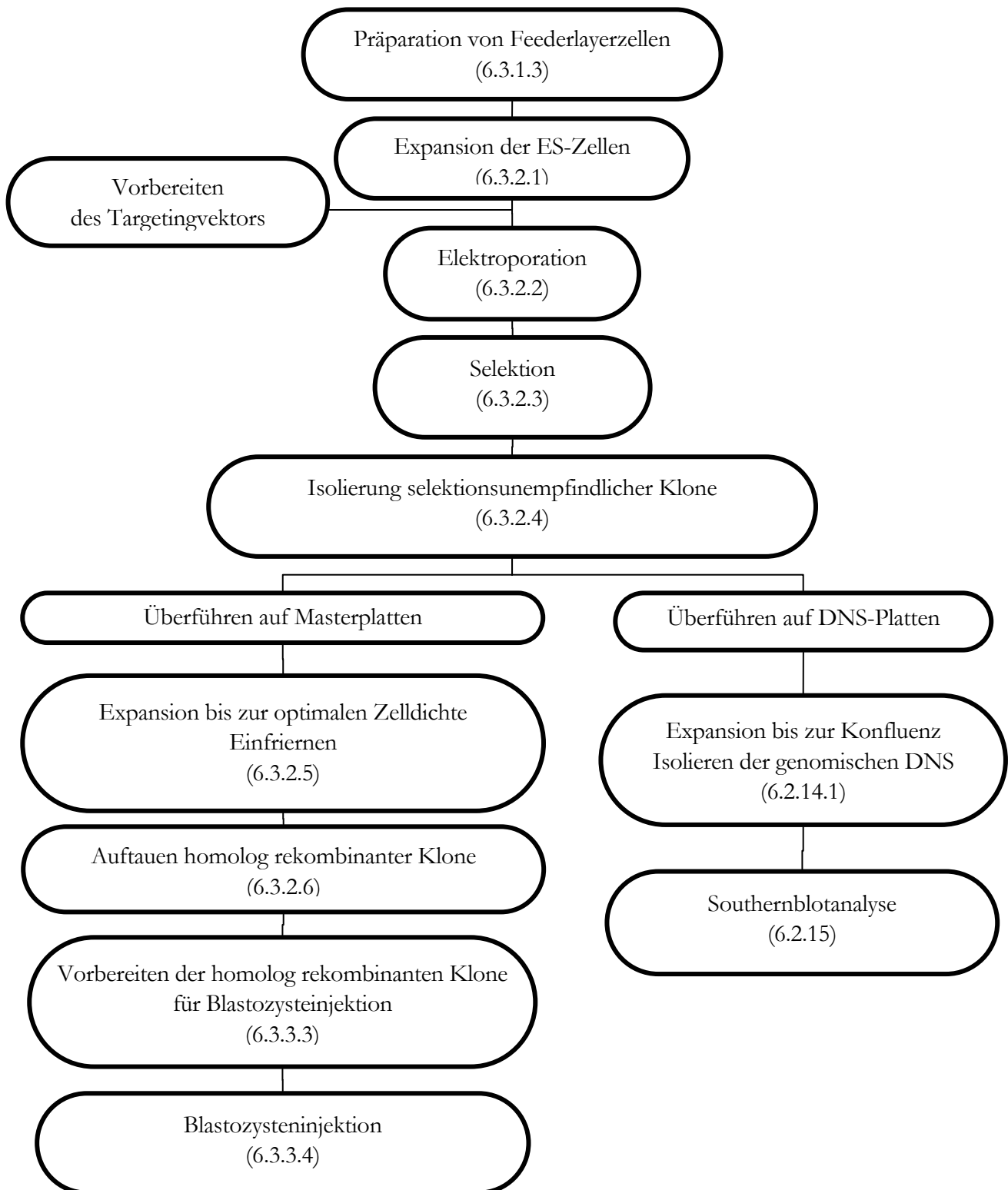


Abbildung 6-1 Vorgehensweise zur Erzeugung homolog rekombinanter ES-Zellklone

In Klammern ist das jeweilige, in dieser Arbeit aufgeführte, Protokoll angegeben. Modifiziert nach (Joyner and Sedivy, 2000).

6.3.1 KULTIVIERUNG VON EMBRYONALEN STAMMZELLEN VON MAUS

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) von Maus wurden zum ersten Mal von Evans und Kaufman (Evans and Kaufman, 1981) und Martin (Martin, 1981) beschrieben. Sie wurden aus der inneren Zellmasse von sich entwickelnden Blastozysten isoliert und *in vitro* in Kultur gehalten. Bradley (Bradley et al., 1984) konnte zeigen, dass diese embryonalen Stammzellen zu allen Geweben beitragen können. Hierzu wurden nach Injektion der embryonalen Stammzellen in Blastozysten Tiere generiert. Insbesondere können diese Stammzellen auch zu Keimbahnzellen differenzieren. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es möglich, gezielt genetische Veränderungen in einen Organismus einzuführen. Bisher ist diese Vorgehensweise in erster Linie für Maus etabliert. Es werden jedoch von immer mehr Säugern embryonale Stammzellen generiert, z.B. von Ratte (Iannaccone et al., 1994), Hase (Graves and Moreadith, 1993), Affen (Thomson et al., 1995) und sogar vom Menschen (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998). Es ist daher absehbar, dass es möglich sein wird, auch in diesen Tierarten gezielte genetische Veränderungen vorzunehmen.

6.3.1.1 ISOLIERUNG VON ES-ZELLEN/VERWENDETE ES-ZELLINIE

Zur Isolierung embryonaler Stammzellen (Evans and Kaufman, 1981), (Martin, 1981) werden Embryos im expandierten Blastozystenstadium (3,5 dies post coitum, dpc) direkt oder nach Isolierung der inneren Zellmasse, auf Feederzellen ausplattiert. Konventionelles Zellkulturmedium wird mit β -Mercaptoethanol und 10-20% FCS supplementiert. Nach einigen Tagen wird die Zellmasse vereinzelt und auf frische Feederzellen ausgesät. Danach wachsen verschiedene Typen von differenzierten Kolonien zusammen mit Kolonien mit undifferenzierter Morphologie heran. Letztere zeichnen sich dadurch aus, dass die Zellen eine runde Form mit glatten Rändern haben. Die Kolonien mit undifferenzierter Morphologie werden isoliert, vereinzelt und wieder ausgesät. Die meisten ES-Zelllinien wurden von 129 Inzucht-Mauslinien isoliert. Der Großteil der 129er Linien sind homozygot für white-bellied agouti Allel (A^w/A^w), das für eine hellbraune Fellfarbe kodiert. In dieser Arbeit wurde die von Nagy et al. (Nagy et al., 1993) generierte R1 ES-Zelllinie verwendet. Sie ist von F1-Hybriden zweier 129 Unterlinien, 129X1/SvJ und 129S1/SV- $^{P+Tyr-c}Kitl^{Sl-J}/+$, isoliert. R1 ES-Zellen haben einen männlichen Chromosomensatz, sind homozygot für white-bellied agouti Allel (A^w/A^w) und heterozygot für den c (albino) und p (pink-eyed dilution) Locus (C/c, P/p).

6.3.1.2 GENERELLE ASPEKTE DER KULTIVIERUNG VON ES-ZELLEN, KULTURBEDINGUNGEN

Um das pluripotente Potential von ES Zellen zu erhalten müssen optimale Kulturbedingungen eingehalten werden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit genetischer Läsionen erniedrigt. Unter suboptimalen Kulturbedingungen ist es möglich auf Varianten zu selektionieren, die durch chromosomale Rearrangements und/oder Mutationen eine erhöhte Wachstumsrate haben - aber auch

eine erniedrigte Pluripotenz (Nagy, 2003). Unter suboptimalen Kulturbedingungen versteht man solche, bei der ein Nährstoff oder Wachstumsfaktor limitierend ist, aber auch das Kultivieren der Zellen bei zu hoher oder zu niedriger Zelldichte. ES-Zellen sollten bei relativ hoher Zelldichte gehalten und alle 2 bis 3 Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:6 subkultiviert werden. Bei der Subkultivierung, dem sogenannten Splitten, mit Hilfe von Trypsin ist es sehr wichtig, dass die Zellen vereinzelt werden, da Zellklumpen dazu neigen, zu Endoderm auszudifferenzieren. Gut kultivierte ES-Zellen wachsen in dicht gepackten Gruppen, den Kolonien, mit glatten Rändern. Sobald die Kolonien sich zu verflachen beginnen und raue Ränder bekommen sind die Kulturbedingungen suboptimal. Gute ES-Zellen aus niedrigen Passagen sind verfügbar. Um das Risiko herabzusetzen, ES-Zellen mit chromosomalen Anomalien zu akkumulieren, ist es wichtig die ES-Zelllinie zunächst zu expandieren und davon mehrere Aliquots mit möglichst niedriger Passagenzahl einzufrieren. Bei jedem neuen Gene-Targeting Experiment wird dann ein Aliquot der Zellen mit möglichst niedriger Passagenzahl aufgetaut. Als Kulturmedium von ES R1 embryonalen Stammzellen wird Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) verwendet. DMEM ist ein Hydrogencarbonat gepuffertes Kulturmedium, das einen pH von 7,2 bis 7,4 bei üblichen Kulturbedingungen, d.h. in Gegenwart von 5% CO₂ gewährleistet. Zugewetzt wird 20 % Fötale Kälber Serum (FCS), das für die Zellen wichtige Wachstumsfaktoren enthält. Da einzelne Chargen von FCS verschiedene Zusammensetzungen haben können, ist es zunächst wichtig die Chargen auf ihre Kompatibilität mit den verwendeten ES-Zellen zu testen. Von einer ausgetesteten Charge wird dann bei der Lieferfirma eine möglichst große Menge reserviert. Dem Medium wird Leukemia Inhibitory Faktor (LIF) zugewetzt. LIF ist ein Polypeptid-Zytokin das über Interaktionen mit einem heterodimeren Rezeptorkomplex bestehend aus dem LIF-Rezeptor und gp130 (Davis et al., 1993) die Differenzierung von ES-Zellen verhindert. Um einer Oxidation des LIF entgegenzuwirken, muss das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol zugewetzt werden. Weiterhin werden dem Medium nicht essentielle Aminosäuren hinzugefügt.

6.3.1.3 ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG EMBRYONALER FIBROBLASTEN (FEEDERZELLEN)

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen ES R1 wurden unter Verwendung von Feederzellen etabliert (Nagy et al., 1993). Um Differenzierungserscheinungen, die bei Entzug von Feederzellen vorkommen können (Nagy, 2003), zu vermeiden, wurden sie kontinuierlich auf Feederzellen kultiviert. Feederzellen werden aus 13,5 Tage alten Mausembryonen gewonnen. Damit die Feederzellen resistent gegen Geneticin (G418) sind, werden Embryonen verwendet die heterozygot für das Neomycin-Resistenzgen sind; in dieser Arbeit wurden hierzu Wildtyp-Weibchen mit TRPC4 -/- Männchen verpaart. Die TRPC4-defizienten Männchen sind homozygot für das Neomycin-Resistenzgen (Freichel et al., 2001). Nach Expansion werden die Feederzellen mit γ -Strahlung behandelt um weitere

Zellteilungen zu unterbinden und bei -183 °C eingefroren. Feederzellen müssen nach jeder Passagierung der ES-Zellen neu ausgesät werden.

Um Embryonen am 13,5. Tag post coitum isolieren zu können, werden am Abend einige Weibchen mit einem Männchen zusammengesetzt. Am nächsten Morgen werden die Weibchen auf das Vorhandensein eines Vaginalplugs bestehend aus koagulierte Sperma untersucht. Bei Vorhandensein eines Vaginalplugs wäre dies dann Tag 0,5 post coitum.

Isolierung der Feederzellen:

Benötigte Medien und Puffer; die Zusammensetzung ist in Kapitel (6.1.10) beschrieben:

- Feeder-Medium
- PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} +EDTA
- PBS ohne NaHCO_3
- 1 x Trypsin

Benötigtes hitzesterilisiertes Präparationsbesteck:

- Große Schere für Durchtrennung der Haut.
- Schere für Eröffnung der Bauchdecke und Uterusabtrennung.
- Kleine Schere für Zerkleinerung der Embryonen.
- Mehrere Pinzetten.

Am Tag der Präparation vorbereiten:

- Stereomikroskop und Lichtquelle säubern und unter die Sicherheitswerkbank stellen.
- Großes Becherglas mit Ethanol 70% für die Desinfektion der Maus bereitstellen.
- Kleineres Becherglas mit sterilem Wasser für die Reinigung des Präparationsbesteckes bereitstellen.
- Kleineres Becherglas mit Ethanol 70% für die Desinfektion des Präparationsbesteckes bereitstellen.
- 50 ml Falconröhrchen unter der Sicherheitswerkbank bereitstellen.
- Styroporplatte mit Nadeln unter der Sicherheitswerkbank bereitstellen.
- 4 Petrischalen mit PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} +EDTA bei 37 °C inkubieren.
- 4 Petrischalen mit PBS ohne NaHCO_3 bei 37 °C inkubieren.
- 10 ml 1 x Trypsin auf 37 °C erwärmen.
- Feeder-Medium auf 37 °C erwärmen.

Durchführung der Präparation:

- Maus durch zervikale Dislokation töten.
- Tote Maus in 70% Ethanol baden.
- Maus unter der Sicherheitswerkbank auf die Styroporplatte mit Nadeln befestigen.
- Bauchraum der Maus eröffnen.
- Uterus entfernen und in eine Schale mit PBS ohne NaHCO_3 legen.
- Embryonen freipräparieren und in eine Schale mit PBS ohne NaHCO_3 legen.
- Köpfe abschneiden und Rümpfe in eine Schale mit PBS ohne NaHCO_3 legen.

- Die Petrischale mit den Rümpfen unter das Stereomikroskop stellen.
- Herz, Lunge, Leber und Nieren – die so genannten roten Gewebe entfernen. Den Rumpf in eine Schale mit PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} + EDTA legen.
- Gewebe mit Schere grob zerkleinern und in das 50 ml Falcon überführen.
- Pro Embryo 1 ml 1 x Trypsin dazugeben.
- 5-10 min bei 37 °C inkubieren.
- Durch wiederholtes Aufziehen in Pipetten homogenisieren (15 mal Aufziehen mit 25-ml-Pipette, 15 mal Aufziehen mit 10-ml-Pipette, 15 mal Aufziehen mit 5-ml-Pipette).
- Homogenisat 5-10 min bei 37 °C inkubieren.
- Erneut mit Pipetten homogenisieren (15 mal Aufziehen mit 25-ml-Pipette, 15 mal Aufziehen mit 10-ml-Pipette, 15 mal Aufziehen mit 5-ml-Pipette).
- Mit Feeder-Medium auf 25 ml auffüllen und mit der 5 ml Pipette intensiv homogenisieren.
- Zelltrümmer für 5 Minuten absinken lassen, Überstand in ein neues 50 ml Falconröhrchen überführen.
- Zellen auf 2 x 175 cm² Zellkulturflaschen pro Embryo aussähen, etwa 20 ml Zellsuspension pro Flasche.
- Zellen in der Zellkulturflasche durch Hin- und Herbewegen gleichmäßig verteilen.
- Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ inkubieren.
- Am nächsten Tag Mediumwechsel mit Feeder-Medium.
- Ohne weiteren Mediumwechsel bis zur Konfluenz wachsen lassen d.h. 5 bis 6 Tage.

γ-Bestrahlung der Feederzellen:

- Medium absaugen, Zellen mit 10 ml PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} + EDTA pro Zellkulturflasche waschen.
- Pro Zellkulturflasche 4 ml 1 x Trypsin hinzugeben, 5 Minuten bei 37 °C inkubieren, dann Zellen durch Abklopfen lösen.
- Pro Zellkulturflasche 6 ml Feeder-Medium hinzugeben.
- Zellen mit einer 10 ml Pipette homogenisieren.
- Bei Passage 0: Pro Zellkulturflasche 9 ml in ein 50 ml Falconröhrchen geben, 1 ml Zellsuspension in der Flasche belassen. Dazu 19 ml Feeder-Medium geben und bis zur Konfluenz wachsen lassen.
- Bei Passage 1: Die 10 ml Zellsuspension in ein 50 ml Falconröhrchen geben.
- Röhrchen mit der Zellsuspension 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Überstand absaugen, Zellpelletts in 50 ml Feeder-Medium resuspendieren und vereinigen.
- 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren, Überstand diesmal über den Zellen belassen.
- Bestrahlen mit 60 Gray (Klinik für innere Medizin, Blutbank, Universitätsklinikum des Saarlandes).
- Zellsuspension 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren, Überstand absaugen.
- Zellpellett in gleichen Volumina Feeder-Medium und eiskaltem EF-Einfriermedium resuspendieren bei einem Endvolumen von 3 ml pro Zellkulturflasche.

- Jeweils 1 ml in ein Kryoröhrchen geben, langsam auf -80 °C abkühlen lassen, dann in flüssigem Stickstoff aufbewahren.
- In der Regel enthält ein Kryoröhrchen genügend Feederzellen für 150 cm^2 ; dies muss aber durch eine Probeaussaat getestet werden.

Aussaat von Feederzellen

- Zellen bei 37 °C auftauen.
- Zellsuspension in 11 ml ESL-Medium mit einer Pasteurpipette resuspendieren.
- 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Überstand absaugen, Zellpellett in geeigneter Menge Medium resuspendieren und aussäen.
- Nach 24 h Medium wechseln; danach ist kein Mediumwechsel nötig, da die Feederzellen nicht mehr wachsen, bzw. sich nicht mehr teilen.

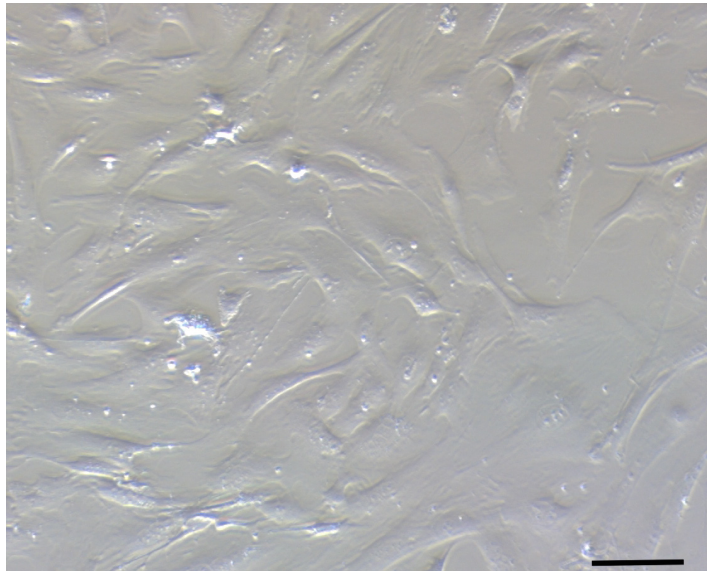


Abbildung 6-2 Feederzellen geeigneter Dichte
Der schwarze Balken entspricht $100\text{ }\mu\text{m}$.

6.3.1.4 INKULTURNAHME UND PASSAGIEREN VON ES-ZELLEN

Tabelle 6-2 Übersicht über die verwendeten Zellkulturgefäße und die jeweils benötigten Volumina an Zellkulturmedium und Trypsin

Zellkulturgefäß (Oberfläche)	Medium-Volumen	Volumen der 1 x Trypsinlösung
Zellkulturflasche 25 cm^2	3-4 ml	1 ml
75 cm^2	10 ml	2 ml
150 cm^2	15 ml	4 ml
175 cm^2	20 ml	4 – 5 ml
Petrischale $100\times 20 = 75\text{ cm}^2$	10 ml	2 ml
6-Lochplatte = $9,6\text{ cm}^2/\text{Loch}$	2 ml	500-800 μl
24-Lochplatte = $2\text{ cm}^2/\text{Loch}$	1 ml	200-250 μl
96-Lochplatte = $0,32\text{ cm}^2/\text{Loch}$	250 μl	50-80 μl

Aussaat von ES-Zellen

ES-Zellen werden immer auf Feederzellen ausgesät, die einen Tag vor der Inkulturnahme der ES-Zellen ausgesät wurden.

- Zellen bei 37 °C auftauen.
- In 11 ml ESL-Medium mit einer polierten Pasteurpipette resuspendieren.
- 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.

- Überstand absaugen, Zellpellett mit einer polierten Pasteurpipette in 11 ml ESL-Medium resuspendieren.
- 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Überstand absaugen, Zellpellett in geeignetem Volumen ESL-Medium aufnehmen und auf Feederzellen aussäen; zuvor wird das Medium von den Feederzellen abgesaugt und neues ESL-Medium hinzugeben.
- Täglicher Mediumwechsel; Passagieren etwa alle 1 – 2 Tage nach Bedarf im Verhältnis 1:3 bis 1:6.

ES – Zellen Passagieren

- Medium absaugen.
- Zellen zweimal mit PBS ohne Ca/Mg + EDTA waschen.
- 1 x Trypsin auf die Zellen geben (Volumen siehe Tabelle 6-2).
- 5 min bei 37 °C inkubieren.
- Zellen mit polierter Pasteurpipette resuspendieren.
- Zellsuspension in ein Plastikröhrchen mit 11 ml ESL-Medium überführen.
- 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Überstand absaugen und Zellsediment mit einer polierten Pasteurpipette in 12 ml ESL-Medium resuspendieren.
- 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Überstand absaugen.
- Zellen in geeigneter Menge ESL-Medium resuspendieren und auf Feederzellen aussäen.
- Meistens wird im Verhältnis 1:4 oder 1:5 passagiert, je nach Größe und Dichte der zu passagierenden Zellen.

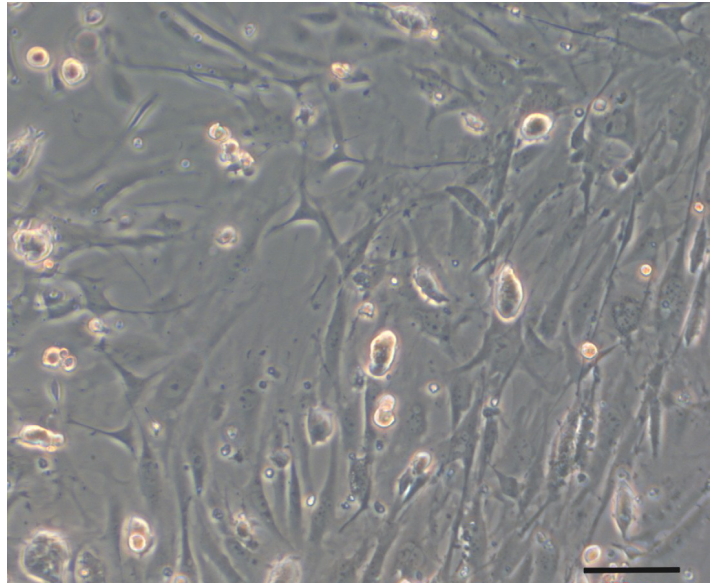


Abbildung 6-3 ES-Zellen auf Feederzellen
Der schwarze Balken entspricht 100 µm.

6.3.1.5 KRYOKONSERVIERUNG VON ES-ZELLEN

- Medium absaugen.
- Zellen zweimal mit PBS ohne Ca/Mg + EDTA waschen.
- 1 x Trypsin auf die Zellen geben (Volumen siehe Tabelle oben).
- 5 min bei 37 °C inkubieren.
- Zellen mit polierter Pasteurpipette resuspendieren.
- Zellsuspension in ein Plastikröhrchen mit 11 ml ESL-Medium überführen.
- 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Überstand absaugen und Zellpellet mit einer polierten Pasteurpipette in 12 ml ESL-Medium resuspendieren, ein Aliquot Zellsuspension abnehmen und mit der Neubauer Zählkammer die

Zellzahl bestimmen. Pro Kryobehältnis sollten ungefähr 10^6 Zellen eingefroren werden. Das Volumen der einzufrierenden Zellsuspension sollte 1 ml pro Kryoröhrchen betragen.

- 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Überstand absaugen.
- Zellen mit der Hälfte des insgesamt benötigten Volumens an ESL-Medium mit einer polierten Pasteurpipette resuspendieren.
- Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an eiskaltem ES-Einfriermedium ergänzen.
- Jeweils 1 ml in ein Kryoröhrchen geben, langsam auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ abkühlen lassen, dann in flüssigem Stickstoff aufbewahren.

6.3.1.6 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Die Zellzahlbestimmung wurde mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer durchgeführt. Dazu wird ein Tropfen Zellsuspension in die Kammer überführt, anschließend werden vier Quadranten mit jeweils 1 mm^2 Grundfläche ausgezählt. Da die Höhe der Kammer $0,1\text{ mm}$ beträgt, kann man so die Zellzahl pro $0,1\text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension bestimmen. Der erhaltene Wert multipliziert mit 10^4 ergibt die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension.

6.3.2 DURCHFÜHRUNG DES „GENE –TARGETING“

In dieser Arbeit wurde der Gene-Targeting Vektor über Elektroporation in die embryonalen Stammzellen eingeschleust. Hierzu wurde eine Suspension von ES-Zellen (etwa 10^7 Zellen) und Vektor-DNS ($20\text{-}40\text{ }\mu\text{g}$) einem kurzen definierten Strompuls ausgesetzt, wodurch die DNS in die Zellen gelangt.

6.3.2.1 HERANZÜCHTEN DER ES-ZELLEN

Fünf 75 cm^2 Zellkulturflaschen ergeben etwa 10 Millionen ES-Zellen. Da die spätere Keimbahngängigkeit von der Qualität der verwendeten ES-Zellen abhängt, sollten nur solche Zellen geerntet werden, welche die oben beschriebene Morphologie aufweisen und mit der notwendigen Zelldichte gewachsen sind. Insbesondere ist zu vermeiden, dass die einzelnen Klone, also ES-Zellkolonien die aus einer ES-Zelle entstanden sind, an den Rändern zusammenstoßen, denn in diesen Zonen kann es zu Differenzierungsereignissen kommen.

6.3.2.2 TRANSFORMATION VON ES-ZELLEN MIT DEM TARGETINGVEKTOR

Linearisierung der Vektor-DNS

DNS:	100 μg
Restriktionsenzym:	100 U
10 x Puffer	20 μl
10 x BSA:	20 μl
mit H_2O	auf 200 μl auffüllen

4 Stunden bei dem Temperaturoptimum des Restriktionsenzym inkubieren. Danach ist eine Hitzeinaktivierung durchzuführen. Anschließend wird die Vektor-DNS wie folgt gefällig:

Aufreinigen, Fällern und Resuspendieren der linearisierten Vektor-DNS

- Lösung mit linearisierter DNS mit Wasser auf 400 µl auffüllen.
- 400 µl Phenol/Chloroform zugeben.
- Schütteln, dann 5 min bei 13 000 rpm zentrifugieren.
- Wässrige Oberphase in neues Eppendorfgefäß überführen und mit H₂O auf 400 µl auffüllen.
- 40 µl 3 M Natriumacetat zugeben, mischen.
- 880 µl 99,8 % Ethanol zugeben, schütteln. Vektor-DNS sollte als weiße Flocke sichtbar werden.
- Flocke mithilfe einer 1 ml Pipettenspitze in ein neues Eppendorfgefäß überführen, in das 1 ml 70% Ethanol vorgelegt wurde; schütteln.
- DNS in neues Eppendorfgefäß überführen und ca. 30 min bei 21 °C trocknen lassen.
- DNS in 1 ml PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ aufnehmen, die Konzentration beträgt dann ungefähr 0,1 µg/µl.

- Für den Fall, dass die DNS beim vorhergehenden Schritt nicht als Flocke sichtbar wird:
 - Lösung 30 Minuten bei 13 000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren.
 - Überstand dekantieren, zum DNS-Sediment 1 ml 70 % Ethanol geben.
 - 10 min bei 13 000 rpm bei 21°C zentrifugieren.
 - Überstand dekantieren, DNS trocknen.
 - DNS in 500 µl PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ aufnehmen.

Um die Konzentration des in PBS gelösten Targetingvektors zu bestimmen wurde jeweils ein Aliquot auf einem Agarosegel aufgetrennt und dessen Menge mit der bekannten Menge eines parallel laufenden Größenstandards verglichen.

Vorbereiten der ES-Zellen für die Elektroporation:

3 Stunden vor der Elektroporation wird das Medium gewechselt.

- Medium absaugen.
- 2 x waschen mit PBS ohne Ca/Mg + EDTA.
- 1 x Trypsin hinzugeben; 5 min bei 37 °C inkubieren.
- Mit polierter Pasteurpipette die Zellen vereinzeln, in ein 15 ml Röhrchen geben und auf 12 ml mit ESL-Medium auffüllen.
- Zentrifugieren: 5 min bei 1 000 rpm.
- Überstand absaugen, Zellsediment in 14 ml PBS ohne Ca/Mg aufnehmen.
- Zentrifugieren: 5 min bei 1 000 rpm.
- Überstand absaugen, Zellsediment in 14 ml PBS w/o Ca/Mg aufnehmen.

- Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Pro Elektroporation sollten 10^7 Zellen mit 20 – 40 µg linearisierter DNS elektroporiert werden (Torres and Kühn, 1997).
- Zentrifugieren: 5 min bei 1 000 rpm.
- Überstand absaugen.
- 30 µg Vektor-DNS in Lösung in ein neues Eppendorfgefäß überführen und mit PBS ohne Ca/Mg auf 600 µl auffüllen; in dieser Lösung wird das Zellpellet mit einer polierten Pasteurpipette suspendiert.
- Zellsuspension in die Elektroporationsküvette überführen. Dabei darauf achten, dass die Kontaktstellen der Küvette für die Elektroden nicht mit den Fingern berührt werden.
- 5 min bei 21 °C inkubieren.
- Elektroporation im Biorad Gene Pulser bei 0,8 kV und 3 µF. Bei erfolgreicher Elektroporation sollte die angezeigte Zeitkonstante 0,1 betragen. Wenn „No“ angezeigt wird wurde kein Strompuls abgegeben, die Elektroporation sollte in diesem Fall wiederholt werden.
- Zellen 5 min bei 21 °C inkubieren.
- Zellen in 8 ml ESL-Medium resuspendieren und anschließend mit ESL-Medium auf 60 ml auffüllen.
- Von sechs runden, mit Feederzellen besäten Petrischalen (75 cm²) das Medium absaugen und auf jede der Petrischalen 10 ml elektroporierte ES-Zellen in ESL-Medium aussähen.

6.3.2.3 ANREICHERUNG REKOMBINANTER ES-ZELLKLONE

Übliche Transfektionen führen dazu, dass etwa eine von 10 Millionen Zellen die Fremd-DNS aufnimmt. Durch Elektroporation wird dieses Verhältnis verbessert - etwa eine von 1000 bis 10 000 Zellen nimmt Fremd-DNS auf. Um diese wenigen Zellen anzureichern müssen sie gegenüber denjenigen Zellen, die keine DNS aufgenommen haben, selektioniert werden. Hierzu werden in die Vektor-DNS zusätzliche Gene eingeführt, die eine solche Selektion ermöglichen. Zur so genannten Positivselektion wird ein Gen eingefügt, das nur solche Zellen unter Selektionsdruck überleben lässt, die dieses Gen eingebaut haben. Am häufigsten verwendet wird das Gen ‚neo‘, das Resistenz gegen G418 vermittelt. Ein weiterer Selektionsmarker, ein so genannter Negativselektionsmarker, wird an das Ende des Targeting-DNS-Konstruktes kloniert. Im Fall der homologen Rekombination wird die DNS dieses Negativmarkers nicht in das Genom der ES-Zellen eingebaut. Dagegen wird sie bei zufälliger Integration eingebaut und führt direkt (z.B. die Diphtherie Toxin-A DNS) oder indirekt zum Absterben der Zellen (Thymidinkinase-DNS). Zur Anreicherung rekombinanter ES-Zellklone wurden in dieser Arbeit eine Positivselektion in Gegenwart von G418 und eine Negativselektion in Gegenwart von Ganciclovir bzw. von Diphtherie Toxin-A angewendet. Geneticin oder G418 ist ein Aminoglycosidantibiotikum aus *Micromonospora rhodorangea*. G418 hemmt die eukaryotische und die prokaryotische Proteinsynthese während der Elongation durch eine Interaktion mit dem Dekodierungs Zentrum in der 16s rRNS der ribosomalen 30S Untereinheit. Eine Resistenz gegen G418 wird durch das neo-Gen vermittelt, welches eine Aminoglycosidase-3'-Phosphotransferase

kodiert. Dieses Enzym inaktiviert G418 durch Phosphorylierung seiner 3'-Hydroxylgruppen, wodurch die Interaktion des Antibiotikums mit dem Ribosom inhibiert ist. Ganciclovir ist ein Guanosin-Analog. Es unterscheidet sich von Guanosin in einer acyclischen Seitenkette anstelle der 3'-Hydroxylgruppe. Um anstelle von Guanosin bzw. dem Guanosinnukleotid in die DNS eingebaut zu werden, muss es zunächst in das Trisphosphat überführt werden. Die initiale Umwandlung in das korrespondierende Monophosphat kann nur durch virale Kinasen erfolgen. Eine solche virale Kinase ist die Thymidinkinase, die nur dann in den ES-Zellen exprimiert wird, wenn eine zufällige Integration der Targeting-DNS in das ES-Zell Genom stattgefunden hat. Bei korrekter regelrechter Integration der Targeting-DNS wird das Thymidinkinase-Gen dagegen nicht exprimiert. In den Zellen, die also die Thymidinkinase exprimieren, entsteht das Monophosphat von Ganciclovir; zelluläre Kinasen führen dann zur Bildung des Di- und Triphosphats. Das Triphosphat von Ganciclovir hemmt die DNS-Replikation da wegen der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe keine weiteren Nucleoside verknüpft werden können. Außerdem bleibt die Polymerase am eingebauten Ganciclovir fixiert. Diphtherie Toxin-A wird vom *Corynebacterium diphtheriae* gebildet und wirkt z.B. beim Menschen schon in Konzentrationen von 100 ng/kg Körpergewicht letal. Das Toxin wird von dem Gen ,tox' kodiert und ist ein bimodales Protein. Es kann durch Proteasen in ein N-terminales A-Fragment und ein C-terminales B-Fragment gespalten werden. Das B-Fragment bindet an der Zelloberfläche an den membranständigen Heparin-binding EGF-like growth-factor. Dann wird durch Proteasen das N-terminale 21 kDa A-Fragment freigesetzt, das in der Zelle als ADP-Ribotransferase wirkt und auf diese Weise den Elongationsfaktor EF2 inaktiviert. Da das Targetingkonstrukt in meinem Experiment mittels Elektroporation in das Innere der ES-Zellen gebracht wird, wurde als Negativselektionskassette nur der Abschnitt des tox-Gens verwendet, der das Diphtherie Toxin-A Fragment kodiert. Wie im Falle des Thymidinkinase-Gens wird das Diphtherie Toxin-A Fragment Gen nur dann exprimiert, wenn keine regelrecht homologe Rekombination stattgefunden hat. Zellen, die das Diphtherie Toxin-A Fragment exprimieren, sterben ab.

- 24 Stunden nach der Elektroporation wird mit der G418-Selektion begonnen: Je nach verwendetem Targetingkonstrukt werden 350 µg/ml oder 250 µg/ml einsetzen. In unserem Labor durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt dass die nicht transfizierten R1 ES-Zellen bereits in Gegenwart einer G418-Konzentration von 200 µg/ml absterben.
- Bei Verwendung des Thymidinkinase-Gens im Targetingkonstrukt, wird 48 Stunden nach der Elektroporation zusätzlich zu G418 Ganciclovir in einer Konzentration von 2 µM ins Medium gegeben. Insgesamt 8 Tage, d.h. bis Tag 10 nach der Elektroporation in Gegenwart von Ganciclovir selektionieren, danach nur noch in Gegenwart von G418.
- Täglicher Mediumwechsel mit Selektionsmedium; wenn viele losgelöste, tote Zellen bzw. Zelltrümmer identifiziert werden auch öfters.
- Ungefähr zwei Tage nach Beginn der G418 Selektion beginnen die ES-Zellen abzusterben.

- Vier Tage nach Beginn der G418 Selektion beginnen vereinzelte Zellkolonien zu wachsen. Sind diese Kolonien so groß, dass man sie mit einem 2,5er Objektiv unter dem Stereomikroskop gut erkennen kann, wird mit der Isolation der Kolonien begonnen. Idealerweise sollte jede Kolonie von einer einzigen ES-Zelle abstammen, also aus genetisch identischen ES-Zellen bestehen. Eine solche Kolonie identischer Zellen nennt man Klon.
- Die einzelnen Zellklone werden über einen Zeitraum von 7 bis 10 Tagen isoliert. Die Geschwindigkeit mit der die ES-Zellklone wachsen und die Menge der Klone variiert von Experiment zu Experiment. Es sollten mindestens 500 unabhängige Zellklone/Kolonien gepickt werden, insbesondere wenn keine Negativselektion verwendet wird.

6.3.2.4 ISOLIERUNG SELEKTIONSUNEMPFLINDLICHER ES-ZELLKLONE

Ein Tag bevor mit der Isolierung der selektierten Klone begonnen wird, müssen Feederzellen auf 96-Lochplatten ausgesät werden. Da 1 Kryoröhrchen Feederzellen ausreichend ist für eine Zellkulturflasche von 150 cm² Oberfläche, wird folgendermaßen vorgegangen:

- 1 Kryoröhrchen auftauen, die Zellsuspension in 135 ml EF-Medium, aufgeteilt in drei Portionen zu jeweils 45 ml, aufnehmen.
- Dann jeweils 300 µl dieser Suspension in ein Loch einer 96-Lochplatte aussäen; dabei nicht alle Vertiefungen der 96-Lochplatte verwenden, sondern nur 4 Reihen. Der Grund für diese Vorgehensweise besteht darin, dass alle Klone einer Platte auf einmal eingefroren werden müssen und es einfacher ist 48 Zellklone im gleichen Wachstumsstadium zu isolieren als 96.
- n jeweils 48 Löcher von insgesamt neun 96-Lochplatten werden Feederzellen ausgesät. drei Platten dienen dabei als Masterplatten 1, 2 und 3. diese Platten werden eingefroren um die Zellen zu konservieren. Parallel zu jeder Masterplatte werden zwei so genannte DNS-Platten angelegt, in welche die gleichen Zellen ausgesät werden, wie in die zugehörige Masterplatte. Aus den Zellen auf den DNS-Platten wird die genomische DNS für die Analyse der erfolgten Rekombination mittels Southern Blot isoliert.
- Am nächsten Tag Mediumwechsel mit EF- Medium.
- Klone die isoliert werden können müssen etwa 50 bis 100% des Sichtfeldes bei Inspektion mit dem 10er Objektiv bedecken und gut sichtbar sein mit dem 2,5er Objektiv des Stereomikroskops.

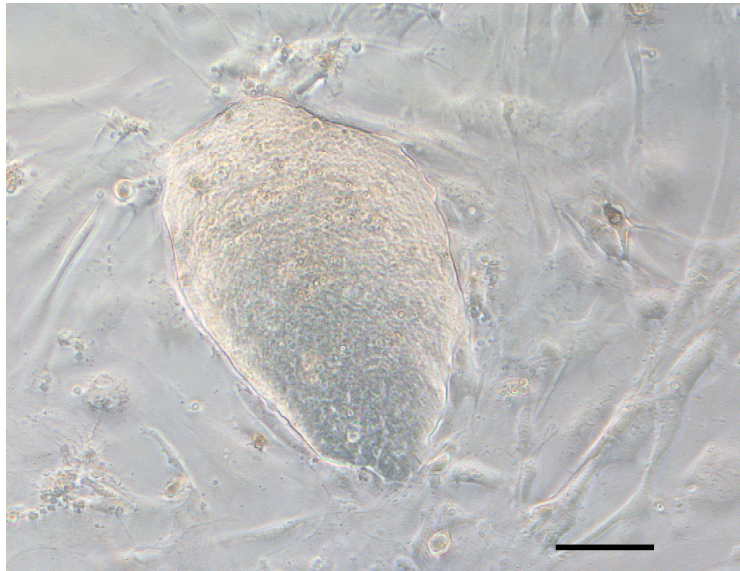


Abbildung 6-4 ES-Zellklon mit geeigneter Morphologie.
Der schwarze Balken entspricht 100 µm.

Ein ES-Zellklon mit geeigneter Größe und Morphologie ist in Abbildung 6-4 abgebildet.

- Vor Beginn der Isolierung der Klone wird auf die Master- und die DNS-Platten, auf welche die Klone ausgesät werden sollen, 240µl ESL-Medium gegeben.

- Das Stereomikroskop ist gründlich zu säubern und wird anschließend unter eine Sicherheitswerkbank gestellt; eine 200 µl Pipette, gestopfte Spitzen und ein Abfallbehälter muss unter der Sicherheitswerkbank bereitstehen.
- Auf einer 96 Lochplatte werden in der ersten und der letzten Reihe, d.h. in 2 mal 12 Vertiefungen, jeweils 60 µl 1 x Trypsin vorlegt und die Platten anschließend in den Brutschrank gestellt.
- Die Petrischalen, von denen Klone isoliert werden sollen, sowie die vorbereitete 96-Lochplatte mit 1 x Trypsin unter die Sterilwerkbank stellen. Petrischale unter das Stereomikroskop stellen und ES-Zellklon (Abbildung 6-5) durch umzirkeln mit der Pipette von der Feederzellschicht ablösen.
- Zellklon durch leichtes Ansaugen mit der Pipette einfangen; dabei darf nur ganz wenig Medium mit eingesaugt werden.
- Zellklon in ein mit Trypsin gefülltes Loch überführen und Zellen durch auf- und abpipettieren homogen suspendieren.
- Neue Pipettenspitze aufsetzen und den nächsten Klon suchen.
- Wenn 12 Klone isoliert sind, - d.h. eine Reihe Vertiefungen der 96er Platte sind gefüllt – wird die Platte unter die zweite Sicherheitswerkbank gebracht.
- Die Masterplatte wird unter die zweite Sicherheitswerkbank gebracht.
- Mit einer 200µl Pipette wird der in Trypsin resuspendierte Zellklon in die entsprechende Vertiefung der Master-Platte mit Feederzellen und 240 µl ESL-Medium überführt, einige Male auf und ab pipettiert und die Trypsin-Vertiefung noch ein Mal gespült.
- Wenn alle 12 Klone auf die Masterplatte überführt sind, werden die beiden DNS-Platten unter die zweite Sicherheitswerkbank gebracht.
- Von der Masterplatte werden jeweils 50 µl in die korrespondierende Vertiefung der beiden DNS-Platten transferiert.
- Die Zellen werden für 24 h in ESL-Medium kultiviert, so dass sie sich von der Isolationsprozedur erholen können.
- Nach 24 h Mediumwechsel und Zugabe von G418-Selektionsmedium.
- Danach bei der Masterplatte täglicher G418- Mediumwechsel; bei den DNS-Platten erfolgt kein weiterer Mediumwechsel. diese Zellen wachsen bis zur Konfluenz, dann wird aus ihnen jeweils die genomische DNS gewonnen.

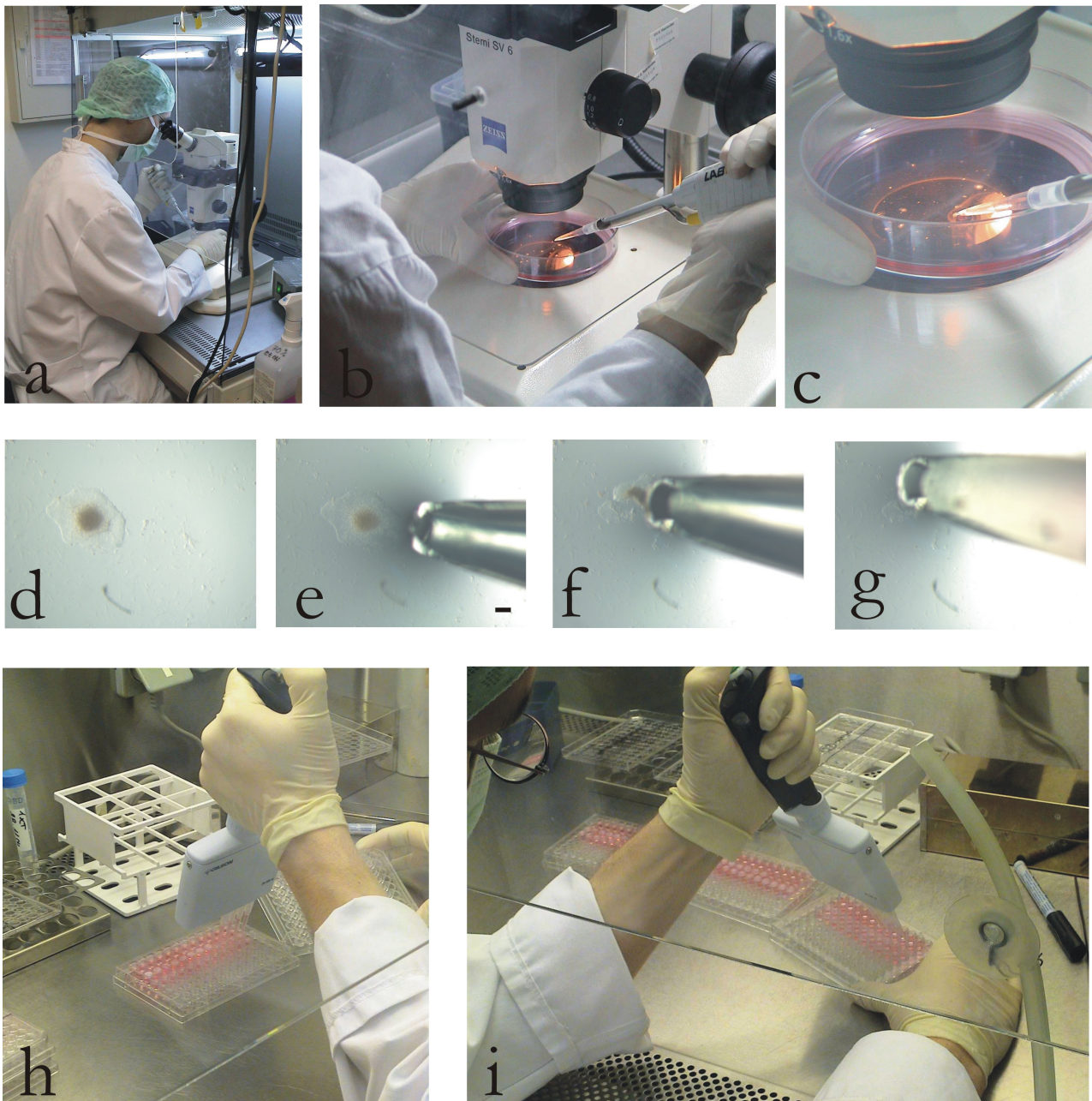


Abbildung 6-5 Isolation eines ES-Zellklons

a: Arbeit unter dem Stereomikroskop in einer sterilen Werkbank b: Identifizieren eines geeigneten Zellklons in der Petrischale c: Isolation eines ES-Zellklons. d-g: Aufnahmen durch das 2,5er Objektiv des Stereomikroskops d: ES-Zellklon. e: ES-Zellklon mit Pipettenspitze; der schwarze Balken entspricht 100 μm . f: Loslösen des Klons von den Feederlayerzellen. g: Aufsaugen des Klons. h: Überführen der in Trypsin resuspendierten ES-Zellen in das entsprechende Loch einer mit ESL gefüllten Lochplatte. i: Duplizieren der ES-Zellklone von der Masterplatte auf die beiden DNS-Platten.

6.3.2.5 ERNTEN DER EINZELNEN ES-ZELLKLONE

Da die einzelnen Zellklone in der Regel verschieden schnell wachsen, muss ein Kompromiss gefunden werden hinsichtlich des Zeitpunktes an dem die Masterplatte eingefroren wird. Vor dem Einfrieren wird jeder Klon wie folgt (Abbildung 6-6) bewertet:

1 = klein
2 = mittel
3 = groß

k = teilweise konfluent
k! = größtenteils konfluent
d = differenziert

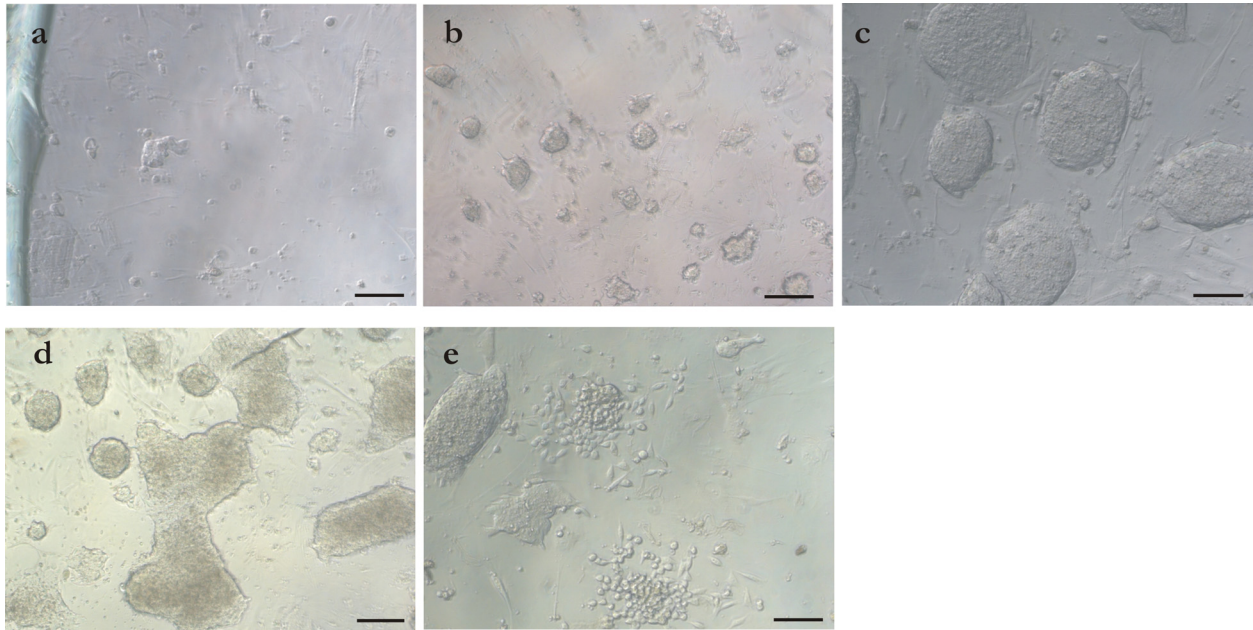


Abbildung 6-6 Bewertung von ES-Zellklonen verschiedener Größe und Morphologie.

Bewertung: 1, klein (a), 2, mittel (b), 3, groß (c), k, teilweise konfluent (d) und d, differenziert (e).

Die schwarzen Balken entsprechen 100 µm.

- Nach dem Bewerten der Master-Platte das Medium absaugen.
- Zweimal mit 250 µl PBS ohne Ca/Mg + EDTA pro Vertiefung waschen.
- Pro Vertiefung 50 µl 1 x Trypsin zugeben, 4 min bei 37 °C inkubieren.
- Pro Vertiefung 230 µl einer eiskalten ESL/12,2% DMSO-Lösung zugeben, wobei die finale Konzentration an DMSO 10% beträgt.
- Mit 200 µl Pipette mit gestopfter Spitze gut mischen.
- Platte mit Parafilm abdichten.
- Platte auf Trockeneis für 15 min langsam einfrieren lassen.
- Dann bei -80 °C lagern; unter diesen Bedingungen sind die Zellen maximal 3 Monate haltbar.
- Wenn die Zellen in den DNS-Platten Konfluenz erreicht haben, wird aus den einzelnen Vertiefungen mit einem der in Kapitel 6.2.14.1 beschriebenen Protokolle die genomische DNS isoliert und mit Hilfe von Southern Blots charakterisiert.

6.3.2.6 AUFTAUEN VON ES-ZELLEN VON 96-LOCH PLATTEN

Wenn bei der Analyse der genomischen DNS mittels Southern Blot ein potentiell homolog rekombinanter Klon identifiziert wird, gilt es diesen so schnell wie möglich aufzutauen, die Zellen zu expandieren und anschließend in flüssigem Stickstoff bis zur Blastozysteninjektion zu lagern. Hierzu die einzelnen Schritte:

- Masterplatte im Brutschrank bei 37 °C kurz antauen.

- Mit der 1000 µl Pipette warmes ESL-Medium in die entsprechende Vertiefung pipettieren und dadurch die Zellsuspension auftauen.
- Anschließend ES-Zellen in 10 ml ESL überführen.
- 10 Minuten bei 1 000 rpm zentrifugieren.
- Überstand absaugen, 10 ml ESL-Medium auf das Sediment geben.
- 10 Minuten bei 1 000 rpm zentrifugieren.
- Überstand absaugen, Zellen in 300 µl ESL-Medium resuspendieren.
- Zellen auf 1 Loch einer 96-Lochplatte aussäen.
- Täglicher Mediumwechsel mit G418-Selektionsmedium.
- Passagieren auf eine Vertiefung einer 24-Lochplatte, im nächsten Schritt auf eine Vertiefung einer 6-Lochplatte, dann auf vier Vertiefungen einer 6-Lochplatte und parallel auf sechs Vertiefungen einer 96-Lochplatte.
- Danach werden die Zellen von der 6-Lochplatte geerntet und in zwei Kryoröhrchen eingefroren. Von der 96-Lochplatte wird erneut die genomische DNS isoliert und nochmals mit den drei Sonden mittels Southern Blot auf die erfolgte homologe Rekombination kontrolliert.

6.3.3 INJEKTION REKOMBINANTER ES-ZELLKLONE IN BLASTOZYSTEN

Die Herstellung scheinchwangerer Ammenweibchen, die Blastozystenisolierung, die Injektion der ES-Zellen und der Transfer der Blastozysten in den Uterus der Ammenmütter wurden von Frank Zimmermann und seinen Mitarbeitern im Biotechnologielabor des Zentralen Tierlabors der Universität Heidelberg durchgeführt.

6.3.3.1 HERSTELLUNG SCHEINSCHWANGERER AMMENWEIBCHEN

Als Ammenmütter werden 8-16 Wochen alte C57bl/6 Weibchen eingesetzt, die mit vasktomierten Männchen verpaart und am nächsten Tag auf das Vorhandensein eines Vaginalplugs hin untersucht wurden.

6.3.3.2 BLASTOZYSTENISOLIERUNG

Mit Hilfe eines hormonellen Stimulus wird eine Superovulation ausgelöst, d.h. die Anzahl der sich entwickelnden Eizellen und damit die Menge isolierbarer Blastozysten wird gezielt erhöht. Es wurden C57bl/6 Mäuse nach folgendem Zeitplan behandelt:

- Tag 0: 10 U Pregnant Mare Serum (PMS) i.p. injizieren.
- Tag 2: 10 U humanes Choriongonadotropin (HCG) i.p. injizieren, Verpaarung ansetzen.
- Tag 3: Weibchen mit Vaginalplug absetzen, d.h. von dem Männchen trennen und in eigenem Käfig unterbringen.
- Tag 5: Blastozystenisolierung

Zur Blastozystenisolierung werden die Spendertiere getötet. Das Fell wird mit 70% Alkohol besprüht und die obere Hautschicht wird ohne Verletzung der Peritonealhöhle eröffnet und zur Seite präpariert.

Dann wird die Peritonealhöhle geöffnet und der Uterus mit anhängendem Eileiter freipräpariert. Nachdem Fett und Blutgefäße entfernt wurden wird der Eileiter in eine sterile Petrischale mit M2 Medium überführt. Zum Ausspülen der Uteri wird von einer 26 Gauge Nadel die Spitze abgeschnitten und die unteren 1-2 cm der verbleibenden Nadel werden in einem 45 ° Winkel umgebogen. Die Nadel wird dann auf eine mit M2-Medium gefüllte Spritze gesteckt und die Nadel in das vaginale Ende des Uterus eingeführt. Durch Zufuhr von Medium in den Uterus wird der Übergang zum Eileiter eindeutig sichtbar, dieser wird aufgeschnitten und die Blastozysten so in das Medium gespült. Nachdem sich die Blastozysten abgesetzt haben, werden sie mit einer Pipette aus dem Medium aufgesammelt, in M16 Medium gespült und in Mikrotropfenkulturen mit vorinkubiertem M16 Medium unter Paraffinöl bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Injektion aufbewahrt.

6.3.3.3 VORBEREITUNG DER ES-ZELLEN ZUR BLASTOZYSTENINJEKTION

Für die Blastozysteninjektion müssen Zellen von einer 75 cm²-Zellkulturflasche bei optimaler Zelldichte geerntet werden. Um sicherzustellen dass am Tag der Injektion genug Zellen vorhanden sind, werden die zu injizierenden Klone sieben Tage vor dem Injektionstermin in Kultur genommen. Da beim Einfrieren der Klone immer vier 6-Lochplatten Löcher also Zellen von 38,4 cm² in zwei Kryoröhrchen eingefroren wurden, kann beim Auftauen jeder Klon auf eine 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät werden.

- Einen Tag vor der Inkulturnahme der ausgewählten Klone müssen die Feederzellen in Kultur genommen werden. Für jeden aufzutauenden Klon sollten Feederzellen in eine 25 cm² Zellkulturflasche, in vier 75 cm²-Zellkulturflaschen und in eine Reihe Vertiefungen von 96-Lochplatten ausgesät werden.
- Jeder ES-Zellklon wird aufgetaut und auf eine 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät.
- Nach zwei Tagen sind die ES-Zellen in der Regel dicht genug um sie im Verhältnis 1 zu 3 auf eine 75 cm²-Zellkulturflasche zu passagieren.
- Zwei Tage vor der Blastozysteninjektion werden die Zellen zum letzten Mal passagiert. Diesmal in verschiedenen Verhältnissen (zum Beispiel 50%, 30%, 20%), um am Tag der Injektion ES-Zellen verschiedener Dichte zur Auswahl zu haben.
- Am Morgen der Blastozysteninjektion werden die ES-Zellen mit der schönsten Morphologie und der besten Dichte ausgewählt. Eine schöne Morphologie bedeutet eine gleichmäßig runde Form, eine glatte Oberfläche und das Fehlen von sichtbaren Granula in der Zelle. 45 Minuten vor Beginn des Erntens wird ein Mediumwechsel mit ESL-Medium durchgeführt.
- Zweimal mit je 10 ml PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ + EDTA waschen.
- Trypsinieren: Jetzt nur eine Minute trypsinieren, um möglichst wenige Feederzellen abzulösen.
- ES-Zellen mit einer polierten Pasteurpipette mit 12 ml ESL-Medium überführen.
- 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Zellpellet in 14 ml ESL-Medium resuspendieren.
- Je 7 ml Zellsuspension auf eine sterile Petrischale geben.

- 25 Minuten bei 37 °C inkubieren.
- Überstände auf neue sterile Petrischale geben.
- 25 Minuten bei 37 °C inkubieren.
- 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Zellpellet in 1,5 ml ESL-Medium/HEPES/P-S mit einer polierten Pasteurpipette resuspendieren.
- Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmen: Die Konzentration sollte mindestens 100.000 Zellen pro ml Medium betragen. Der im ESL-Medium enthaltenen HEPES-Puffer hält den pH-Wert stabil, so dass die Zellen für mehrere Stunden bei 4 °C aufbewahrt werden können. Der Antibiotikamix aus Penicillin und Streptomycin dient dazu, mögliche Infektionen während des Injektionsvorgangs zu verhindern. Dies ist notwendig, da nicht zur Injektion genutzte Zellen nach der Blastozysteninjektion noch mal expandiert werden, um genomische DNS für eine weitere Kontrolluntersuchung mittels Southern Blot zu gewinnen.
- Die Zellsuspension auf Eis nach Heidelberg transportieren.
- Nach der Blastozysteninjektion die nicht benötigten Zellen wieder zurück transportieren.
- 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugieren.
- Überstand absaugen und Zellsedimente in je 3,5 ml G418-Selektionsmedium suspendieren.
- Jeweils 0,25 ml pro Vertiefung einer 96-Lochplatte aussäen, also 12 Vertiefungen pro Klon.
- Am nächsten Tag Mediumwechsel mit G418-Selektionsmedium.
- Die ES-Zellen bis zur Konfluenz wachsen lassen.
- Die genomische DNS wird nach dem ‚Flöckchen‘-Protokoll 6.2.14.1 isoliert und ein letztes Mal mittels Southern Blot auf die homologe Rekombination hin kontrolliert.

6.3.3.4 INJEKTION DER ES-ZELLEN

In eine Injektionskammer werden 10 Blastozysten sowie mehrere hundert ES-Zellen gegeben. Die ES-Zellen sind von den Feederzellen aufgrund ihrer geringeren Größe unterscheidbar. Zuerst werden die ES-Zellen in der Injektionskapillare gesammelt, dabei werden nur ES-Zellen gewählt die eine gleichmäßig runde Form, eine glatte Oberfläche und ein nichtgranuliertes Inneres haben. Dann wird die Blastozyste mit der Haltekapillare so orientiert, dass sich die innere Zellmasse an der Haltekapillare befindet. Die Blastozyste wird so fokussiert, dass sich die Injektionskapillare in der gleichen Ebene befindet wie die dünnste Stelle der Blastozyste. Jetzt wird die Injektionskapillare in die Blastozyste gestochen und acht bis elf ES-Zellen werden möglichst direkt auf die innere Zellmasse gegeben. Dann wird die Injektionskapillare wieder herausgezogen und die Blastozyste freigegeben. Injizierte Blastozysten kollabieren zunächst, zeigen aber bereits ein bis vier Stunden nach der Injektion im Kulturmedium wieder eine normale Morphologie.

6.3.4 UTERUSTRANSFER

Zum Transfer werden vier bis sechs der mit ES-Zellen injizierten Blastozysten in M2 Medium perlschnurartig in einer Transferpipette angeordnet und durch eine Luftblase in beide Richtungen

begrenzt. Nach Narkotisierung der Ammenweibchen mit Rompun/Ketamin wird das Fell der Tiere im Rückenbereich mit 70% Ethanol benetzt und mit einem Schnitt entlang des Rückrades in Höhe der Uteri eröffnet. Nach Lokalisierung der Eileiter wird das Peritoneum eröffnet und ein Uterushorn an dem anhängenden Fettgewebe herausgezogen. An diesem Fettgewebe wird das Uterushorn mit Hilfe einer Klemme fixiert. Mit einer Injektionsnadel wird das Uterushorn in Richtung Uterushöhle punktiert. In die Punktionsstelle wird jetzt die Transferpipette eingeführt und die Blastozysten in den Uterus transferiert. Die aufgenommenen Luftblasen dienen dabei als optisches Hilfsmittel. Nach der Injektion wird das Uterushorn ohne Druck in den Peritonealbereich zurückgeführt. Bei dem zweitem Uterushorn wird nach dem gleichen Schema verfahren.

6.3.5 VERPAARUNG DER CHIMÄREN TIERE

Die verwendeten R1 ES-Zellen tragen einen männlichen Chromosomensatz. Entsprechend werden von den Tieren, die von den Ammenmüttern geboren werden, nur die chimären Männchen mit C57bl/6 und 129SvJ Weibchen weiter verpaart. Nur bei Männchen besteht die Chance, dass die R1 ES-Zellen das Geschlecht des Tieres bestimmt haben und damit keimbahngängig sind. Da die verwendeten ES-Zellen das Agouti-Gen tragen, kann man heterozygote Nachkommen aus Verpaarungen mit C57bl/6 anhand ihrer cremefarbenen Fellfarbe erkennen.

6.4 METHODEN DER MAUSZUCHT

6.4.1 SPF-TIERHALTUNG

Streuungen bei Tierversuchsvorhaben werden durch die interindividuelle Variabilität der Tiere, durch das Experiment und durch Faktoren verursacht, die mit der Tierhaltung zusammenhängen. Durch Kontrolle letzterer Faktoren läßt sich die Aussagefähigkeit von Tierversuchen verbessern und insbesondere die im Experiment benötigten Tierzahlen erheblich reduzieren. Das ‚spezifiziert pathogen frei‘-Konzept - kurz SPF genannt - bei der Organisation der Tierhaltung hat das Ziel, den Einfluss der belebten Umwelt möglichst gering zu halten und die Tiere von pathogenen Keimen frei zu halten. Um einen hohen Hygienestatus zu gewährleisten, ist eine sorgfältige bakteriologische und virologische Überwachung der Zuchten unerlässlich. In unserer SPF-Versuchstierhaltung werden regelmäßig im Abstand von sechs Monaten jeweils sechs Tiere auf die Infektion der in Tabelle 6-3 aufgeführten Krankheitserreger hin getestet.

Tabelle 6-3 Liste der Krankheitserreger für die serologischen Untersuchungen

Viren:	Mouse hepatitis virus (MHV) Reovirus 3 (Reo 3) GDVII (Theiler's) virus (TMEV) Pneumonia virus of mice (PVM) Sendai virus Minute virus of mice (MVM) Polyoma Virus Rota (EDIM) Virus
Bakterien:	Ausstrich von Fäzes auf MacConkey-Agar und Kochblut-Agar. Überprüfung auf Abwesenheit von pathogenen Bakterien.
Parasiten und Protozoen:	Mikroskopische Analyse von Fäzes.

Einschleusen der chimären Tiere

Die chimären Nachkommen, die nach der Blastozysteninjektion geboren wurden, konnten im Alter von vier bis sechs Wochen im Zentralen Tierlabor der Universität Heidelberg abgeholt und in die Quarantäneeinheit unserer Versuchstierhaltung eingebracht werden. Zur serologischen Untersuchung auf Krankheitserreger wurde drei Tieren retrobulbär Blut entnommen.

Avertin-Narkose und retrobulbäre Blutentnahme

Avertin-Lösung (2,2,2-Tribromethanol) wird zur Narkose bei Nagetieren eingesetzt. Dabei wird Avertin in einer Dosis von 0,75 mg pro g Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Zersetzte Lösungen sowie Kristallbildung in der Lösung führen durch Nekrose im Bauchraum zum Tod des Tieres. Deshalb ist es wichtig stets frisch zubereitete Avertin-Lösung zu verwenden.

- Herstellung der Stocklösung: 10g 2,2,2-Tribromethanol in 10 ml tert-Amylalkohol lösen. Diese Lösung kann lichtgeschützt bei Raumtemperatur für sechs Monate aufbewahrt werden.
- Herstellung der Gebrauchslösung: 1 ml Stocklösung zu 39 ml 37 °C warmen PBS geben. Unter Schütteln bei 37 °C lösen. Die Gebrauchslösung lichtgeschützt bei + 4 °C aufbewahren.
- Anästhesie: 300 µl Gebrauchslösung pro 10 g Körpergewicht der Maus i.p. injizieren

Retrobulbäre Blutentnahme

Zur retrobulbären Blutentnahme wird die Maus wie beschrieben mit Avertin narkotisiert; anschließend wird eine heparinisierte Glaskapillare mit vorsichtiger Drehbewegung hinter das Auge geführt und der Druck auf die Kapillare solange erhöht bis Blut in die Kapillare fließt.

Untersuchungen zur Aufrechterhaltung des Hygienestatus

Blut und Fäzes wurde regelmäßig auf die in Tabelle 6-3 aufgelisteten Krankheitserreger hin getestet:

6.4.2 MARKIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER TIERE

Zur Identifizierung werden Tiere mit einem Metallklips am Ohr markiert. Tiere, die nicht weitergezüchtet werden, wurden anderen Arbeitsgruppen zur Organentnahme zur Verfügung gestellt.

Die Ohrklips wurden mit Hilfe einer speziellen Zange am Ohr angebracht.

6.4.3 GENOTYPISIERUNG DER MÄUSE MITTELS PCR

Zur Genotypisierung wird, wie in 6.2.14.2 beschrieben, aus einer Gewebebiopsie genomische DNS isoliert. Von dieser DNS werden dann in der Regel 2,0 µl für die Genotypisierungs-PCR eingesetzt. Als Primer werden Oligodesoxynukleotide eingesetzt, mit denen man spezifisch zwischen Wildtyp-Allel und rekombinantem Allel unterscheiden kann. Die amplifizierten Fragmente sollten zwischen 100 und 500 bp lang sein, damit eine kurze Elongationszeit verwendet werden kann und so die Gesamtdauer des PCR-Protokolls verkürzt wird. Als Polymerase wird in unserem Labor die nach dem Protokoll von (Engelke et al., 1990) selbst hergestellte Taq-Polymerase verwendet. Die PCR-Reaktion wurde wie unter 6.2.10 beschrieben durchgeführt.

7 ERGEBNISSE

7.1 KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES TRPV6 GENS VON MAUS

7.1.1 DAS TRPV6 GEN UND CDNS

Die cDNS des menschlichen TRPV6 Gens wurde 2001 mit Hilfe von poly(A)⁺-RNS aus Plazenta kloniert (Wissenbach et al., 2001). Die sequenzbasierte Suche nach einem zu TRPV6 von Mensch orthologen Gen von Maus mit Hilfe des BLAST Algorithmus (Altschul et al., 1997) in der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information) führte zur Identifikation des Klons AF336378. AF336378 ist etwa 170 kb groß und enthält genomische DNS eines Teils vom Chromosom 6 von Maus. Unter Zuhilfenahme des Genidentifizierungs-Algorithmus Genscan (Burge and Karlin, 1997) in der HUSAR-Datenbank (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) konnte ich in diesem Klon die Exon/Intron-Struktur des Maus-TRPV6 Gens ableiten (Abbildung 7-1).

Das Maus TRPV6 Gen besteht aus 15 Exonabschnitten die sich über eine Region von etwa 15,7 kb erstrecken. Die Vermutung, dass es sich bei diesem Gen um das Orthologe zu dem menschlichen TRPV6-Gen handelt, wird dadurch bestärkt, dass beide Gene in ihrem genomischen Locus von jeweils orthologen Genen flankiert sind (Abbildung 7-1 (A)). Zur Klonierung der TRPV6 cDNS aus Maus wurde poly(A)⁺-RNS von Plazentagewebe gewählt, da auch die TRPV6 cDNS von Mensch aus poly(A)⁺-RNS von Plazenta kloniert worden war. Bei orthologen Genen besteht die Möglichkeit, dass auch das Expressionsmuster ähnlich ist. Es wurde zunächst aus Mausplazenta die Gesamt-RNS und anschließend die poly(A)⁺-RNS isoliert. Mit der poly(A)⁺-RNS als Matrize wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase und oligo-dT-Oligodesoxynukleotiden als Primer ein DNS-Einzelstrang synthetisiert. Ausgehend von dem Datenbankeintrag AF336378 wurden die beiden Oligodesoxynukleotide mcat01 und mcat04 abgeleitet. Das Oligodesoxynukleotid mcat01 umfasst die Nukleotide 1 bis 17 der DNS, die das vorhergesagte TRPV6 Protein von Maus kodiert. Das Oligodesoxynukleotid mcat04 umfasst 19 Nukleotide und ist in seiner Sequenz komplementär zu den Nukleotiden 2165 bis 2184 der oben genannten DNS. Innerhalb dieser DNS-Sequenz liegt das vorhergesagte Stop-Kodon an Position 2182 bis 2184. Mit diesen beiden Oligodesoxynukleotiden und der Einzelstrang-DNS konnte mit PCR eine cDNS von 2184bp amplifiziert werden. Die cDNS wurde in die EcoRI-Schnittstelle des pBluescript KS Plasmids subkloniert und beide Stränge sequenziert. Zwei unabhängige Klone, Klon 3.1.5 und Klon 3.2.6, waren hinsichtlich ihrer Sequenzen vollständig identisch; sie stimmten ebenso vollständig mit der vorausgesagten cDNS-Sequenz des Klons AF336378 überein. Die Nukleotidsequenz von Maus TRPV6 wurde in der DDBJ/EMBL/GenBankTM Datenbank unter der Nummer AJ542487 abgelegt.

Diese DNS-Sequenz kodiert ein Protein, das aus 727 Aminosäureresten zusammengesetzt ist. Das korrespondierende Protein von Ratte umfasst ebenfalls 727 Aminosäurereste, das Protein von Mensch

725 Aminosäurereste. Vergleicht man die Proteinsequenzen von Maus und Ratte sind 98,4% der Aminosäurereste identisch; vergleicht man die Sequenzen von Maus und Mensch so sind 89,7% der Aminosäurereste identisch. Um eine Aussage über die mögliche Orientierung des TRPV6 Proteins von Maus in der Plasmamembran zu erhalten wurde nach Kyte-Doolittle ein Hydropathieplot erstellt (Kyte and Doolittle, 1982). Diesem nach sind N- und C-Termini des Proteins sehr hydrophil. Da es keinen Anhalt für ein hydrophobes Signalpeptid am Aminoterminus gibt, liegt dieser Bereich im Zytosol. Weiterhin werden mindestens sechs hydrophobe Sequenzabschnitte vorhergesagt, die jeweils mindestens 19 Aminosäurereste umfassen. Diese hydrophoben Abschnitte repräsentieren wahrscheinlich die die Plasmamembran durchspannenden Sequenzen. In α -helikaler Konformation sind hierzu etwa 19 bis 21 Aminosäurereste notwendig. Zwischen der vorhergesagten fünften und sechsten Transmembrandomäne liegt die Porenregion des TRPV6-Kanalproteins (Abbildung 7-1 (B)). Mit dem Programm PSIPRED (McGuffin et al., 2000) konnten N-terminal des ersten Transmembranabschnitts Region sechs Sequenzmotive identifiziert werden, die Ähnlichkeit zur Konsensussequenz der so genannten Ankyrin-Repeats aufweisen. Ankyrin-Repeats umfassen jeweils etwa 33 Aminosäurereste und es konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden Repeats drei und fünf des TRPV6-Proteins von Mensch an der Dimerisierung zweier TRPV6-Proteine entscheidend beteiligt sind (Erlor et al., 2004). Außerdem konnten zwei Asn-Glycosylierungsstellen an Position 208 und Position 357 der Aminosäuresequenz vorhergesagt werden. Allerdings liegt der Aminosäurerest 208, ein Asparaginrest, intrazellulär und ist deshalb nicht glykosyliert; dagegen liegt der Rest 357 innerhalb der Schleife zwischen den vorhergesagten Transmembrandomänen eins und zwei. Entsprechend des Topologiemodells kann vorausgesagt werden, dass diese Schleife extrazellulär liegt und dieser Rest mit großer Wahrscheinlichkeit auch glykosyliert ist. Die Porenregion ist völlig identisch in den TRPV6-Proteinen von Maus, Mensch und Ratte; sie ist ebenfalls identisch mit der korrespondierenden Sequenz in TRPV5, dem nächsten Verwandten des TRPV6-Proteins. Mittlerweile ist bekannt, dass dieser Sequenzabschnitt, die Aminosäurereste 523 bis 547, die Ionenselektivität des TRPV6-Kanals mitbestimmt und es gibt Hinweise, dass insbesondere der negativ geladenen Aspartatrest an Position 541 die hohe Selektivität des Kanals für Ca^{2+} bestimmt (Nilius et al., 2001). Weiterhin existiert im TRPV6-Protein von Maus eine Bindungsstelle für Calmodulin im Bereich des C-Terminus. Die Bindung von Calmodulin an die entsprechende Bindungsstelle des TRPV6-Proteins von Mensch trägt zur Ca^{2+} -abhängigen Inaktivierung des Ionenkanals bei (Niemeyer et al., 2001).

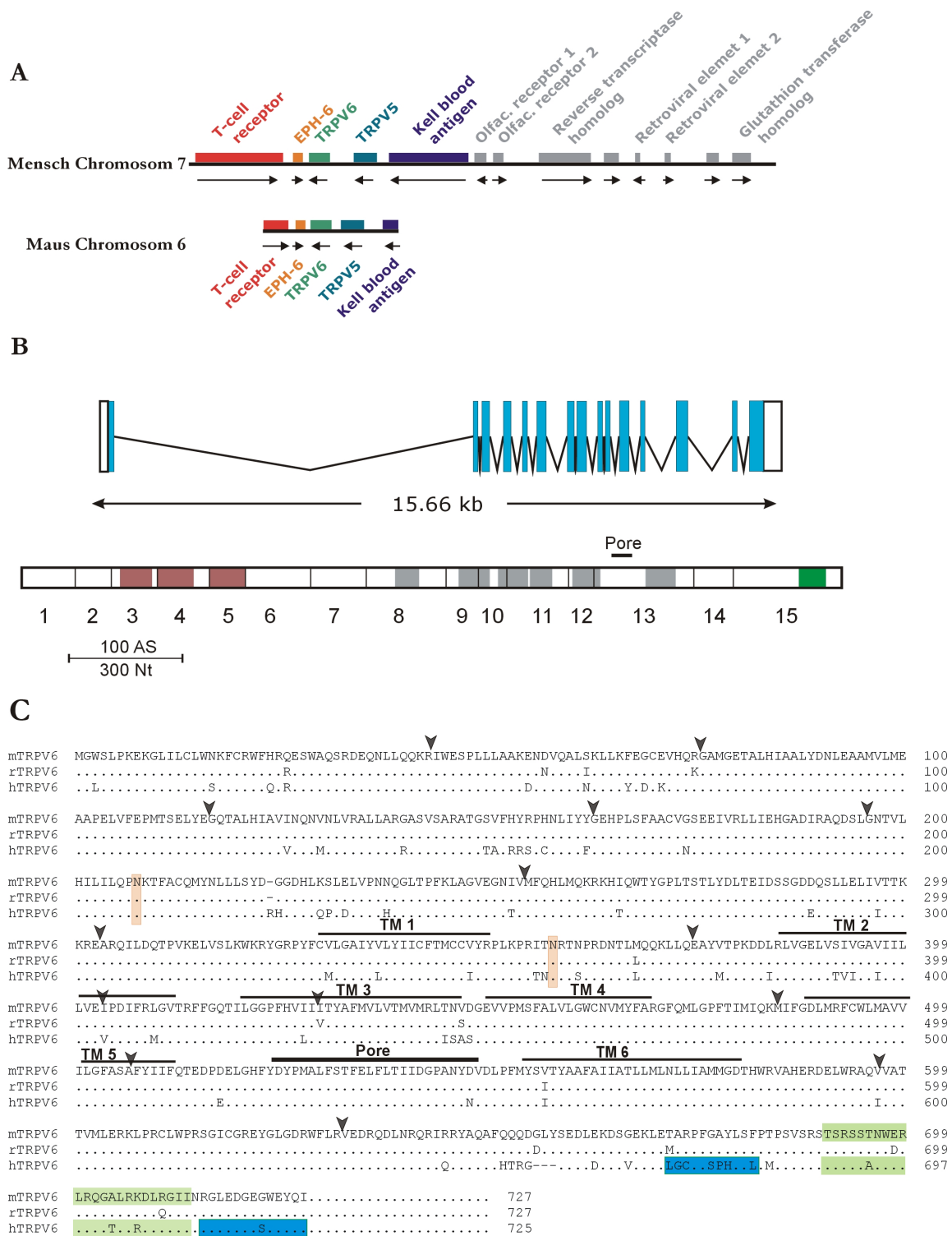


Abbildung 7-1 Maus TRPV6 Gen und cDNS

(A) Vergleich der Region auf dem menschlichen Chromosom 7, die das menschliche TRPV6 Gen beinhaltet, mit der syntenetischen Region auf Maus Chromosom 6. (B) Die Exon-Intron Struktur (kodierende Exons als blaue, nichtkodierende Exons als weiße Rechtecke) von TRPV6 auf Maus Chromosom 6 über einem Diagramm der TRPV6 cDNS. Eingezeichnet sind diejenigen Regionen, die für Ankyrin-Repeats (rot), Transmembransegmente (grau), die putative Pore und die Calmodulin Bindungsstelle (grün) kodieren. (C) Vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenzen von TRPV6 von Maus (AJ542487), von Ratte (NM_053686) und von Mensch (CAC20417). Pfeilspitzen geben die Exongrenzen im TRPV6 Gen von Maus an. Des Weiteren sind die Transmembrandomänen (TM), die putative Porenregion (Pore) die Calmodulin Bindungsstelle (grün), die putativen Glykosylierungsstellen (orange) und die Epitope, gegen die in unserer Arbeitsgruppe Antikörper hergestellt wurden (blau), eingezeichnet. Modifiziert aus (Hirnet et al., 2003).

7.1.2 EXPRESSIONSMUSTER VON TRPV6 VON MAUS

Um das Expressionsmuster des TRPV6 Gens in Geweben von Maus zu untersuchen, wurde zunächst Gesamt-RNS aus Leber, Magen, Darm, Plazenta, Speiseröhre, Hirn, Endothelzellen aus Aorta, Herz, Niere und Bauchspeicheldrüse isoliert. Die poly (A)⁺ RNS wurde aus der Gesamt-RNS angereichert und über ein Agarosegel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, und auf eine Nylonmembran transferiert. Zum Nachweis der TRPV6 cDNS wurden zwei Sonden verwendet, die zusammen den gesamten kodierenden Bereich der TRPV6 cDNS abdecken, die cDNS-Sonden pmCaTL_01 und pmCaTL_02. Sie wurden unabhängig aus der erhaltenen cDNS von Plazenta durch PCR erhalten (Abbildung 7-2). Die dafür verwendeten Oligodesoxynukleotide mcat01 und mcat02 (für pmCaTL_01) bzw. mcat03 und mcat04 (für pmCaTL_02) tragen an ihren 5' Enden jeweils Überhänge, welche die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym EcoRI darstellen. So konnte die amplifizierte DNS in die EcoRI Schnittstelle des Vektors pBluescript II KS kloniert werden. Beide Klone wurden beidsträngig sequenziert und die BamHI-EcoRI-Fragmente aus beiden Klonen als Sonden für den Northern Blot verwendet.

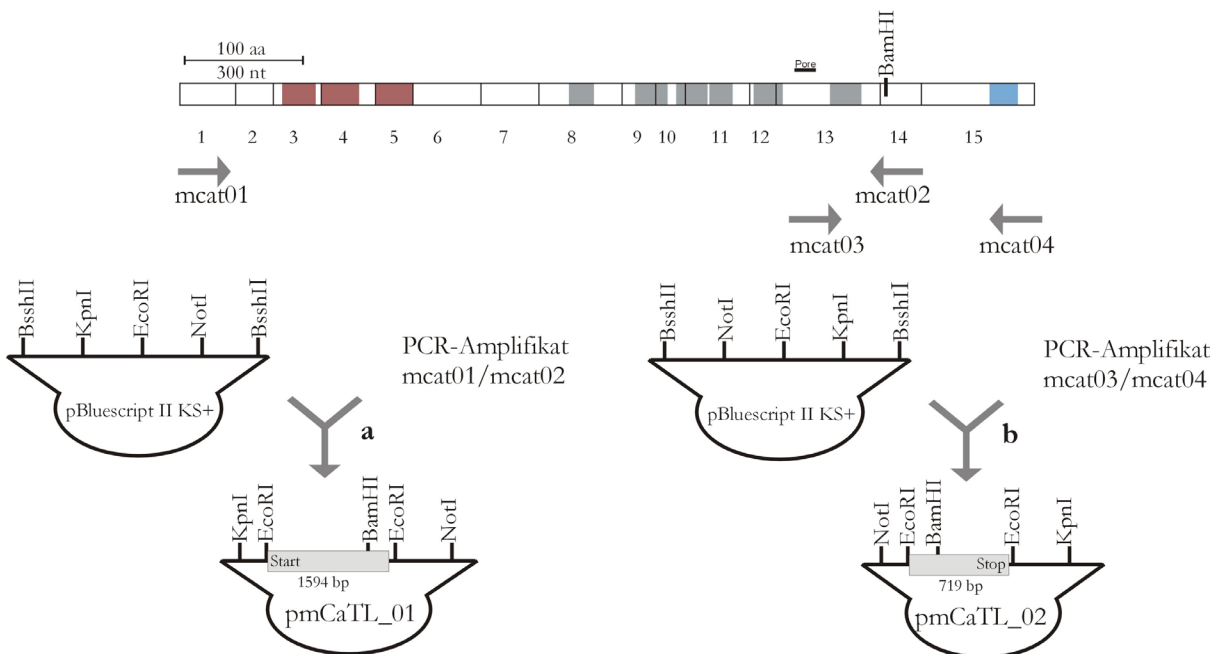


Abbildung 7-2 Klonierung der Northern Sonden zum Nachweis von mTRPV6

Wie der Röntgenfilm des Northern Blots in (Abbildung 7-3) zeigt, werden TRPV6 Transkripte von etwa 3 kb in poly (A)⁺-RNS von Plazenta, Pankreas und – in weit geringerem Ausmaß – von Niere detektiert. Dagegen konnten in poly (A)⁺-RNS von Leber, Magen, Darm, ZNS, Endothelzellen und Herz keine TRPV6 Transkripte nachgewiesen werden. Entweder werden in diesen Geweben keine TRPV6-Transkripte exprimiert oder deren Expression ist so niedrig, dass sie mit der angewendeten Methode nicht detektiert werden können. TRPV6-Transkripte konnten in Geweben von Mensch nur in Plazenta, in Pankreas und in maligne entarteter Prostata nachgewiesen werden, möglicherweise auch

in Darm (Wissenbach et al., 2001). Insofern unterscheidet sich das TRPV6-Expressionmuster in Mausgeweben.

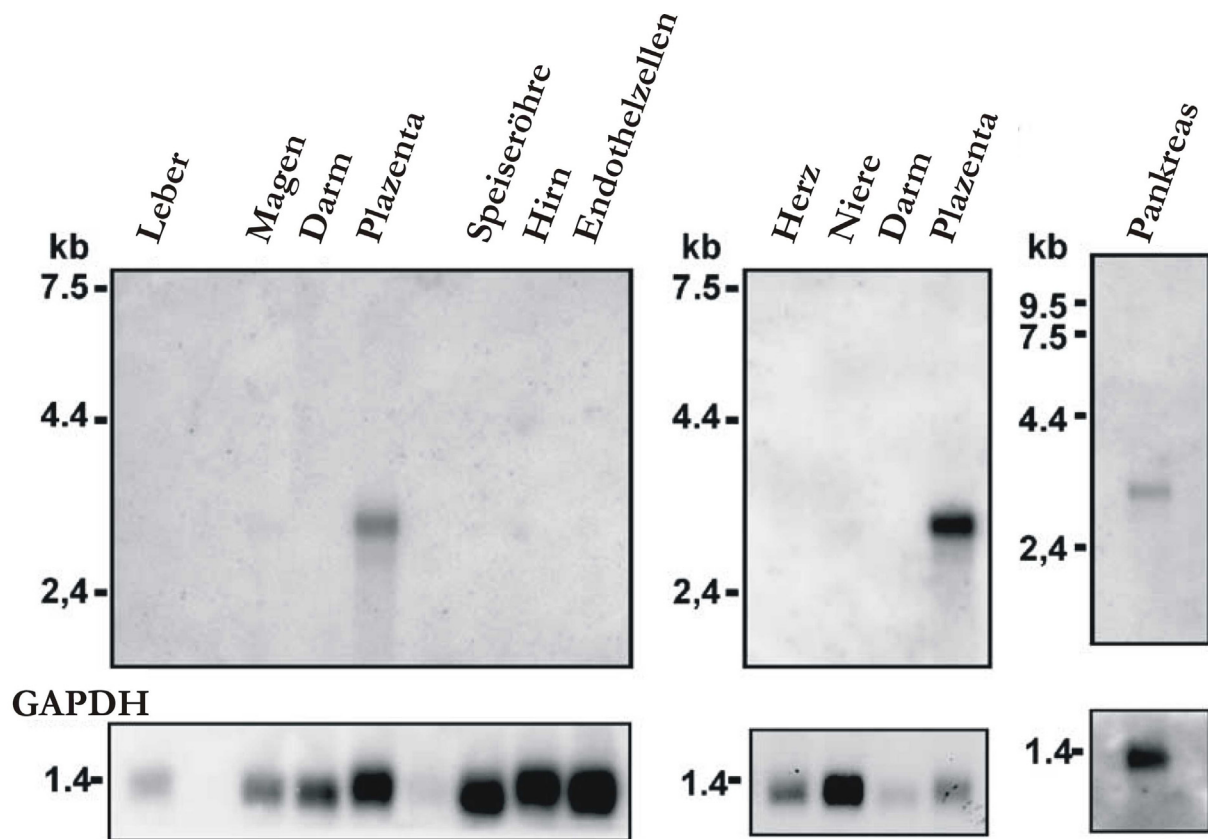


Abbildung 7-3 Maus TRPV6 Expressionsmuster

Maus TRPV6 Transkripte kommen in Plazenta und Pankreas vor, in weit geringerem Ausmaß eventuell auch in Magen und Niere.

7.2 PLANUNG UND ERSTELLUNG DER TARGETINGVEKTOREN FÜR DAS TRPV6 GEN

Für die konditionierte Inaktivierung eines Gens mittels homologer Rekombination gibt es mehrere Alternativen: So kann beispielsweise der Translationsstart des Gens eliminiert werden. Eine weitere Möglichkeit ist es, einen für die Funktion des kodierten Proteins essentiellen Bestandteil des Gens zu eliminieren, bei einem Ionenkanal zum Beispiel den Teil des Gens, der die ionenleitende Pore des Kanals kodiert. Für die Gentargeting-Experimente zur Inaktivierung des TRPV6-Gens in Maus wurde zunächst ein Targetingvektor geplant und verwendet der eine homologe Rekombination im Bereich von Exon 1 vorsah. Dazu sollte die Geninaktivierungsstrategie mit der Anwendung des tetracyclinabhängigen Regulationssystems kombiniert werden. Als weiterer Genlocus für ein alternatives Gentargeting-Experiment erschienen die Exonabschnitte 13 bis 15 geeignet: Sie sind etwa 10 Kilobasen von dem ersten translatierten Exon entfernt und mindestens ein Exon, das Exon 13 kodiert für einen Teil der Pore des TRPV6 Kanals. Für die Inaktivierung entsprechend dieser Strategie wurde deshalb ein Targetingvektor konstruiert, bei dem mit Hilfe des Cre/loxP Systems durch

Deletion von Exon 13, Exon 14 und Exon 15 die Bildung funktionsfähiger TRPV6 Kanäle verhindert werden kann.

7.2.1 DER TARGETINGVEKTOR PMCATL_26 – GENINAKTIVIERUNG UNTER VERWENDUNG DES TETRACYCLINABHÄNGIGEN REGULATIONSSYSTEMS

7.2.1.1 KONDITIONIERTE INAKTIVIERUNG MITTELS DES TET-OFF SYSTEMS

Die erste Strategie zur konditionierten Inaktivierung des TRPV6 Gens der Maus beruhte auf der Verwendung eines Tetracyclin abhängigen Regulationssystems (Abbildung 7-4). Dieses Regulationssystem besteht aus einem Tetracyclintransaktivator (tTA), einem Selektionsgen für die Anreicherung homolog rekombinanter Zellen und einem an einen CMV-Promotor gekoppelten tet-Operator. Das von mir in diesem Gene-Targeting Experiment als Regulationskassette triTaubi.AF bezeichnete DNS-Konstrukt (Furth et al., 1994), (Bond et al., 2000) besteht aus einem Tetracyclintransaktivator, der durch Fusion des Tetracyclin Repressors aus E.coli und der transaktivierenden Domäne von VP16 aus dem Herpes simplex Virus gebildet wurde (Abbildung 7-4). Das resultierende Fusionsprotein kann wie der Tetracyclin Repressor sowohl Tetracyclin als auch den *tet* Operator binden und hat zusätzlich die transaktivierenden Eigenschaften des VP16 Transaktivators. Der Transaktivator-DNS folgen ein mit loxP Sequenzen flankiertes Neomycin-Resistenzgen und der tet Operator in fünf Kopien gefolgt von dem minimalen CMV-Promotor.

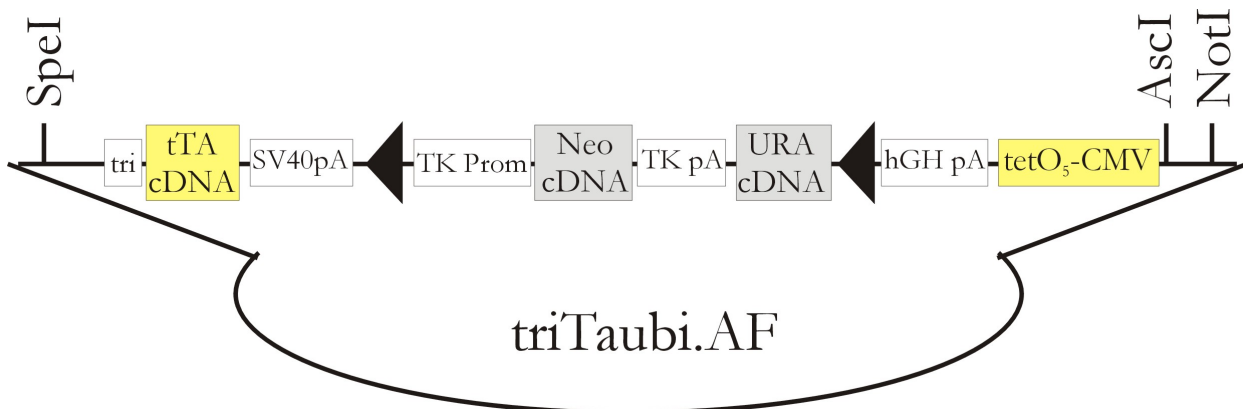


Abbildung 7-4 Die Regulationskassette triTaubi.AF

Die Regulationskassette triTaubi.AF besteht aus drei Modulen: Am 5' Ende liegt das erste Modul, die DNS, die für das binäre Tetracyclin-Transaktivator (tTA) Protein kodiert. 5' davon liegt die Adenovirus Tripartite Leader Sequence (tri) die für eine effiziente Initiation der Translation sorgt. Nach der tTA-DNS folgt das Polyadenylierungssignal/Transkriptionsterminationssignal von SV40 (SV40pA). Das zweite Modul ist das bakterielle Neomycin (G418) Resistenzgen, dessen Transkription durch den Thymidinkinase Promotor (TK Prom) des Herpes Simplex Virus getrieben ist, und das URA3 Gen aus Hefe (URA). Diese Selektionsgene sind durch loxP Sequenzen flankiert und sind gefolgt von dem Polyadenylierungssignal/Transkriptionsterminationssignal des Human Growth Hormone Gene (hGHpA). Das am 3' Ende der Kassette gelegene dritte Modul enthält fünf Kopien des tet-Operators, die 3' an den minimalen Cytomegalievirus Promotor (tetO₅-CMV) fusioniert sind.

Modifiziert nach (Bond et al., 2000).

Diese Regulationskassette sollte in den 5'-nichttranslatierten Bereich des TRPV6 Gens inseriert werden, also zwischen den Transkriptions- und den Translationsstart (Abbildung 7-5). Auf diese Weise

sollte die Transkription des Tetracyclin-Transaktivators unter Kontrolle des endogenen TRPV6-Promotor stehen und das tTA-Protein in allen Zellen gebildet werden, die normalerweise TRPV6 exprimieren. Das tTA-Protein sollte dann an den tet-Operator binden und die Transkription des Zielgens unter Mithilfe des CMV Promotors ermöglichen. In Gegenwart von Doxycyclin wird die Bindung des Tetracyclin-Transaktivators an den tet-Operator verhindert; die Transkription des Zielgens unterbleibt. Dabei wird Doxycyclin an Stelle von Tetracyclin auf Grund seiner besseren Bioverfügbarkeit verwendet. Mit dieser Strategie sollte es möglich sein, erstens das TRPV6 Gen durch Amplifikation über das tTA Protein in denjenigen Zelltypen zu überexprimieren, die TRPV6 auch endogen exprimieren. Zweitens kann durch Zugabe von Doxycyclin z.B. über das Trinkwasser das TRPV6-Gen für die Dauer der Gabe von Doxycyclin inaktiviert werden, da Doxycyclin die Interaktion von tTA mit dem tet-Operator hemmt. Drittens habe ich zusätzlich eine dritte loxP Seite hinter das erste kodierende Exon des TRPV6-Gens eingefügt (Abbildung 7-5), so dass auch unabhängig von Doxycyclin das TRPV6-Gen nach Verpaarung mit entsprechenden Cre-Mauslinien auf diese Weise inaktiviert werden kann.

7.2.1.2 PLANUNG DER INSERTIONSSTELLE

Bei der Verwendung des beschriebenen Systems muss die Regulationskassette 3' von dem endogenen Promotor aber 5' vor dem Translationsstart des zu inaktivierenden Zielgens liegen. Bei TRPV6 wurde das erste Exon für die Insertion der Regulationskassette gewählt, weil im ersten Exon der Translations- und wahrscheinlich auch der Transkriptionsstart liegen. Wird die Regulationskassette nun direkt vor den Translationsstart eingefügt, ist sichergestellt, dass der Tetracyclintransaktivator unter der Kontrolle des endogenen TRPV6 Promotors steht. Die TRPV6 kodierende DNS dagegen steht unter der Kontrolle des Tetracyclintransaktivators. Bei Mäusen, die das rekombinante Allel TRPV6^T tragen, sollte durch Verpaaren mit der Mauslinie EIIa-Cre das Neomycin-Resistenzgen entfernt werden und ein konditioniertes Allel TRPV6^Δ entstehen. Tiere mit dem TRPV6^Δ Allel können dann mit der gewünschten Cre-Mauslinie verpaart werden und das TRPV6-Gen auf diese Weise inaktiviert werden (Abbildung 7-5).

7.2.1.3 IDENTIFIZIERUNG VON BAC-KLONEN, WELCHE TEILE DES TRPV6-GENS ENTHALTEN

Neben den verschiedenen oben genannten Regulationssequenzen benötigt man für die Konstruktion eines Targetingvektors die so genannten 5'- und 3'- homologen Sequenzabschnitte. Dies sind diejenigen DNS-Sequenzen, welche die homologe Rekombination erst ermöglichen. Sie sind idealerweise in ihrer Sequenz mit der DNS-Sequenz des Gens, das inaktiviert werden soll, vollständig identisch. Bewährt haben sich DNS-Sequenzbereiche von mindestens 2000 bis 7000 Basenpaaren

Länge, die – um größtmögliche Übereinstimmung zu gewährleisten – aus den Genen derjenigen Mauslinie isoliert werden sollten, aus der die verwendeten embryonalen Stammzellen stammen.

Die beiden homologen Arme des Targetingkonstruktes sollten mit Hilfe der PCR synthetisiert werden. Dabei ist es wichtig dass die amplifizierten DNS-Moleküle die korrekte Sequenz besitzen; eine fehlerhafte Sequenz setzt die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination herab und kann unvorhersehbare weitere Effekte haben. Ich habe deshalb für die PCRs eine so genannte proofreading Polymerase (Pfu) eingesetzt, die in einer Sequenz von 1 000 000 Basenpaaren im Durchschnitt nur eine falsche Base einbaut, im Gegensatz zur Taq-Polymerase die bereits in Sequenzen von 1000 Basenpaaren Länge eine falsche Base inseriert. Da es in der Regel schwierig ist, Fragmente über 1000 bp aus genomischer DNS mit Pfu-Polymerasen zu amplifizieren, wurde ein bacterial artificial chromosome oder BAC-Plasmid, das den gewünschten Abschnitt des Chromosoms 6 der Maus enthält, als Quelle für die gesuchten DNS-Sequenzen gewählt. BAC-Plasmide sind in der Lage DNS-Fragmente von einer Länge bis zu 240 kb aufzunehmen. Solche Plasmide werden z.B. von der Firma Incyte Genomics angeboten. Sie werden dadurch hergestellt, dass genomische HindIII-DNS-Fragmente in die HindIII-Schnittstelle des Plasmids pBeloBac kloniert werden. Dadurch entstehen Plasmide die genomische DNS-Anschnitte von 40 bis 240 kb enthalten; die durchschnittliche Insertgröße liegt bei 120 kb. Um aus der vorhandenen Plasmid Bibliothek dasjenige Plasmid zu finden, welches Exon 1 des TRPV6 Gens enthält, wurden die beiden Oligodesoxynukleotidprimer mcat05 und mcat20 synthetisiert. Diese Oligodesoxynukleotide erlauben die Amplifizierung eines 256 bp DNS-Fragments aus Exon 1. Die Klone der BAC-Plasmid Bibliothek wurden unter Verwendung dieser beiden Primer auf solche Klone hin untersucht, die Exon 1 des TRPV6-Gens enthalten. Zwei Klone, Klon 27354 und Klon 27355, wurden identifiziert.

7.2.1.4 KONSTRUKTION DES TARGETING VEKTORS pmCaTL₂₆

Für die Konstruktion des Targetingvektors pmCaTL₂₆ wurde ein Plasmid hergestellt, das aus einem 5050 bp langen 5'-homologen Arm besteht, gefolgt von der 5' des Translationsstarts klonierten Tetracyclin-Regulationskassette. Nach der Regulationskassette folgt 3' der 2939 bp lange 3'-homologe Arm. Dieser 3'-homologe Arm enthält den überwiegenden Teil von Exon 1 sowie einen Teil des 3' davon gelegenen Introns. Etwa 1000 Basenpaare 3' des 5'-Endes von Exon 1 wurde eine dritte loxP-Sequenz eingeführt (Abbildung 7-5). Das resultierende Targetingkonstrukt besitzt also 3 loxP-Sequenzabschnitte.

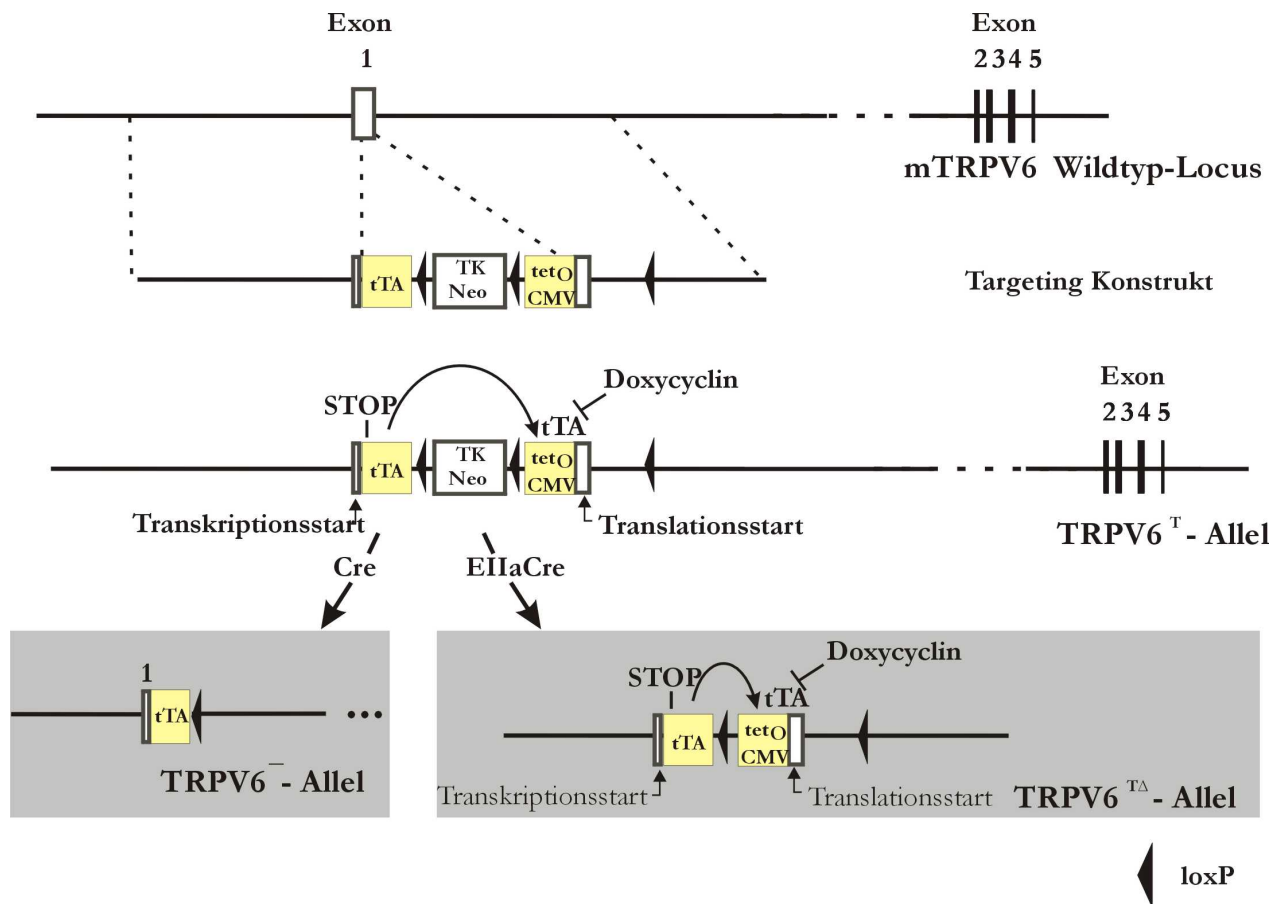


Abbildung 7-5 Targetingkonstrukt zur Inaktivierung des TRPV6 Gens

Hierzu wurde die Regulationskassette triTaubi.AF zwischen den Transkriptions- und den Translationsstart des TRPV6-Gens kloniert. Zur detaillierten Beschreibung siehe Text unten.

Klonierung der homologen Arme

Für alle Klonierungen wurde der MasterAmpTM Extra-Long DNS Polymerase Mix verwendet, als Matrize diente die DNS des BAC-Klones 27355. Zur Klonierung des 5' homologen Armes (Abbildung 7-6) wurde mit den Oligonukleotidprimern mcat36 und mcat37 ein DNS-Fragment amplifiziert; dieses Fragment wurde mit SpeI und EcoRI geschnitten und in pBluescript II KS subkloniert. Allerdings konnte von fünfzehn doppelsträngig sequenzierten unabhängigen Klonen kein DNS-Klon ohne Sequenzfehler identifiziert werden. Einer dieser Klone, der Klon pmCaTL₁₈ enthielt Sequenzfehler ausschließlich im 5' Ende der Sequenz und wurde zur Weiterverwendung bestimmt. Hierzu mussten allerdings die Sequenzfehler korrigiert werden. Mit Pfu-Polymerase und den Primern mcat84 und mcat85 wurde deshalb eine weitere PCR durchgeführt (Abbildung 7-6) und das amplifizierte Fragment nach Schnitt mit SpeI und HindIII in pBluescript II kloniert. Dieser Klon, pmCaTL₂₀, enthielt keine Sequenzfehler und wurde dazu verwendet, den fehlerhaften Teil von pmCaTL₁₈ zu ersetzen. Hierzu wurde das fehlerhafte HindIII-SpeI-Fragment von Klon pmCaTL₁₈ durch das korrekte HindIII-SpeI-Fragment von Klon pmCaTL₂₀ ersetzt (Abbildung 7-6). Der resultierende Klon pmCaTL₂₃ enthält den 5' homologen Arm.

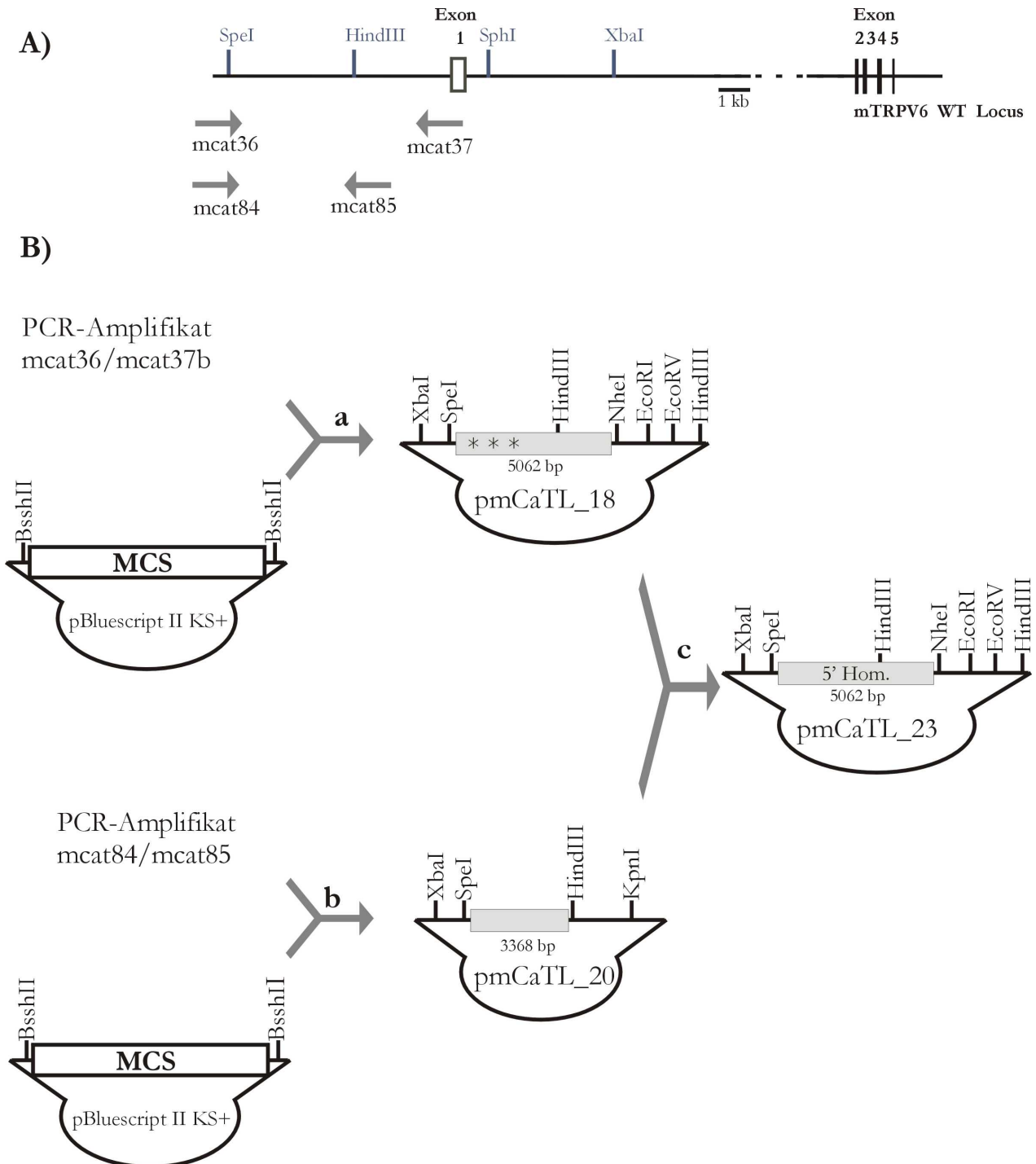


Abbildung 7-6 Targeting des ersten Exons - Klonierung des 5'-homologen Arms

A) Darstellung der genomischen DNS von TRPV6 im Bereich von Exon 1 und Umgebung, für die Klonierung relevante Restriktionsschnittstellen sowie verwendete Oligodesoxynukleotidprimer. B) Subklonierung des mit dem Primerpaar mcat36/mcat37 erhaltenen DNS-Fragments in den mit SpeI/EcoRI geschnittenen pBluescript-Vektor ergibt Klon pmCaTL₁₈ (a). Subklonierung des mit dem Primerpaar mcat84/85 erhaltenen DNS-Fragments in den SpeI/HindIII geschnittenen pBluescript Vektor ergibt Klon pmCaTL₂₀ (b). Ersatz des fehlerhaften SpeI-HindIII-Fragments von Klon pmCaTL₁₀ ergibt den korrekten Klon pmCaTL₂₃ (c).

Zur Klonierung des 3'-homologen Arms (Abbildung 7-7) wurde ein DNS-Fragment mit den Oligodesoxynukleotiden mcat40 und mcat41 synthetisiert. In das Oligodesoxynukleotid mcat41 wurden drei Mutationen eingeführt die nicht zu einer Änderung der kodierten Proteinsequenz führen,

die es aber erlauben, das rekombinante Allel von dem Wildtyp-Allel unterscheiden zu können. Im Folgenden sind beide Sequenzen aufgeführt:

```

WT-Sequenz:                GAA CCA GCC TTC CAC CCC ATG GGG TGG TCC CTG CCC AAG G
mcat41:    GG AAT TCC GGC GCG CCG GAA CCA GCC TTC CAC CCC ATG GGA TGG AGC CTA CCC AAG G
           EcoRI      AscI                               Start
Kodiertes Protein:                M   G   W   S   L   P   K

```

Das ATG-Triplett, welches die erste Aminosäure des TRPV6-Proteins kodiert sowie die drei in den Primer mcat41 eingeführten Mutationen sind oben gekennzeichnet. Das synthetisierte und anschließend mit EcoRI geschnittene DNS-Fragment wurde in die EcoRI Schnittstelle von pBluescript subkloniert. In die SphI/XbaI Schnittstellen des resultierenden Klons pmCaTL₁₀ wurde das SphI-XbaI-DNS-Fragment subkloniert, das mit Hilfe der Oligodesoxynukleotidprimer mcat38/mcat39 synthetisiert worden war (Abbildung 7-7). In die BsmI-Schnittstelle des resultierenden Klons pmCaTL₁₁ wurde das BsmI-DNS-Fragment kloniert, das neben der dritten loxP-Sequenz eine BglII-Schnittstelle enthält. Dieses kurze DNS-Fragment wurde über die zwei komplementären Oligodesoxynukleotide mcat86 und mcat87 konstruiert. Der resultierende Klon pmCaTL₂₅ enthält den 3'-homologen Arm einschließlich der dritten loxP-Seite, etwa 1000 Basenpaare 3' vom 3'-Ende des Exons 1.

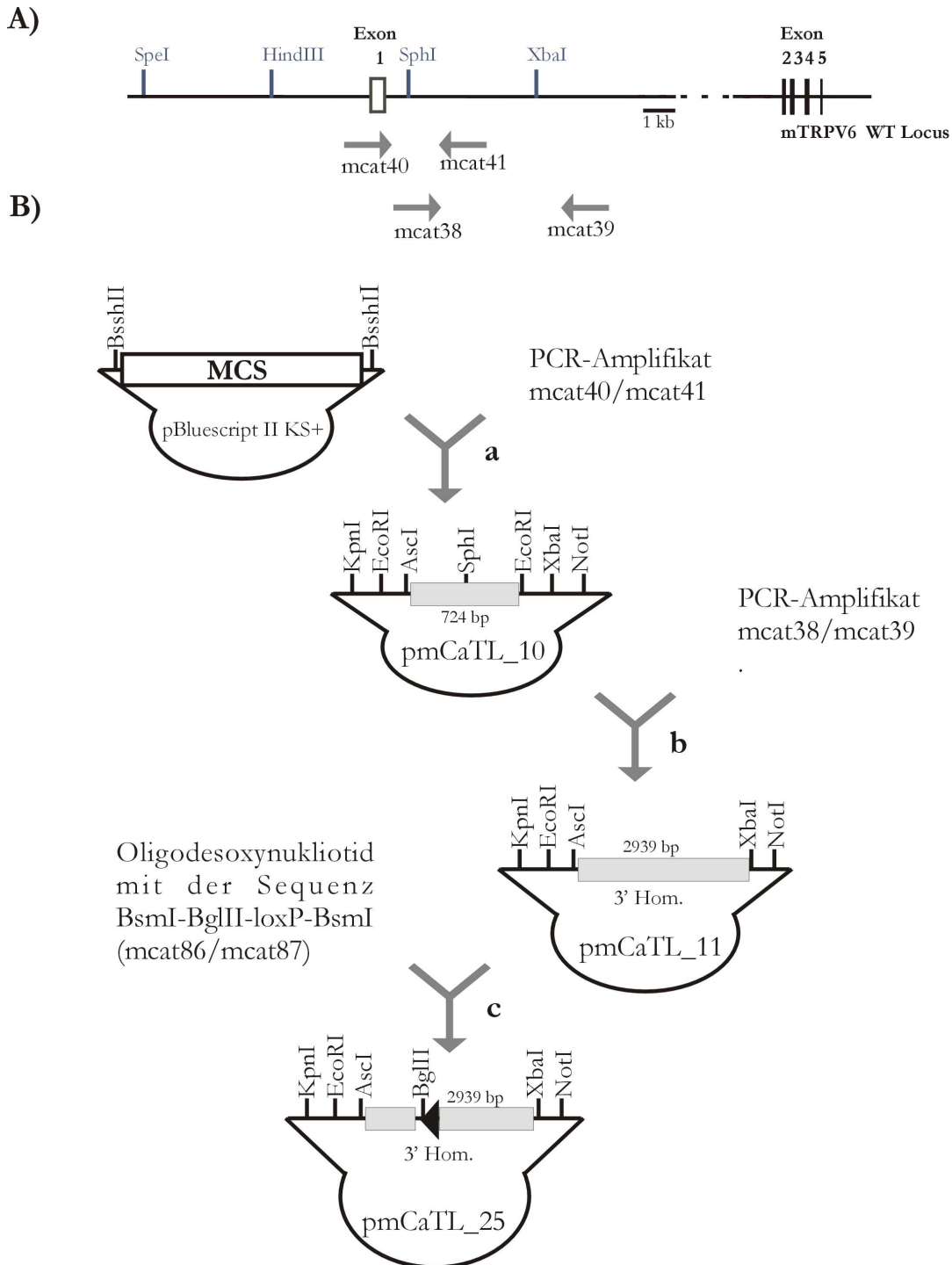


Abbildung 7-7 Targeting des ersten Exons - Klonierung der 3'Homologie

A) Darstellung der genomischen DNS von TRPV6 im Bereich von Exon 1 und Umgebung, für die Klonierung relevante Restriktionsschnittstellen sowie verwendete Oligodesoxynukleotidprimer.

B) Subklonierung des mit dem Primerpaar mcat40/mcat41 erhaltenen DNS-Fragments in den mit EcoRI geschnittenen pBluescript-Vektor ergibt Klon pmCaTL₁₀ (a). Subklonierung des mit dem Primerpaar mcat38/39 erhaltenen DNS-Fragments in den SphI/XbaI geschnittenen pBluescript Vektor ergibt Klon pmCaTL₁₁ (b). Subklonieren der komplementären Oligodesoxynukleotid mcat86/87 in die BsmI-Schnittstelle des Vektors pmCaTL₁₁ ergibt Klon pmCaTL₂₅ (c).

Klonierung des Targetingkonstruktes

Im nächsten Schritt wurden die DNS-Fragmente mit der Regulationskassette, dem 5'-homologen Arm aus pmCaTL_23 und dem 3'-homologen Arm aus pmCaTL_25 benutzt um den Targetingvektor pmCaTL_26 zu konstruieren (Abbildung 7-8). Hierzu wurde zunächst der SpeI/NheI 5'-homologe Arm aus pmCaTL_23 in die SpeI-Schnittstelle von triTaubi.AF subkloniert, es resultiert der Klon pmCaTL_24a (Abbildung 7-8 a). Dann wurde der AscI/NotI 3'-homologe Arm in die AscI/NotI Schnittstelle von pmCaTL_24a subkloniert (Abbildung 7-8 b). Das resultierende Plasmid ist der Targetingvektor pmCaTL_26 (Abbildung 7-8 b). pmCaTL_26 enthält 3' des 3' homologen Armes eine singuläre Schnittstelle für das Restriktionsenzym NotI. Diese Restriktionsschnittstelle kommt an keiner anderen Stelle des Targetingkonstruktes vor und kann deshalb zur Linearisierung des Klons vor der Elektroporation in die ES-Zellen verwendet werden.

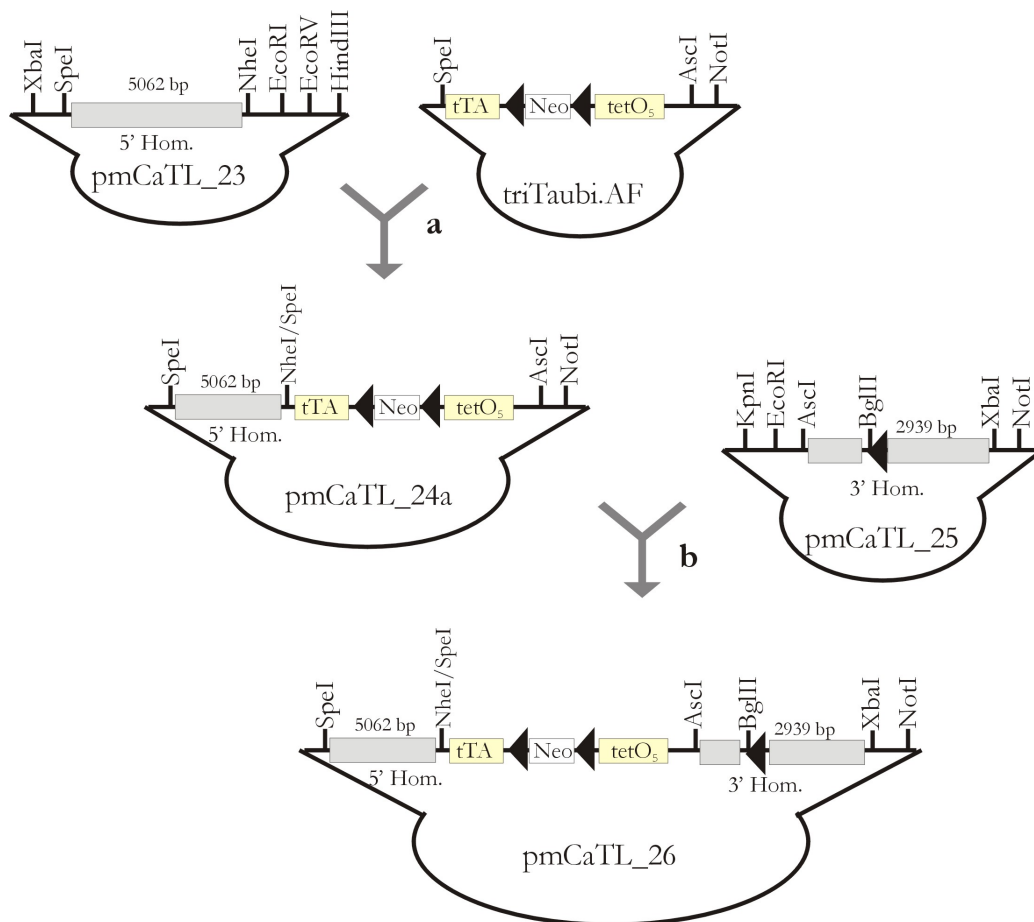


Abbildung 7-8 Targeting des ersten Exons - Klonierung des Targetingkonstruktes pmCaTL_26

Subklonierung des SpeI/NheI DNS-Fragments aus pmCaTL_23 in den mit SpeI geschnittenen Vektor triTaubi.AF ergibt Klon pmCaTL_24a (a). Subklonierung des AscI/NotI DNS-Fragments aus pmCaTL_25 in den mit AscI/NotI geschnittenen Vektor pmCaTL_24a ergibt Klon pmCaTL_26 (b).

Erläuterung der Southern-Strategie zum Nachweis der korrekten Rekombination

Um nach der Elektroporation des Targetingkonstruktes pmCaTL_26 das homologe Rekombinationsereignis mittels Southern Blot nachweisen zu können, wurden zwei Sonden kloniert.

Die beiden Sonden wurden so gewählt, dass sie außerhalb der homologen Arme des Targetingkonstruktes liegen, d.h. 5' des 5'-homologen Arms und 3' des 3'-homologen Arms. Als Restriktionsenzyme für den Restriktionsschnitt wurden Enzyme gewählt, die mindestens eine Erkennungsstelle außerhalb der homologen Arme des Targetingkonstruktes besitzen und die genomische DNS effektiv schneiden. Für die Southern-Hybridisierung mit der 5'-Sonde wurde das Enzym BamHI gewählt, für die Southern-Hybridisierung mit der 3'-Sonde das Enzym BglII. In das Targetingkonstrukt pmCaTL_26 sind Erkennungssequenzen für diese Enzyme zusätzlich eingebaut worden bzw. sie sind bereits in der Tetracyclin-Regulationskassette vorhanden. Abbildung 7-9 zeigt oben die Situation im Wildtyp Allel mit den relativen Positionen der Schnittstellen für BamHI (Ba, rot) und BglII (Bg, blau). Wird die genomische Wildtyp DNS mit BamHI geschnitten, sollte die Hybridisierung mit der 5'-Sonde (rot in Abbildung 7-9 oben) mit einem 12 kb Fragment erfolgen; bei einem Schnitt mit BglII sollte die 3'-Sonde (blau in Abbildung 7-9 oben) mit einem 13 kb Fragment hybridisieren. Durch homologe Rekombination des Targetingkonstruktes (mittlerer Teil der Abbildung 7-9) verkürzen sich die mit den Sonden nachgewiesenen DNS-Fragmente. Im Falle der 5'-Sonde von 12 kb auf 8 kb, im Falle der 3'-Sonde von 13 kb auf 7,8 kb (unterer Teil der Abbildung 7-9). Durch die zusätzlich eingebaute BglII Schnittstelle 5' der dritten loxP-Seite ist es möglich, korrekt homolog rekombinante Klone von solchen zu unterscheiden, bei denen eine homologe Rekombination zwar stattgefunden hat, die loxP-Sequenz jedoch nicht eingebaut wurde.

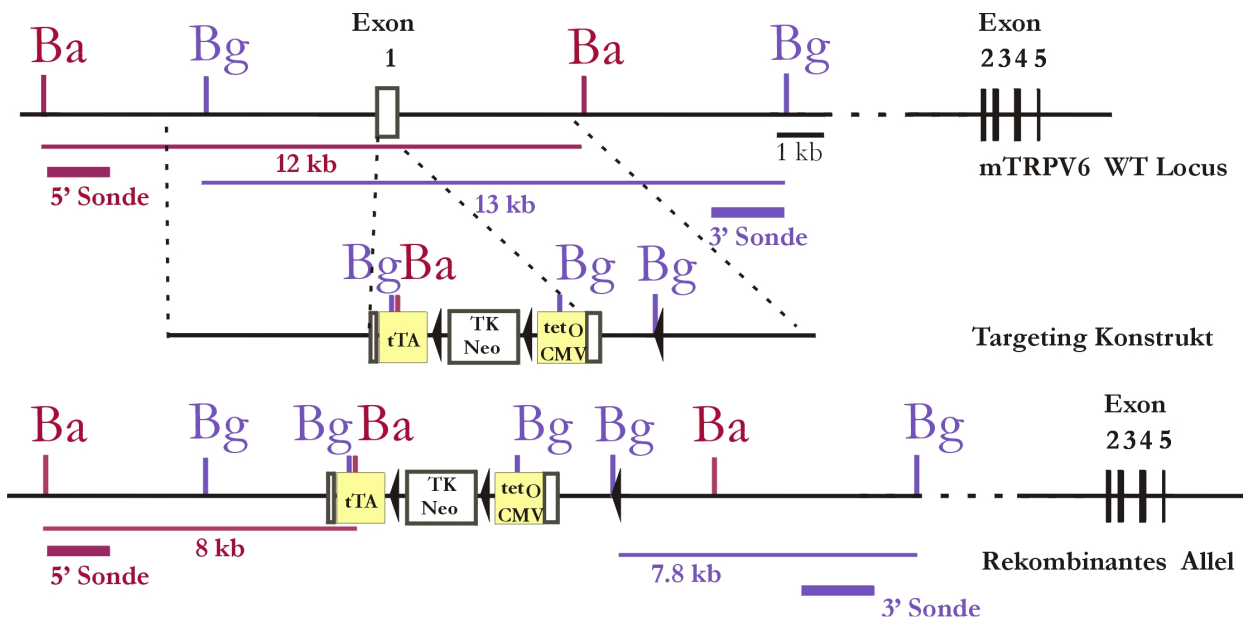


Abbildung 7-9 Targeting des ersten Exons - Southern-Strategie

Southern-Strategie mit 5'-Sonde und 3'-Sonde zum Nachweis der korrekten homologen Rekombination. Dargestellt sind Wildtyp-Allel, Targetingvektor und rekombinantes Allel, außerdem die relative Lokalisation der Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BglII (Bg), BamHI (Ba) sowie der 5'- bzw. 3'-Sonde. Die loxP-Sequenzen sind durch schwarze Dreiecke symbolisiert. Nach homologer Rekombination entstehen zusätzliche Restriktionsschnittstellen, so dass sich die bei der Southern Blot Analyse mit den 5'- bzw. 3'-Sonden nachgewiesenen DNS Fragmente von 12 kb auf 8 kb (5'-Sonde) und von 13 kb auf 7,8 kb (3'-Sonde) verkürzen sollten.

Klonierung der Sonden und deren Überprüfung im Southern Blot

Für die Klonierung der 5'-Sonde wurde das 1200 bp lange EcoRI-Fragment nach Amplifikation mit mcat33/mcat35 in die EcoRI Schnittstelle des Plasmids pBluescript II KS ligiert. Der resultierende Klon pmCaTL_07 (Abbildung 7-10) wurde zunächst sequenziert und anschließend das für die Southern-Hybridisierung benötigte EcoRI-Fragment daraus präpariert. Als 3'-Sonde wurde das 1600 bp Fragment, das über PCR mit dem Primerpaar mcat30/mcat32 synthetisiert wurde, in den mit SmaI geschnittenen Vektor pUC18 subkloniert. Der resultierende Klon pmCaTL_08 wurde sequenziert und anschließend das EcoRI/BamHI-Fragment als 3'-Sonde präpariert (Abbildung 7-10).

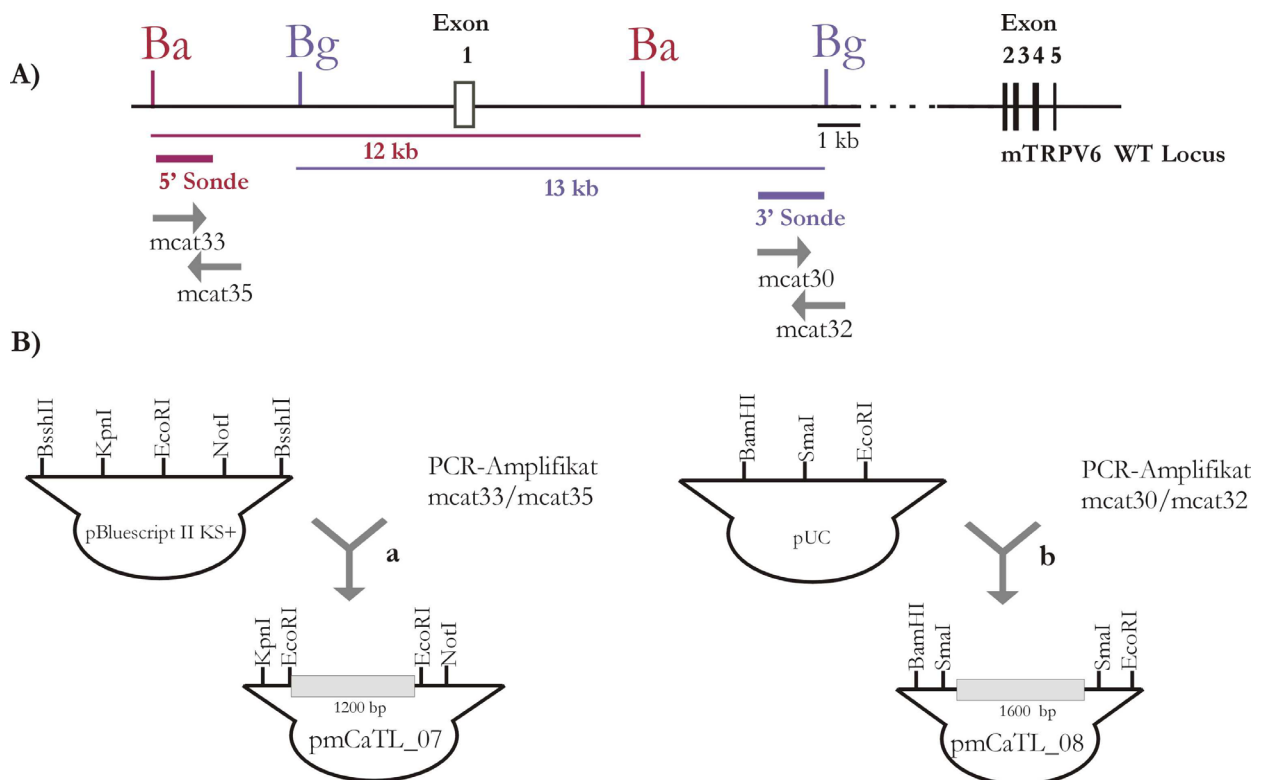


Abbildung 7-10 Targeting des ersten Exons - Klonierung der Southernsonden.

Relative Lage der 5'-Sonde und der 3'-Sonde (A) und Klonierungsstrategie (B). Ba, BamHI; Bg, BglII; weiteres siehe Text.

Beiden Sonden wurden im Southern Blot überprüft. Hierzu wurde genomische DNS aus R1 ES-Zellen und genomische DNS aus Schwanzgewebe mit den Enzymen BamHI bzw. BglII geschnitten, der Größe nach auf Agarosegelen aufgetrennt und mit der jeweiligen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Wie Abbildung 7-11 zeigt, erkennen beide Sonden DNS-Fragmente der erwarteten Länge, ein 12 kb Fragment (5'-Sonde Abbildung 7-11 links) und ein 13 kb Fragment (3'-Sonde, Abbildung 7-11 rechts).

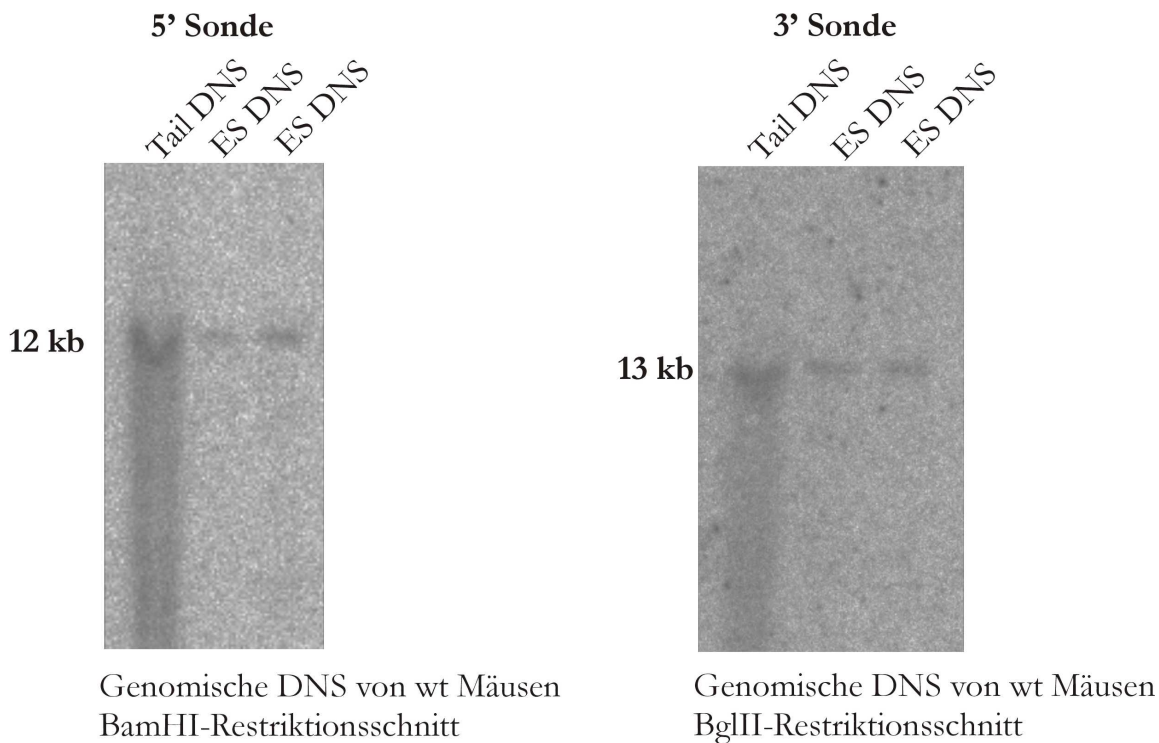


Abbildung 7-11 Targeting des ersten Exons - Testen der Southernsonden

Southern Blot mit der 5'-Sonde (pmCaTL_07) und der 3'-Sonde (pmCaTL_08). Aufgetragen ist genomische DNS von Schwanzgewebe (Tail) und ES-Zellen (ES), die mit BamHI (rechts) bzw. BglII (links) geschnitten wurde.

7.2.2 DER TARGETINGVEKTOR PMCATL_36

7.2.2.1 GRÜNDE FÜR DAS KLONIEREN EINES WEITEREN TARGETINGVEKTORS

Mit dem Targetingvektor pmCaTL_26 wurden nach zwei unabhängigen Elektroporationsexperimenten insgesamt 1279 ES-Zellklone isoliert; die genomische DNS dieser 1279 Klone wurde mittels Southern Blot auf das Rekombinationsereignis hin überprüft. Es konnte allerdings kein homolog rekombinanter ES-Zellklon identifiziert werden (siehe unten). Da es manchmal vorkommt, dass Genloci eine sehr niedrige Rekombinationseffizienz haben, wurde beschlossen, zusätzlich ein Selektionsgen zur Negativselektion in das Targetingkonstrukt pmCaTL_26 einzufügen (Abbildung 7-12). Die Wahl fiel auf das Diphtherie Toxin-A Gen da bei Anwendung dieses Gens als Selektionsgen eine Erhöhung der Rekombinationseffizienz um das 10- bis 75-fache beschrieben ist (Yagi et al., 1990), (Yu et al., 2000). Zudem konnte das Gen mit wenigen Klonierungsschritten in das bereits vorhandene Targetingkonstrukt subkloniert werden. Wie bei jeder Negativselektion sollte das Diphtherie Toxin-A Gen nur bei der weit häufiger vorkommenden zufälligen Insertion ins Genom mitintegriert werden, worauf diese Zellen absterben sollten.

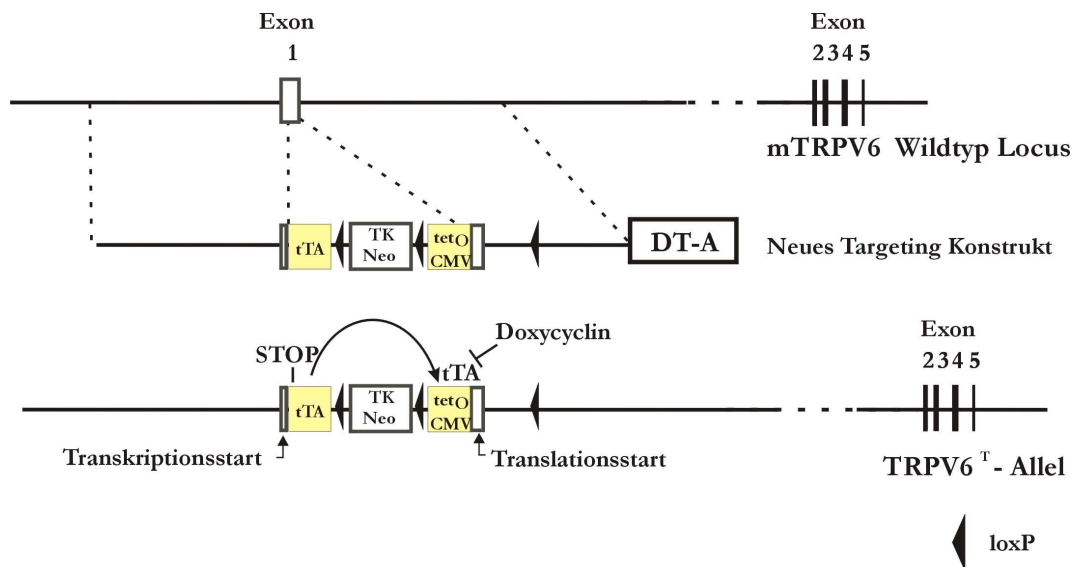


Abbildung 7-12 Targeting des ersten Exons – Modifizieren der Targeting-Strategie

Modifikation der bisherigen Targeting-Strategie durch Einbeziehung des Diptherie Toxin-A-Gens (DT-A).

7.2.2.2 KONSTRUKTION DES TARGETINGVEKTORS

Klonierung der Hilfsvektoren

Die Kasette mit dem Gen für das Diptherie Toxin-A (DT-A) Gen wurde von Prof. Dr. Jentsch, Hamburg, zur Verfügung gestellt. Das DT-A Gen kann aus dem Vektor pKO Select DT V840 nur als RsrII-Fragment freigesetzt werden; um es in den Targetingvektor pmCaTL_26 subklonieren zu können, müssen eine EagI- bzw. eine NotI-Schnittstelle angehängt werden. Da die Anordnung der EagI-RsrII-NotI-Schnittstellen in keinem käuflichen Klonierungsplasmid enthalten ist wurde ein auf pBluescript II SK basierender Hilfsvektor konstruiert. Hierzu wurde die multiple Klonierungsschnittstellen enthaltene Sequenz MCS mit BsshII entfernt (Abbildung 7-13) und durch ein kurzes BsshII-DNS-Fragment mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EagI, RsrII und NotI ersetzt, so dass der Hilfsvektor pmCaTL_34 entstand.

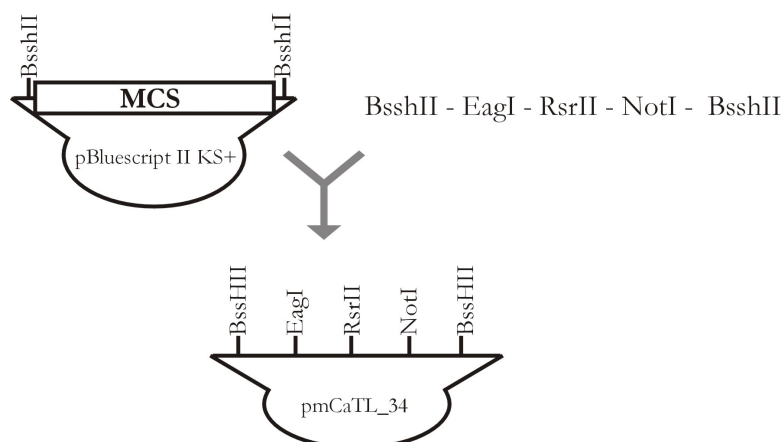


Abbildung 7-13 Targeting des ersten Exons - Klonierung des Hilfsvektors pmCaTL_34

Vergleiche Text.

Klonierung des Targetingkonstruktes

Zur Klonierung des neuen Targetingkonstruktes wurde zunächst das RsrII-DT-A-Fragment aus Plasmid pKO Select DT V840 in die RsrII Schnittstelle des Hilfsvektors pmCaTL_34 kloniert; es entstand der Vektor pmCaTL_35 (Abbildung 7-14 a). Hieraus wurde das EagI/NotI DT-A-Fragment isoliert und in die NotI-Schnittstelle des Targetingvektors pmCaTL_26 ligiert (Abbildung 7-14 b). EagI-Überhänge sind kompatibel mit NotI-Überhängen. Dies bedeutet, das DNS über diese Überhänge ligiert werden kann, dass aber die ligierte DNS an dieser Stelle nicht durch NotI zu schneiden ist. Dadurch konnte die singuläre NotI-Schnittstelle für die Linearisierung des neuen Targetingkonstruktes pmCaTL_36 erhalten werden.

Da das Negativselektionsgen DT-A bei korrekter Rekombination nicht in den TRPV6 Genlocus integriert wird, kann auch die Southernstrategie beibehalten werden.

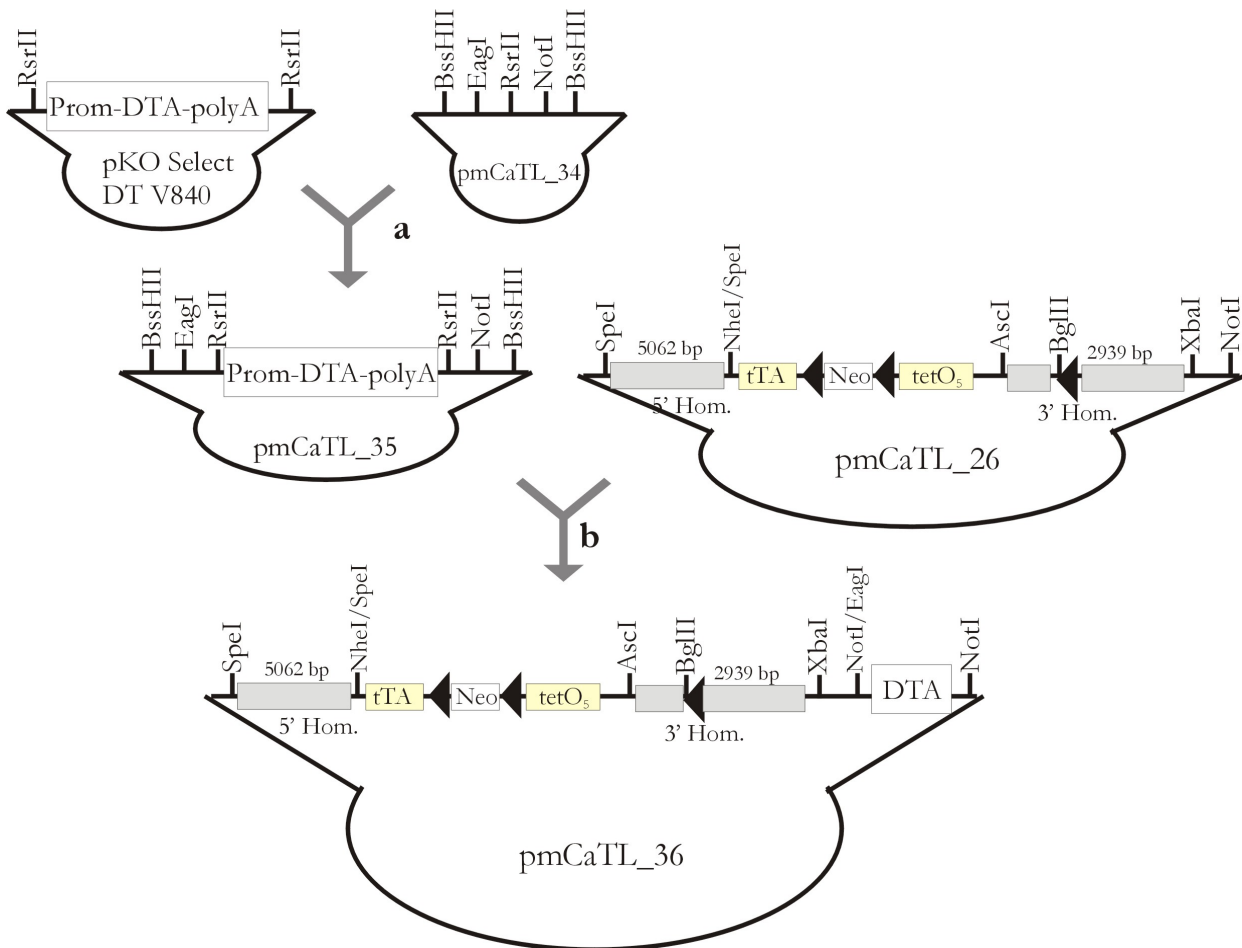


Abbildung 7-14 Targeting des ersten Exons - Klonierung des Targetingkonstruktes pmCaTL_36

Subklonierung des RsrII DNS-Fragments aus pKO select DT V840 in den mit RsrII geschnittenen Vektor pmCaTL_34 ergibt Klon pmCaTL_35 (a). Subklonierung des EagI/NotI DNS-Fragments aus pmCaTL_35 in den mit NotI geschnittenen Vektor pmCaTL_26 ergibt Klon pmCaTL_36 (b).

7.2.3 DIE TARGETINGVEKTOREN pmCaTL_52 UND pmCaTL_52-A

7.2.3.1 PLANUNG EINER ALTERNATIVEN INSERTIONSSTELLE FÜR DIE KONTIONIERTE

INAKTIVIERUNG DES TRPV6 GENS

Mit den Targetingkonstrukten pmCaTL_26 und pmCaTL_36 wurden in 3 unabhängigen Targetingexperimenten insgesamt 1579 (1279 bzw. 289) ES-Zellklone isoliert und mittels Southern Blot Hybridisierung analysiert. Auch bei den 289 ES-Zellklonen die nach der Elektroporation mit dem pmCaTL_36 Targetingkonstrukt selektioniert und isoliert worden waren, konnte kein Klon mit homologem Rekombinationsereignis identifiziert werden. Parallel durchgeführtes Gen-Targeting mit dem TRPM7-Gen als Zielgen führte dagegen mit der gleichen Strategie, die hier beschrieben wurde auf Anhieb zu korrekt rekombinanten ES-Zellen (siehe Diskussion). Offensichtlich ist es nicht die Lokalisation, gegen die das Targeting gerichtet ist – sowohl bei die TRPV6 als auch bei TRPM7 das erste Exon – sondern Eigenheiten des TRPV6-Gens in diesem Bereich. Trotz der bereits mehr als 1500 isolierten ES-Zellklone, der durchgeführten Analyse und des nicht unerheblichen Klonierungs- und Sequenzierungsaufwand, wollte ich einen weiteren Anlauf zur Inaktivierung des TRPV6-Gens starten. Als geeignete Zielsequenz erschienen die Exons 13, 14 und 15 des Gens. Sie sind mehr als 10 Kilobasen von dem ersten Exon entfernt und sie könnten allein deshalb eine höhere Rekombinationseffizienz aufweisen. Weiterhin kodiert dieser Bereich des Gens die Pore des TRPV6 Kanals (Abbildung 7-1). Ich habe deshalb für ein neues Targeting-Konstrukt das 3' Ende des TRPV6-Gens im Bereich der Exonabschnitte 13, 14 und 15 ausgewählt und eine Targeting-Strategie entworfen, bei der ich Exon 13, 14 und 15 deletieren kann. Damit fehlen die kodierenden Sequenzen für den Carboxyterminus von TRPV6 einschließlich der Kanalpore. Um die Identifizierung rekombinanter ES-Zellen zu erleichtern, sollten nach dem 3'-homologen Arm zwei Negativselektionsgene eingeführt werden. Mittlerweile gibt es Hinweise, dass durch Mutation eines Aspartatrestes im Bereich der Pore des TRPV5 Proteins die Ca^{2+} -selektivität des TRPV5 Kanals verloren geht und der Kanal lediglich monovalente Kationen leitet (Nilius et al., 2001), (Voets et al., 2004). TRPV5 ist das strukturell zu TRPV6 am engsten verwandte Protein und der entsprechende Aspartatrest ist in TRPV6 an Position 541 lokalisiert – als Teil der Pore, die von Exon 13 kodiert wird. Bisherige Ergebnisse in der Arbeitsgruppe sprechen dafür, dass im Protein mit einer Mutation in Position 541 regelrecht prozessiert wird, dass jedoch das Protein keine Kanalaktivität aufweist. Wir hielten es deshalb für angebracht einen zweiten Targetingvektor zu konstruieren der das TRPV6 Gen nicht inaktiviert, sondern zu einer Punktmutation führt, so dass an Stelle eines Aspartatrestes an Position 541 ein Alaninrest kodiert wird.

7.2.3.2 NEUE STRATEGIE FÜR DIE INAKTIVIERUNG DES TRPV6-GENS

Im Rahmen dieser neuen Strategie wurde der genomische DNS-Bereich, der die Exonabschnitte 13, 14 und 15 umfasst, mit loxP-Sequenzen flankiert. Das Neomycin-Resistenzgen wurde mit flp-Sequenzen flankiert; es kann durch Einkreuzen von Mäusen, welche das Flp-Protein exprimieren, entfernt werden. Abbildung 7-15 fasst die neue Strategie zusammen.

7.2.3.3 DOPPELTE NEGATIV-SELEKTION MIT GFP UND TK

Wegen der schlechten Erfahrungen bei der zuerst verfolgten Targeting-Strategie wurden für dieses Targetingkonstrukt zwei Negativselektionsgene eingeplant: Nach dem 3'-homologen Arm folgt zuerst die mit Promotor und Polyadenylierungssequenz versehene cDNS für das grün fluoreszierende Protein GFP, dann folgt die ebenfalls mit Promotor und Polyadenylierungssequenz versehene cDNS für die Thymidinkinase (TK). Wie bereits beschrieben, werden im Falle einer homologen Rekombination die nicht homologen Sequenzen, die außerhalb der homologen Arme liegen – hier also die Gene für GFP sowie die Thymidinkinase -, nicht in die Zielsequenz eingebaut. Rekombinante ES-Zellklone bei denen es nicht zur regelrechten homologen Rekombination gekommen ist, sollten eine grüne Fluoreszenz zeigen und gleichzeitig auch sensitiv gegenüber Ganciclovir sein. Dies bedeutet dass selbst für den Fall, dass bei der zufälligen Integration nur eines der Negativselektionsgene mitintegriert wird, Zellen mit solchen Ereignissen aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz bzw. ihrer Sensitivität gegenüber Ganciclovir eliminiert werden können.

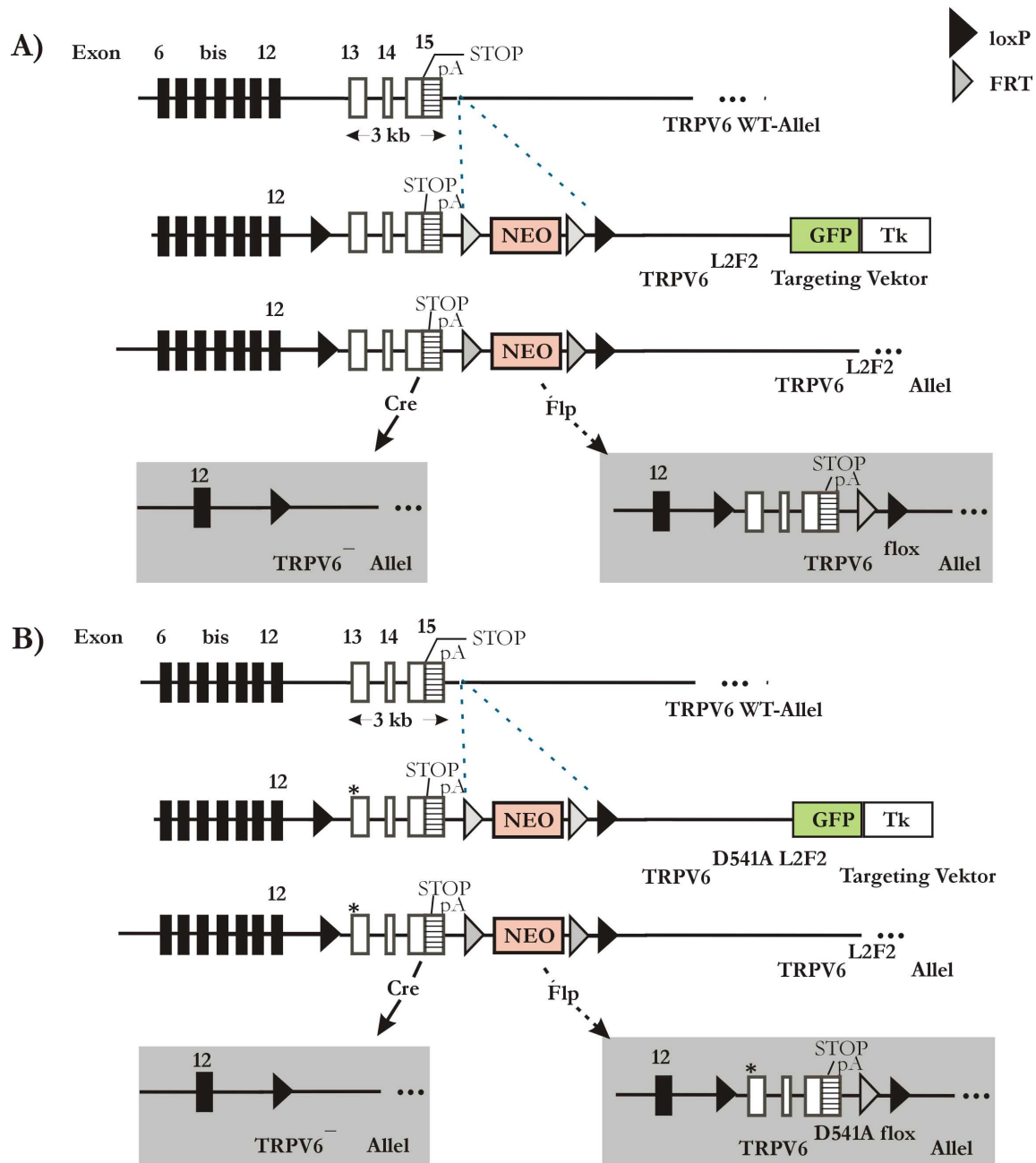


Abbildung 7-15 Neue Strategie für die Inaktivierung von TRPV6 - Targeting der Exons 13 bis 15

Bei diesem Targeting-Vektor kann durch Deletion von Exon 13 bis einschließlich Exon 15 der porenbildende Teil und der C-Terminus von TRPV6 entfernt werden (a). Alternativ kommt es nach selektiver Deletion der Selektionskassette mittels Flp-Rekombinase zu einem Knock-In einer D541A-Porenmutante (b). Durch Verwendung einer zusätzlichen GFP-Kassette zur Negativselektion soll bei dieser Strategie die Isolierung homolog rekombinanter Klone erleichtert werden. Klone mit zufälliger Integration des Targeting Vektors sollten durch die GFP-Fluoreszenz bereits vor der Isolierung identifiziert werden können.

7.2.3.4 KONSTRUKTION DER TARGETINGVEKTOREN

Erstellung der Hilfsvektoren

Da keine Klonierungsvektoren verfügbar waren, welche die für die Klonierung der neuen Targetingkonstrukte erforderliche Anordnung der Restriktionsenzymstimmstellen besitzen, wurden die in Abbildung 7-16 abgebildeten Hilfsvektoren ähnlich wie bereits unter 7.2.2.2 (Abbildung 7-13)

beschrieben hergestellt: Aus pBluescript II SK wurde die multiple Klonierungsschnittstelle mit BssHI entfernt und durch kurze DNS-Fragmente mit den gewünschten Schnittstellen ersetzt. Abbildung 7-16 zeigt die sechs konstruierten Hilfsvektoren.

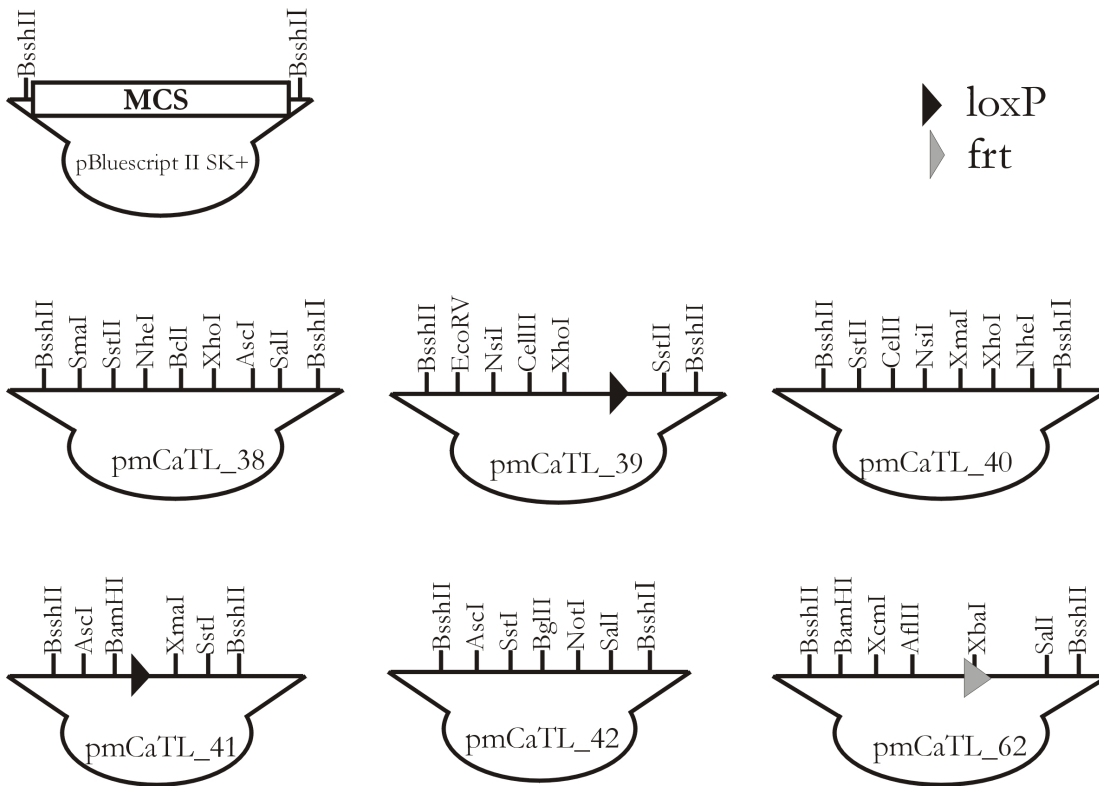


Abbildung 7-16 Targeting der Exons 13 bis 15 - Klonierung der Hilfsvektoren

Für die Erstellung der Targetingkonstrukte pmCaTL_54 und pmCaTL_54-A mussten zunächst die Hilfsvektoren pmCaTL_38, pmCaTL_39, pmCaTL_40, pmCaTL_41, pmCaTL_42 und pmCaTL_62 kloniert werden.

Des Weiteren wurde für die Erstellung der neuen Targetingkonstrukte ein mit frt-Sequenzen flankiertes Neomycin-Resistenzgen benötigt. Hierzu wurde das XbaI-frt-Neo-frt-Fragment als Kasette aus Plasmid pm4-06 isoliert und in die XbaI-Klonierungsstelle des Hilfsvektors pmCaTL_62 subkloniert (Abbildung 7-17). Der resultierende Vektor wurde als pmCaTL_63 bezeichnet.

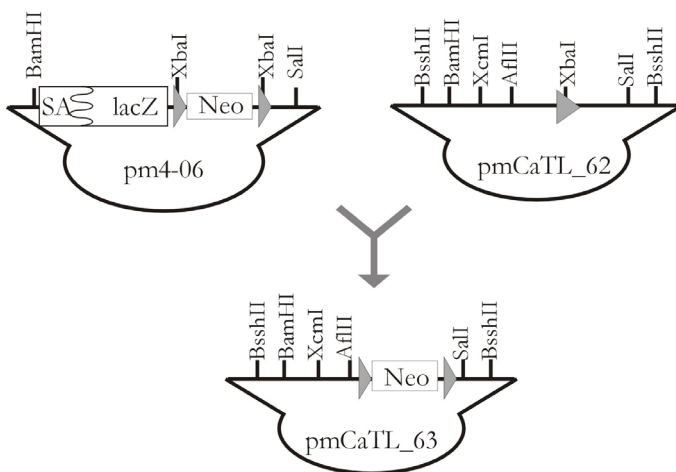


Abbildung 7-17 Targeting der Exons 13 bis 15 - Klonierung der mit frt-Sequenzen flankierten Neomycin-Resistenzkassette.

Klonierung der homologen Arme

Für dieses Targetingkonstrukt wurden die homologen Arme in 3 Bereiche unterteilt: Erstens den 5' homologen Arm (Exon 6 bis Exon 12), zweitens die Exons 13, 14 und 15 und drittens den 3'-homologen Arm. Die Klonierungsstrategie wurde so ausgearbeitet, dass jeder dieser Bereiche durch 2 PCR-Reaktionen amplifiziert werden konnte. Alle PCR-Fragmente wurden aus genomischer DNS von ES R1 ES-Zellen amplifiziert, als Polymerasen wurde die Pfu-Polymerase verwendet.

Für das Klonieren des 5'-homologen Arms (Abbildung 7-18) wurde zuerst die BamHI/SalI-frt-Neo-frt Kasette aus pmCaTL_63 in den BclI/XhoI geschnittenen Hilfsvektor pmCaTL_38 subkloniert. Es resultiert Vektor pmCaTL_43a (Abbildung 7-18 Ba). Im nächsten Schritt wurde das 5' Ende des 5'-homologen Arms als EcoRV/NsiI Fragment nach Synthese mit dem Oligodesoxynukleotidprimerpaar mcat113/mcat114 in die EcoRV/NsiI Schnittstelle von pmCaTL_39 kloniert. Es resultiert Vektor pmCaTL_44a (Abbildung 7-18 Bb). Trotz Verwendung der Pfu-Polymerase traten jedoch Sequenzfehler in mehreren unabhängigen Klonen auf. Zum Entfernen dieser Sequenzfehler wurde aus pmCaTL_44a mit Hilfe des Oligodesoxynukleotidprimerpaars mcat183/mcat184 ein blunt-end/NsiI-Fragment in die EcoRV/NsiI Schnittstelle von pmCaTL_39 kloniert. Es resultiert der Vektor pmCaTL_44b (Abbildung 7-18 Bc), der im Vergleich zu pmCaTL_44a einen um etwa 1300 bp kürzeren 5'-homologen Arm enthält. Im nächsten Schritt wurde das 3'-Ende der 5'-homologen Arms als NsiI/CellIII-Fragment nach Synthese mit dem Oligodesoxynukleotidprimerpaar mcat115/mcat116 in die NsiI/CellIII Schnittstelle von pmCaTL_44b kloniert. Es resultiert Vektor pmCaTL_45a (Abbildung 7-18 Bd). Bei diesem Klonierungsschritt entstand ein Sequenzfehler in der CellIII-Schnittstelle. Um diesen zu korrigieren wurde mit dem Oligodesoxynukleotidprimerpaar mcat115/mcat116a aus dem Vektor pmCaTL_45a ein DNS-Fragment synthetisiert. Dieses Fragment wurde nach Schneiden mit den Restriktionsenzymen NsiI und XhoI in die NsiI/XhoI Schnittstelle von pmCaTL_45a kloniert. Es resultiert pmCaTL_45b (Abbildung 7-18 Be). Als letzter Schritt wurde der 5'-homologe Arm als BssHII/SstII Fragment aus pmCaTL_45b isoliert und in die SmaI/SstII-Schnittstelle des Vektor pmCaTL_43a eingefügt; der resultierende Klon pmCaTL_46a enthält den 5'-homologen Arm und das frt-flankierte Neomycin-Resistenzgen.

Der Bereich der Exonabschnitte 13, 14 und 15 wurde in zwei Schritten kloniert (Abbildung 7-19): Zuerst wurde das CellIII/NsiI DNS-Fragment mit Hilfe des Oligodesoxynukleotidprimerpaars mcat117/mcat118 synthetisiert und in den CellIII/NsiI geschnittenen Vector pmCaTL_40 kloniert (Abbildung 7-19 Ba). In den so erhaltenen Vector pmCaTL_47 wurde das mit dem Oligodesoxynukleotidprimerpaar mcat119/mcat120 erhaltene NsiI/XmaI Fragment subkloniert (Abbildung 7-19 Bb). Das so erhaltene Plasmid pmCaTL_48 enthält den Bereich von Exon 13 bis

Exon 15. Für das Targetingkonstrukt mit der D541A Mutation wurde in pmCaTL_48 das Triplet GAT, das für Aspartat kodiert, gegen GCC, das für Alanin kodiert, ausgetauscht (Abbildung 7-19 Bc).

Zur Klonierung des 3'-homologen Arms (Abbildung 7-20) wurde zunächst das XmaI/SstI DNS-Fragment, das mit Hilfe des Oligodesoxynukleotidprimerpaare mcat121/mcat122 synthetisiert wurde in die XmaI/SstI-Schnittstelle des Vektors pmCaTL_41. Es resultiert Vektor pmCaTL_49 (Abbildung 7-20 Ba). Dann wurde das zweite Teilstück der 3'-homologen Armes, das SstI/BglII Fragment mit dem Primerpaar mcat123 und mcat124 synthetisiert und in die SstI/BglII-Schnittstelle des Vektors pmCaTL_42 kloniert. Es entstand Vektor pmCaTL_50 (Abbildung 7-20 Bb). Beim nächsten Schritt wurden die beiden Teilfragmente zusammengeführt; dafür wurde aus pmCaTL_49 das AscI/SstI Fragment in die AscI/SstI Schnittstelle von Vektor pmCaTL_50 kloniert. In den so entstandenen Vektor pmCaTL_51a (Abbildung 7-20 Bc) wurden in den nächsten Schritten die beiden Gene für die Negativselektion eingefügt. Zuerst wurde aus dem Plasmid jo21b das AseI/AflII EGFP-Fragment isoliert und nach Glätten der überhängenden Enden in die ebenfalls geglättete BglII-Schnittstelle des Vektors pmCaTL_51a kloniert. Es resultiert Vektor pmCaTL_51b (Abbildung 7-20 Bd). Im letzten Klonierungsschritt wurde das NotI TK-Fragment in die NotI-Schnittstelle des Vektors pmCaTL_51b kloniert und so der Vektor pmCaTL_52 erhalten (Abbildung 7-20 Be).

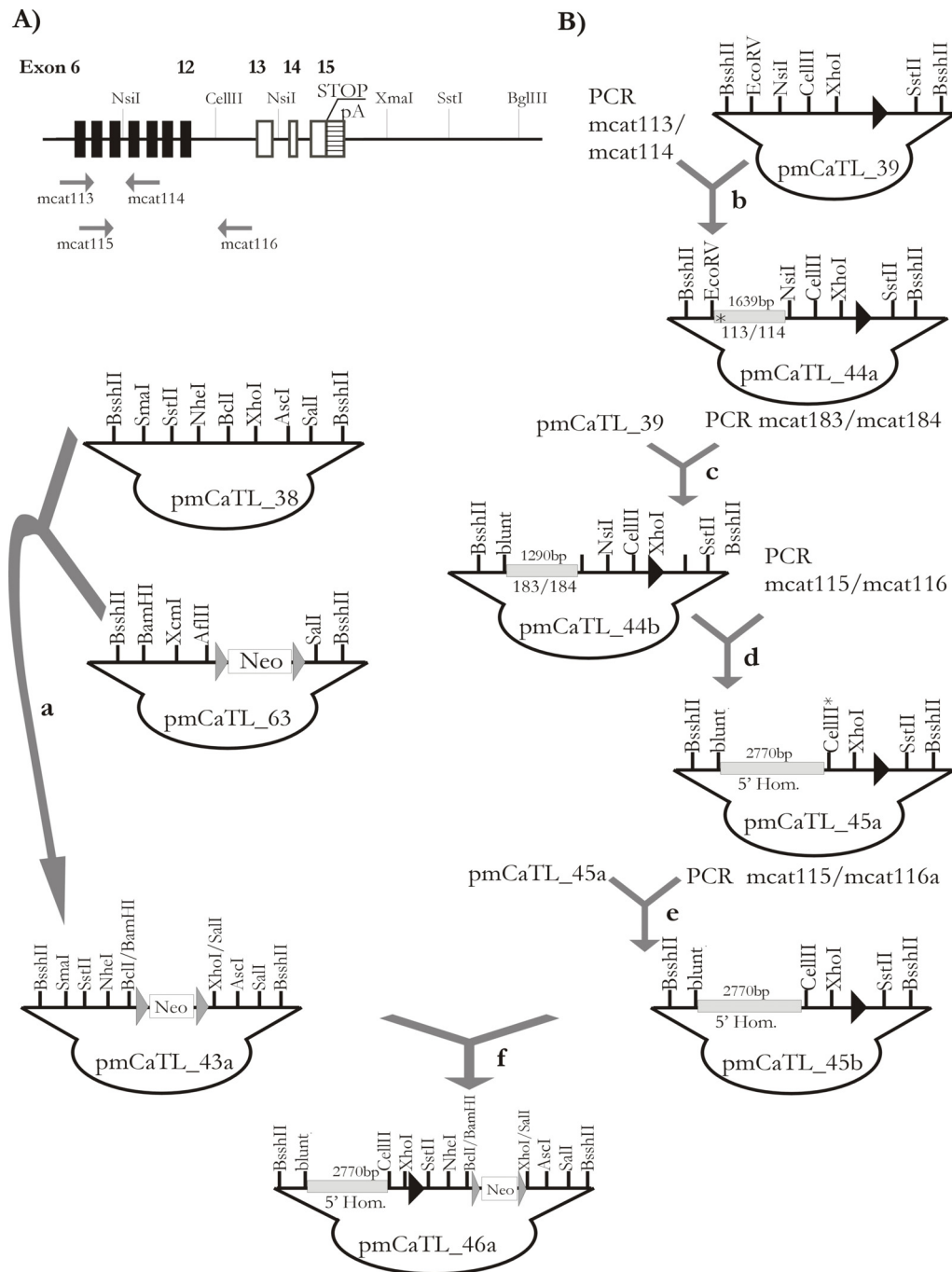


Abbildung 7-18 Targeting der Exons 13 bis 15 - Klonierung der 5'Homologie.

A) Darstellung der genomischen DNS von TRPV6 im Bereich der Exon 13, 14, 15 und Umgebung, für die Klonierung relevante Restriktionsschnittstellen sowie verwendete Oligodesoxynukleotidprimer. B) Subklonierung des BamHI/SalI frt-Neo-frt-Fragments in den mit BclI/XhoI geschnittenen Vektor pmCaTL_63 ergibt Klon pmCaTL_43a (a). Subklonierung des mit dem Primerpaar mcat113/114 erhaltenen DNS-Fragments in den EcoRV/NsiI geschnittenen Vektor pmCaTL_39 ergibt Klon pmCaTL_44a (b). Ersatz der fehlerhaften DNS-Fragmentes in pmCaTL_44a durch Subklonieren des mit dem Primerpaar mcat183/184 erzeugten blunt/NsiI-Fragmentes in den EcoRV/NsiI geschnittenen Vektor pmCaTL_39 ergibt pmCaTL_44b (c). Subklonieren des mit dem Primerpaar mcat115/mcat116 erhaltenen DNS-Fragments in den mit NsiI/CellIII geschnittenen Vektor pmCaTL_44b ergibt pmCaTL_45a (d). Ersatz der fehlerhaften CellIII-Sequenz in pmCaTL_45a durch Subklonieren des mit mcat115/mcat116a aus pmCaTL_45a erzeugten Fragments in den NsiI/XhoI geschnittenen Vektor pmCaTL_45a ergibt pmCaTL_45b (e). Subklonieren des BssHI/SstII Fragments aus pmCaTL_45b in SmaI/SstI geschnittenen Vektor pmcat43a ergibt pmCaTL_46a.

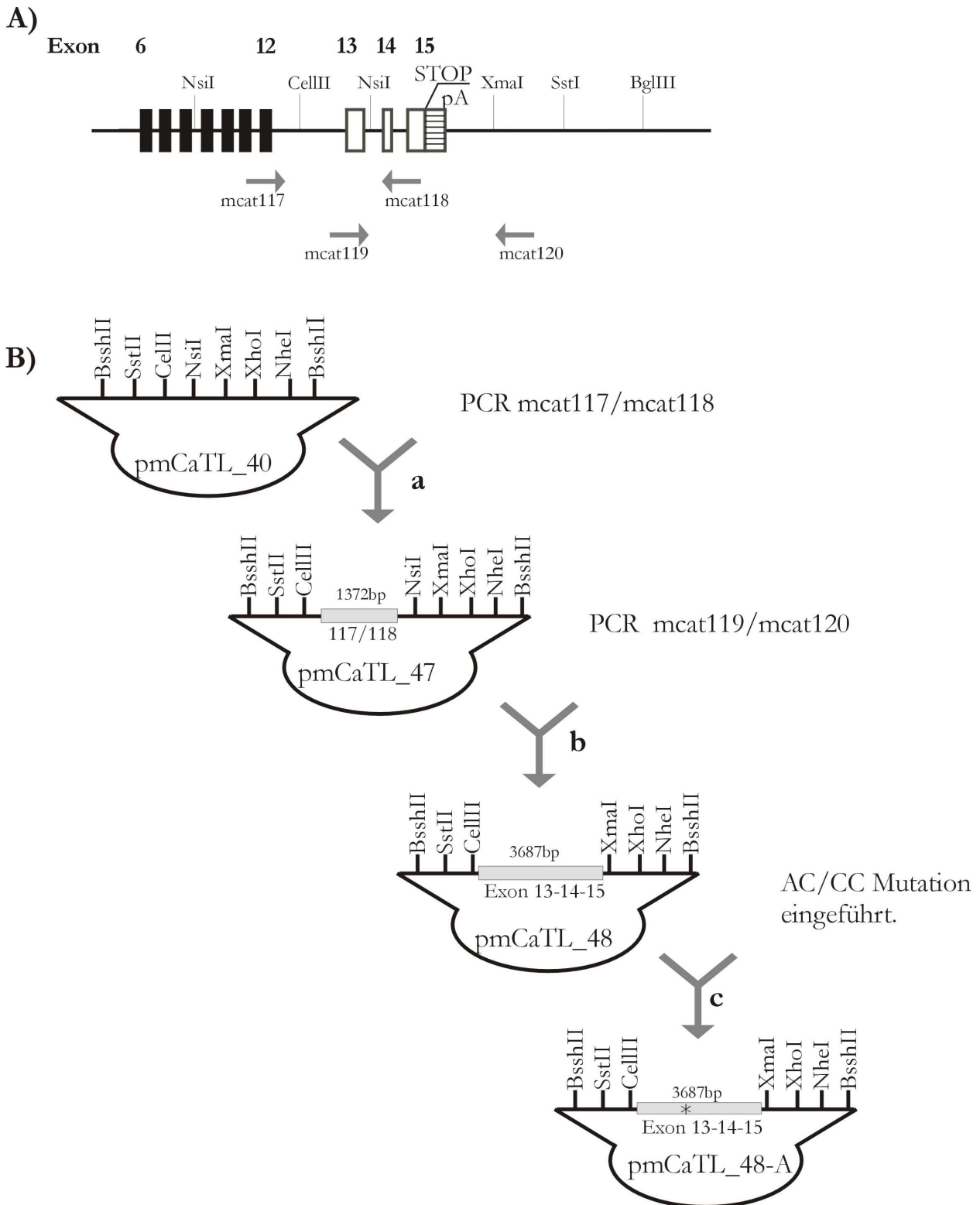


Abbildung 7-19 Targeting der Exons 13 bis 15 - Klonierung der Exons 13 bis 15.

A) Darstellung der genomischen DNS von TRPV6 im Bereich der Exon 13, 14, 15 und Umgebung, für die Klonierung relevante Restriktionsschnittstellen sowie verwendete Oligodesoxynukleotidprimer. B) Subklonierung des mit dem Primerpaar mcat117/118 erhaltenen DNS-Fragments in den CellIII/NsiI geschnittenen Vektor pmCaTL_40 ergibt Klon pmCaTL_47 (a). Subklonierung des mit dem Primerpaar mcat119/120 erhaltenen DNS-Fragments in den NsiI/XmaI geschnittenen Vektor pmCaTL_47 ergibt Vektor pmCaTL_48 (b). Einbringen der D541A Mutation in pmCaTL_48 ergibt pmCaTL_48-A (c).

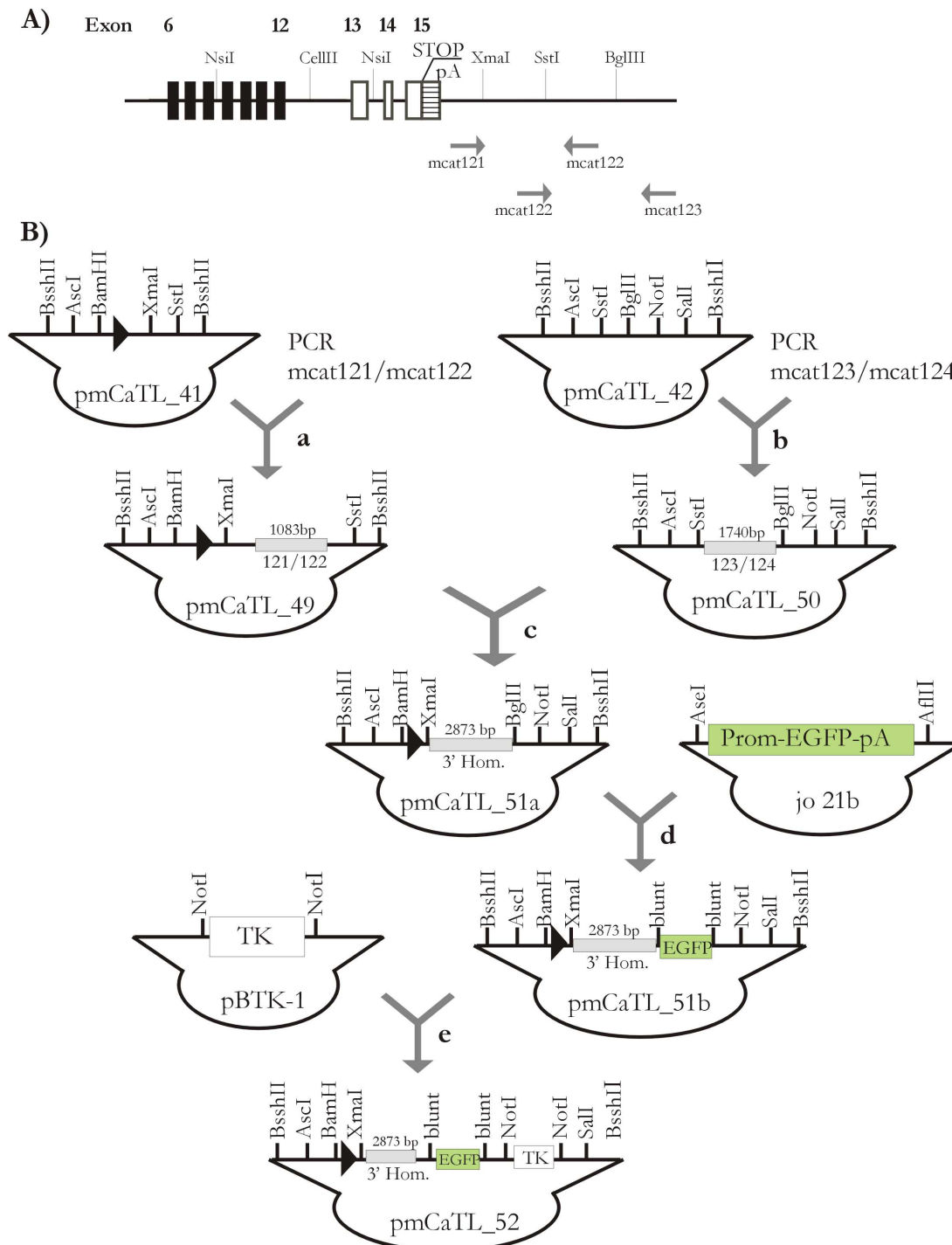


Abbildung 7-20 Targeting der Exons 13 bis 15 - Klonierung der 3'Homologie.

A) Darstellung der genomischen DNS von TRPV6 im Bereich der Exone 13, 14, 15 und Umgebung, für die Klonierung relevante Restriktionsschnittstellen sowie verwendete Oligodesoxynukleotidprimer. B) Subklonierung des de mit dem Primerpaar mcat 121/mcat122 erhaltenen DNS-Fragments in den mit XmaI/SstI geschnittenen Vektor pmCaTL_41 ergibt den Vektor pmCaTL_49 (a). Subklonierung des mit dem Primerpaar mcat123/124 erhaltenen DNS-Fragments in den SstI/BglIII geschnittenen Vektor pmCaTL_42 ergibt Klon pmCaTL_50 (b). Subklonieren des AscI/SstI-Fragments aus pmCaTL_49 in den AscI/SstI geschnittenen Vektor pmCaTL_50 ergibt pmCaTL_51a (c). Subklonieren des geglätteten AscI/AflIII-EGFP-Fragments aus jo21b in den mit BglIII geschnittenen und geglätteten Vektor pmCaTL_51a ergibt den Vektor pmCaTL_51b (d). Subklonieren des NotI/TK-Fragments aus pBTK-1 in den mit NotI geschnittenen Vektor pmCaTL_51b ergibt pmCaTL_52 (e).

Klonierung des Targetingkonstruktes

Die Targetingkonstrukte pmCaTL_54 und pmCaTL_54-A - letzteres für die Punktmutante - wurden in drei Schritten (Abbildung 7-21) aus den Vektoren pmCaTL_46a (Abbildung 7-18), pmCaTL_52 (Abbildung 7-20) und pmCaTL_48 bzw. pmCaTL_48-A (Abbildung 7-18) erstellt (Abbildung 7-21): Das AscI/SalI-Fragment aus pmCaTL_52 wurde in die AscI/SalI-Schnittstelle des Vektors pmCaTL_46a subkloniert (Abbildung 7-21 a). In die SstI/NheI-Schnittstellen von dem so erhaltenen Plasmid pmCaTL_53 wurde dann entweder das SstI/NheI-Fragment aus pmCaTL_48 bzw. aus pmCaTL_48-A kloniert. Es resultiert Vektor pmCaTL_54 (Abbildung 7-21 b) bzw. Vektor pmCaTL_54-A (Abbildung 7-21 c). Der Vektor pmCaTL_54 ist das Targetingkonstrukt für die konditionierte Inaktivierung das TRPV6 Gens; pmCaTL_54-A unterscheidet sich von pmCaTL_54 nur durch die Punktmutation, die zum Austausch des Aspartatrestes durch einen Alaninrest führt.

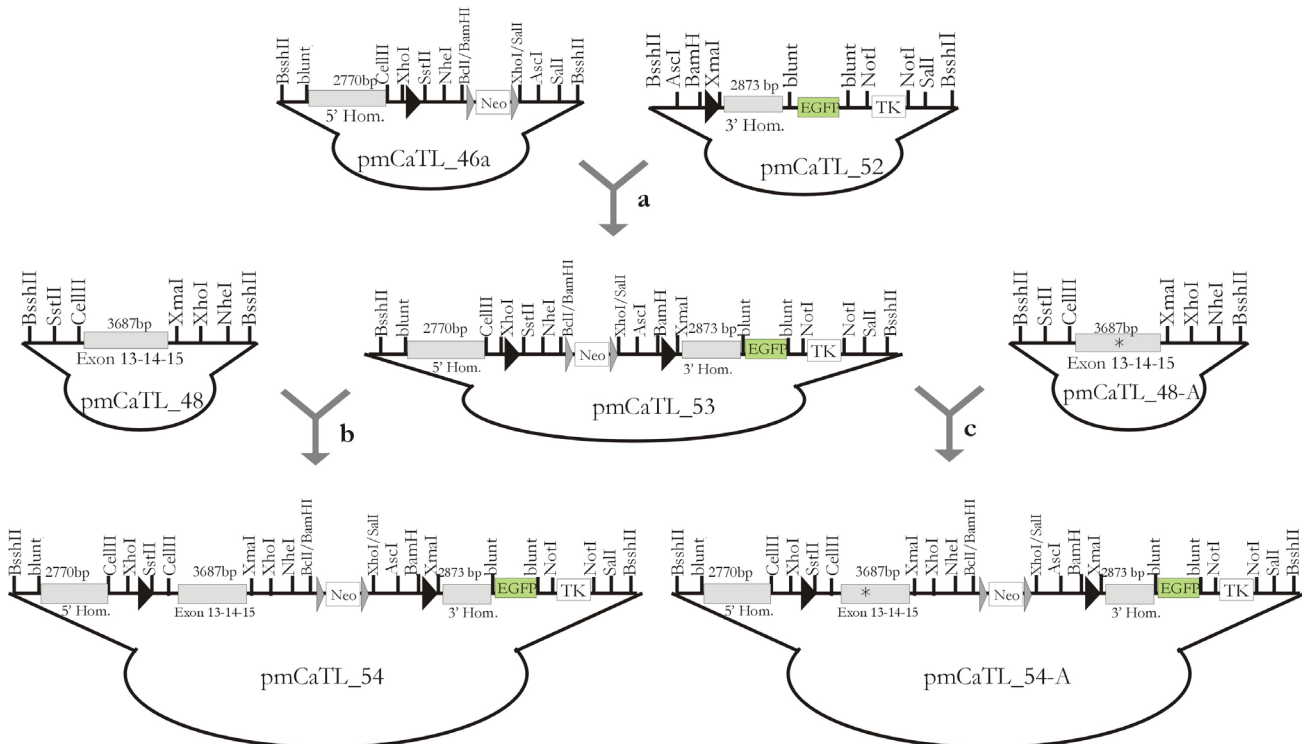


Abbildung 7-21 Targeting der Exons 13 bis 15 - Klonierung der Targetingkonstrukte pmCaTL_54 und pmCaTL_54-A

Subklonierung des AscI/SalI Fragmentes aus pmcaTL_52 in die AscI/SalI-Schnittstelle von pmCaTL_46a ergibt den Vektor pmCaTL_53(a). Subklonierung des SstI/NheI Fragmentes aus pmCaTL_48 in den SstI/NheI geschnittenen Vektor pmCaTL_53 ergibt Vektor pmCaTL_54 (b). Subklonierung des SstI/NheI Fragmentes aus pmCaTL_48-A in den SstI/NheI geschnittenen Vektor pmCaTL_53 ergibt Vektor pmCaTL_54-A (c).

Erläuterung der Southern-Strategie zum Nachweis der korrekten Rekombination

Um nach der Elektroporation der Targetingkonstrukte pmCaTL_54 und pmCaTL_54-A das homologe Rekombinationsereignis mittels Southern Blot nachweisen zu können, wurden zwei Sonden kloniert. Die beiden Sonden wurden so gewählt, dass sie außerhalb der homologen Arme des Targetingkonstruktes liegen, d.h. 5' des 5'-homologen Arms und 3' des 3'-homologen Arms. Als Restriktionsenzyme für den Restriktionsschnitt wurden Enzyme gewählt, die mindestens eine

Erkennungsstelle außerhalb der homologen Arme des Targetingkonstruktes besitzen und die genomische DNS effektiv schneiden. Für die Southern-Hybridisierung mit der 5'-Sonde wurde das Enzym XhoI gewählt, für die Southern-Hybridisierung mit der 3'-Sonde das Enzym BamHI. In die Targetingkonstrukte pmCaTL₅₄ und pmCaTL₅₄-A sind Erkennungssequenzen für diese Enzyme zusätzlich eingebaut worden. Abbildung 7-22 zeigt oben die Situation im Wildtyp Allel mit den relativen Positionen der Schnittstellen für XhoI (X, blau) und BamHI (B, rot). Wird die genomische Wildtyp-DNS mit XhoI geschnitten, sollte Hybridisierung mit der 5'-Sonde (blau in Abbildung 7-22 oben) mit einem 11,2 kb Fragment erfolgen; bei einem Schnitt mit BamHI sollte die 3'-Sonde (rot in Abbildung 7-22 oben) mit einem 6,7 kb Fragment hybridisieren. Durch homologe Rekombination des Targetingkonstruktes (mittlerer Teil der Abbildung 7-22) verkürzten sich die mit den Sonden nachgewiesenen DNS-Fragmente. Im Fall der 5'-Sonde von 11,2 kb auf 5,6 kb, im Falle der 3'-Sonde von 6,7 kb auf 3,5 kb (unterer Teil der Abbildung 7-22). Durch die zusätzlich eingebaute XhoI Schnittstelle 5' der ersten loxP-Seite ist es möglich, korrekt homolog rekombinante Klone von solchen zu unterscheiden, bei denen eine homologe Rekombination zwar stattgefunden hat, die loxP-Sequenz jedoch nicht eingebaut wurde.

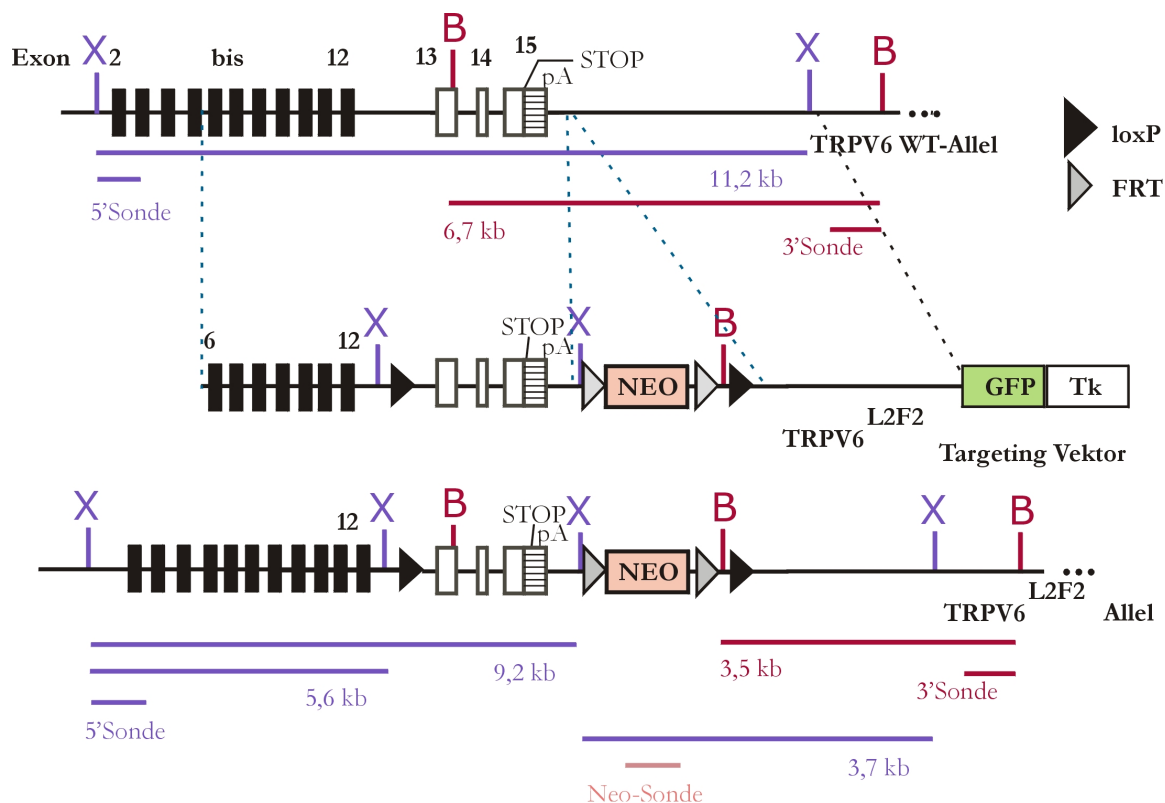


Abbildung 7-22 Targeting der Exons 13 bis 15 - Southern-Strategie.

Southern-Strategie mit 5'-Sonde und 3'-Sonde zum Nachweis der korrekten homologen Rekombination. Dargestellt sind Wildtyp-Allel, Targetingvektor und rekombinantes Allel. Außerdem die relative Lokalisation der Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XhoI (X), BamHI (B) sowie der 5'-, 3'- und Neo-Sonde. Die loxP-Sequenzen sind durch schwarze Dreiecke symbolisiert, die frt-Sequenzen durch graue Dreiecke. Nach homologer Rekombination entstehen zusätzliche Restriktionsschnittstellen, so dass sich die bei der Southern Blot Analyse mit den 5'- bzw. 3'-Sonden nachgewiesenen DNS Fragmente von 11,2 kb auf 5,6 kb (5'-Sonde) und von 6,7 kb auf 3,5 kb (3'-Sonde) verkürzen sollten; mit der Neo-Sonde sollte ein DNS-Fragment der Länge 3,7 kb nachweisbar werden.

Klonierung der Southern Sonden und ihre Überprüfung

Als 5'-Sonde konnte die für das Targeting des ersten Exons klonierte 3'-Sonde verwendet werden, also pmCaTL_08 (Abbildung 7-10). Als 3'-Sonde wurde das 980 bp Fragment, das über PCR mit dem Primerpaar mcat101/mcat102 synthetisiert wurde, in den mit SmaI geschnittenen Vektor pUC 18 subkloniert. Der resultierende Klon pmCaTL_37 wurde sequenziert und anschließend das 650 bp BglII/BamHI-Fragment als 3'-Sonde präpariert (Abbildung 7-23).

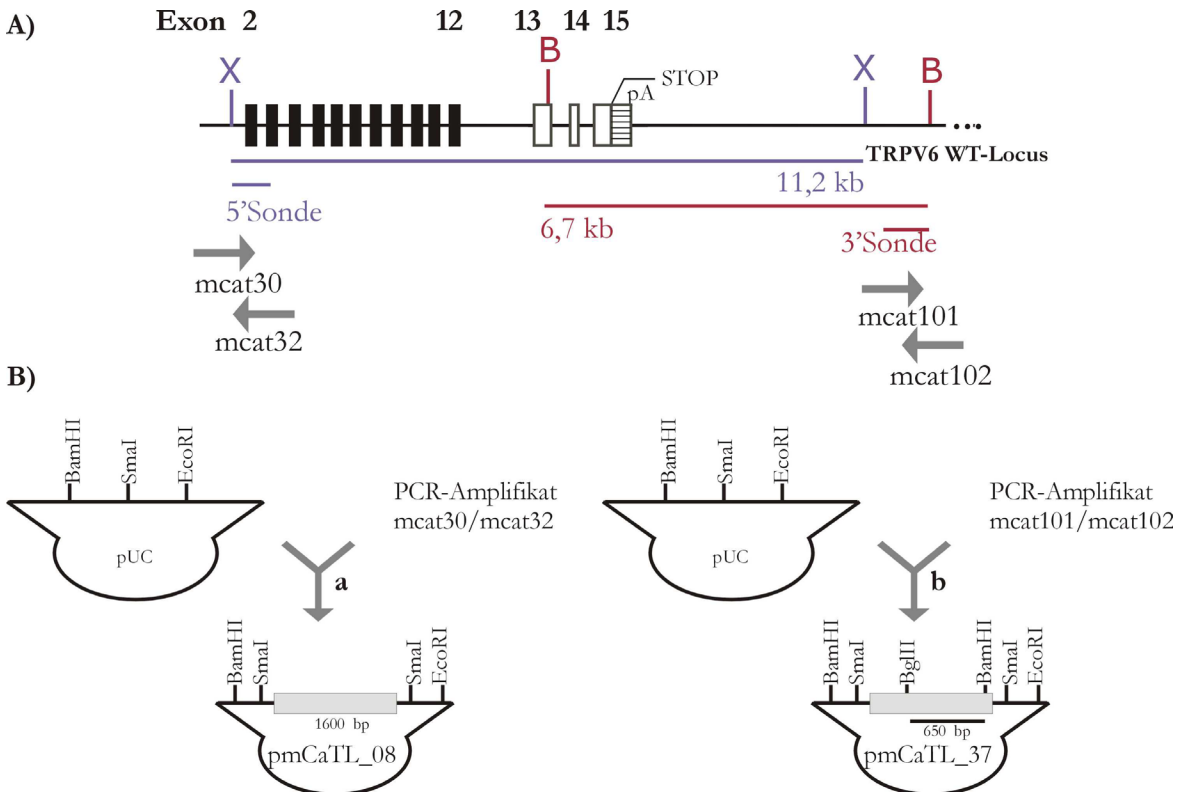


Abbildung 7-23 Targeting der Exons 13 bis 15 -Klonierung der Southern Sonden

Relative Lage der 5'-Sonde und der 3'-Sonde (A) und Klonierungsstrategie (B). X, XbaI; B, BamHI; weiteres siehe Text.

Beiden Sonden wurden im Southern Blot überprüft. Hierzu wurde genomische DNS aus R1 ES-Zellen und genomische DNS aus Schwanzgewebe mit den Enzymen XhoI bzw. BamHI geschnitten, der Größe nach auf Agarosegelen aufgetrennt und mit der jeweiligen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Wie Abbildung 7-24 zeigt, erkennen beide Sonden DNS-Fragmente der erwarteten Länge, ein 11,2 kb Fragment (5'-Sonde Abbildung 7-24 links) und ein 6,7 kb Fragment (3'-Sonde, Abbildung 7-24 rechts).

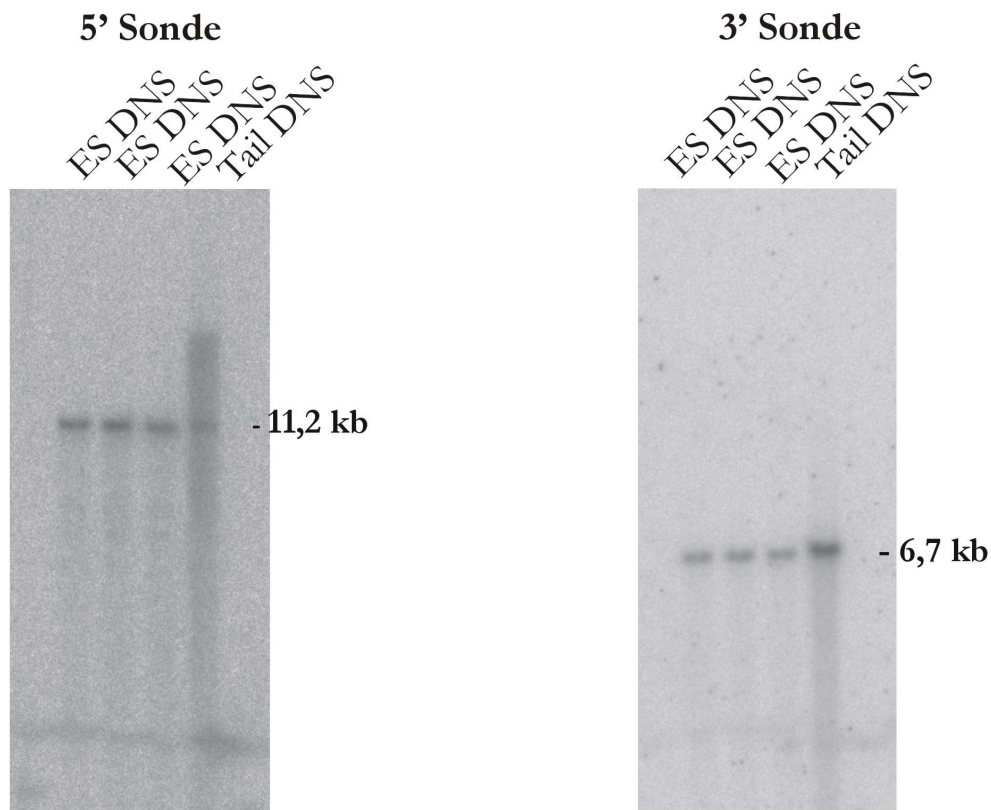


Abbildung 7-24 Targeting der Exons 13 bis 15 - Testen der Southern Sonden

Southern Blot mit der 5'-Sonde (pmCaTL_08) und der 3'-Sonde (pmCaTL_37). Aufgetragen ist genomische DNS von Schwanzgewebe (Tail) und ES-Zellen (ES), die mit XhoI (links) bzw. BamHI (rechts) geschnitten wurde.

7.3 TARGETING DES TRPV6-GENS

7.3.1 VERSUCHE, DIE MIT DEM TARGETINGKONSTRUKT PMCATL_26 DURCHGEFÜHRT WURDEN

Mit dem ersten Targetingkonstrukt pmCaTL_26 wurden insgesamt drei unabhängige Targetingexperimente durchgeführt. Alle Elektroporationen und die dafür erforderlichen Vorbereitungen wurden wie in 6.3.2 beschrieben durchgeführt und sind in Tabelle 7-1 zusammengefasst. Um die ES-Zellen mit homolog rekombinierter DNS anzureichern wurde 24 Stunden nach der Elektroporation der ES-Zellen mit der Selektion in Anwesenheit von G418 begonnen (350 µg/ml). Nachdem die ES-Zellklone einen Durchmesser von ungefähr 300 µm erreicht hatten und im 2,5er Objektiv des Stereomikroskops gut sichtbar waren, wurden insgesamt 1321 selektionierte Zellklone wie in 6.3.2 beschrieben isoliert, auf 96-Lochplatten expandiert, und anschließend eingefroren bzw. zur Präparation von genomischer DNS verwendet.

Tabelle 7-1 Übersicht über die bei den Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL₂₆ erhaltenen ES-Zellklone

Elektroporation A und B: verwendete ES-Zell Charge: ES R1 Nagy 2001, verwendetes FCS: Invitrogen, Kat.No.10437028; LotNr. 1016785. Elektroporation C: verwendete ES-Zellen Charge: ES R1 Nagy 1998, verwendetes FCS: Invitrogen, Kat.No: 10437028; LotNr: 1016785. Elektroporation D und E (09.10.2002): verwendete ES-Zell Charge: ES R1 Nagy 1998, verwendetes FCS: Invitrogen, Kat.No:10437028; LotNr: 1016785

	Anzahl der elektroporierten ES-Zellen	Passagen der ES-Zellen	Eingesetzte Menge an DNS	$\frac{\mu\text{g DNA}}{10^7 \text{ Zellen}}$	Anzahl der isolierten Klone	Anzahl der homolog rekombinanten Klone
Elektroporation A 02.06.2002	$0,44 \times 10^7$	16	15 μg	34	18	keine
Elektroporation B 02.06.2002	1×10^7	16	15 μg	15	24	keine
Elektroporation C 18.06.2002	$1,4 \times 10^7$	16	40 μg	28,5	348	keine
Elektroporation D 08.10.2002	$1,2 \times 10^7$	15	48 μg	40	391	keine
Elektroporation E 09.10.2002	$1,1 \times 10^7$	15	39 μg	35	540	keine

Gesamtzahl der isolierten ES-Zellklone, die mittels Southern Blots untersucht wurden: 1321

Im nächsten Schritt wurde mit der genomischen DNS Southern Blots durchgeführt. Es wurden insgesamt 40 Southern Blots durchgeführt. Bei keinem der Klone konnte mit einer der Sonden ein homologes Restriktionsereignis nachgewiesen werden. Die Abbildung 7-25 zeigt beispielhaft den Röntgenfilm eines Southern Blots der mit der 3'-Sonde hybridisiert worden war. Die Sonde hybridisiert lediglich mit dem erwarteten 13 kb DNS-Fragment der beiden Wildtyp-Allele (vergleiche Abbildung 7-9 und Abbildung 7-11). Dies bedeutet, dass keine homologe Rekombination stattgefunden hat. Dass eine Integration des Targetingkonstruktes in das Genom stattgefunden hat zeigt der rechte Teil der Abbildung 7-25: Hier wurde der Southern Blot mit einer Sonde hybridisiert, die Teile des Neomycin-Resistenzgens erkennt. Die einzelnen Klone weisen ein völlig unterschiedliches Hybridisierungsmuster auf. Dies bedeutet, dass die Targeting DNS nur zufällig in das Genom der ES-Zellen inseriert worden war.

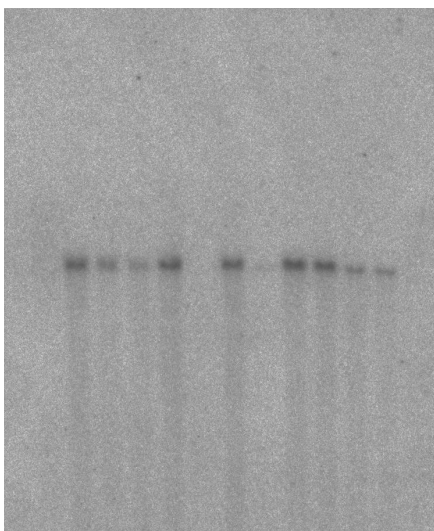


Abbildung 7-25
Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL₂₆ – Southern Blots.

Southern Blots mit genomischer DNS von selektierten ES-Zellen mit der 3'-Sonde (links) und der Neo-Sonde (rechts).

7.3.2 VERSUCHE, DIE MIT DEM TARGETINGKONSTRUKT pmCaTL_36 DURCHFÜHRT WURDEN

Mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_36 (vergleiche Abbildung 7-14) wurde ein Targetingexperiment durchgeführt. Alle Elektroporationen und die dafür erforderlichen Vorbereitungen wurden wie in 6.3.2 beschrieben durchgeführt. Tabelle 7-2 fasst die Ergebnisse dieses Versuchs zusammen.

Tabelle 7-2 Übersicht über die bei den Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_36 erhaltenen ES-Zellklone

Elektroporation F und G: verwendete ES-Zell Charge: ES R1 Nagy 1998, verwendetes FCS: Biochrom, Kat.No: S 0115, LotNr: 437 A.

	Anzahl der elektroporierten ES-Zellen	Passagen der ES-Zellen	Eingesetzte Menge an DNS	$\frac{\mu\text{g DNA}}{10^7 \text{ Zellen}}$	Anzahl der isolierten Klone	Anzahl der homolog rekombinanten Klone
Elektroporation F 17.04.2003	$1,05 \times 10^7$	16	20 μg	19	69	keine
Elektroporation G 17.04.2003	$0,96 \times 10^7$	16	35 μg	36	220	keine
Gesamtzahl der isolierten ES-Zellklone, die mittels Southern Blots untersucht wurden:					289	

Von den selektionierten Zellklonen - insgesamt 289 - wurde die genomische DNS isoliert. Von jedem dieser Klone wurde nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym BglII Southern Blots durchgeführt. Nach Hybridisieren mit der 3'-Sonde konnte kein homologes Rekombinationsereignis nachgewiesen werden. Abbildung 7-26 zeigt die Röntgenfilme von repräsentativen Southern Blots mit der DNS von 33 Klonen, links mit der 5'-Sonde hybridisiert, rechts mit der 3'-Sonde. Zur Kontrolle wurde die DNS aller Klone nach Restriktionsschnitt mit BamHI, Gel und Blot mit der 5'-Sonde inkubiert. Wie zu sehen ist, hybridisieren die Sonden nur mit den Wildtyp-Allelen, links mit dem erwarteten Fragment von 12 kb (vergleiche Abbildung 7-10 und Abbildung 7-11), rechts mit dem erwarteten Fragment von 13 kb (vergleiche Abbildung 7-10 und Abbildung 7-11).

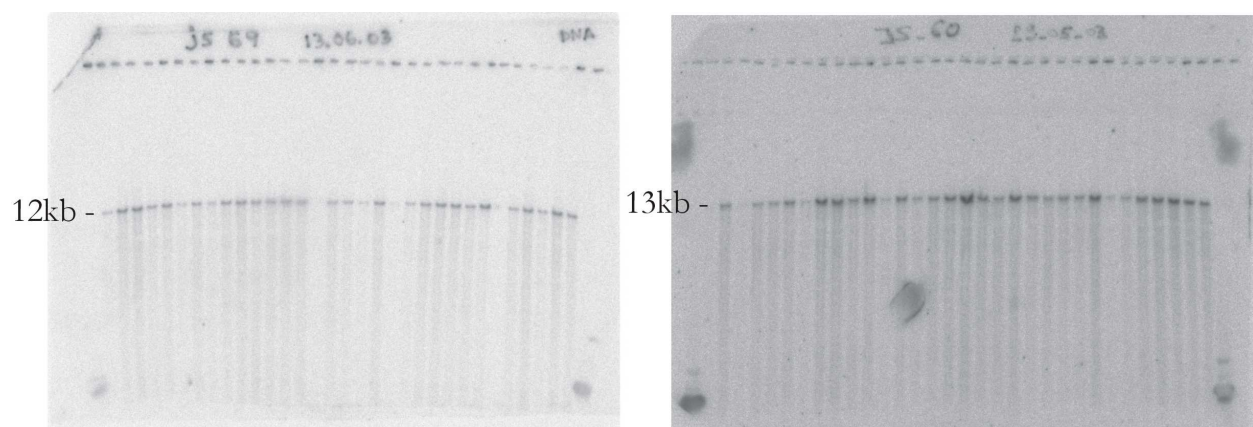


Abbildung 7-26 Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_36- Southern Blots.

Southern Blots und genomische DNS von selektionierten ES-Zellklonen, links mit der 5'-Sonde, rechts mit der 3'-Sonde hybridisiert.

7.3.3 VERSUCHE, DIE MIT DEN TARGETINGKONSTRUKTEN pmCaTL_54 UND 54-A DURCHGEFÜHRT WURDEN

Mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_54 und pmCaTL_54-A wurden insgesamt zwei Targetingexperimente durchgeführt: Tabelle 7-3 fasst die Zwischenergebnisse dieser Versuche zusammen. Die rekombinanten ES-Zellklone wurden wie beschrieben mit G418 (250 µg/ml) und Ganciclovir (2µM) selektioniert. Gleichzeitig wurden die Zellen unter einem Stereomikroskop mit angeschlossener Xenonlampe auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Dabei konnten insgesamt 330 grünfluoreszierende ES-Zellklone identifiziert und entfernt werden (Abbildung 7-27).

Tabelle 7-3 Übersicht über die bei den Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_54 und pmCaTL_54-A erhaltenen Klone.

Elektroporation H und I: verwendete ES-Zell Charge: ES R1 Nagy 1998, verwendetes FCS: Biochrom, Kat.No: S 0115, LotNr: 437 A. Elektroporation K und L: verwendete ES-Zell Charge: ES R1 Nagy 2001, verwendetes FCS: Biochrom, Kat.No. S 0115, LotNr.: 437 A.

	Anzahl der elektroporierten ES-Zellen	Passagen der ES-Zellen	Eingesetzte Menge an DNS	$\frac{\mu\text{g DNA}}{10^7 \text{ Zellen}}$	Anzahl der isolierten Klone	Anzahl der homolog rekombinanten Klone
Elektroporation H pmCaTL_54 05.11.04	$0,98 \times 10^7$	16	30 µg	31	144	1
Elektroporation I pmCaTL_54-A 05.11.04	$0,98 \times 10^7$	16	32 µg	32	357	keine
Elektroporation K pmCaTL_54 06.11.04	$1,25 \times 10^7$	18	17 µg	14	183	keine
Elektroporation L pmCaTL_54-A 06.11.04	$1,25 \times 10^7$	18	40 µg	32	456	2
Gesamtzahl der isolierten ES-Zellklone, die mittels Southern Blots untersucht wurden:					1140	

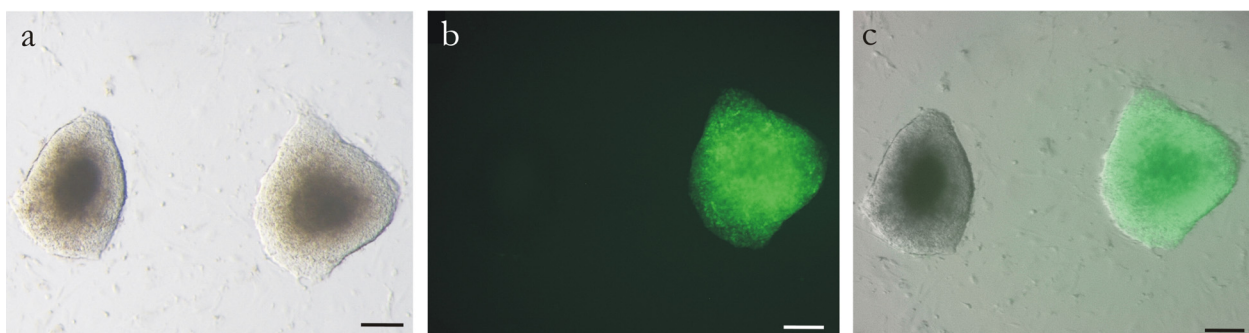


Abbildung 7-27 Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_54 und pmCaTL_54-A - Aufnahme zweier ES-Zellklone

a): Durchlicht. b): Fluoreszenz. c): Überlagerung von Durchlicht und Fluoreszenz: der rechte der beiden Zellklone zeigt grüne Fluoreszenz. Er wurde – wie die anderen GFP-positiven ES-Zellklone – verworfen. Die Balken entsprechen 100 µm

Dagegen wurden die selektionierten und GFP-negativen ES-Zellklone isoliert, expandiert und bei -80 °C aufbewahrt. Aus den DNS-Platten wurde, wie beschrieben, die genomische DNS präpariert und nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym BamHI auf Gelen aufgetrennt, geblottet und

zunächst mit der 3'-Sonde hybridisiert. Abbildung 7-28 zeigt zwei Spuren eines solchen Southern Blots, wobei die 3'-Sonde links mit den 6,7 kb BamHI Fragmenten der beiden Wildtyp-Allelen hybridisiert, rechts aber mit zwei DNS-Fragmenten. Das 6,7 kb Fragment stammt vom Wildtyp-Allel, das 3,5 kb Fragment dagegen von dem zweiten Allel. Seine Länge spricht dafür, dass in diesem Allel eine homologe Rekombination stattgefunden hat (vergleiche auch Abbildung 7-22). Insgesamt waren bei dieser Targetingrunde 1140 ES-Zellklone isoliert worden. Sieben davon zeigten nach einer ersten Durchmusterung der DNS mit Southern Blots das auf dem Röntgenbild in der rechten Spur gezeigte Hybridisierungsmuster mit der 3'-Sonde. Diese sieben Klone sind in Tabelle 7-4 zusammengefasst. Zwei der Klone gehen auf das Targetingkonstrukt pmCaTL_54 zurück, fünf auf das Targetingkonstrukt pmCaTL_54-A.

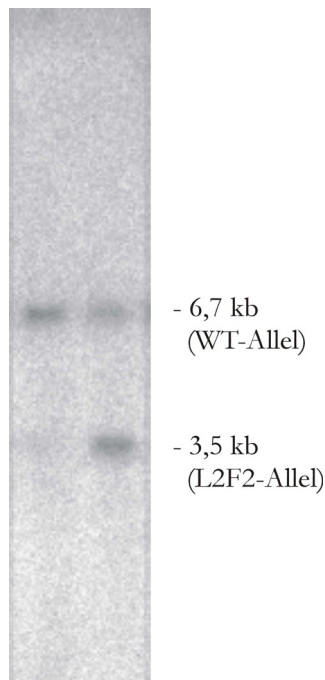


Tabelle 7-4 Positive ES-Zellklone nach Hybridisierung mit der 3'-Sonde

Klon	verwendetes Targetingkonstrukt	Aus Elektroporation
6F11	pmCaTL_54	H
12F1	pmCaTL_54	K
7C5	pmCaTL_54-A	I
8E11	pmCaTL_54-A	L
9D2	pmCaTL_54-A	L
16F8	pmCaTL_54-A	L
20F10	pmCaTL_54-A	L

Abbildung 7-28 Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL_54 und pmCaTL_54-A – Southern-Blot Analyse.

Southern-Blot Analyse der DNS eines homolog rekombinanten ES-Zellklons (rechts) und eines Zellklons, bei dem keine Rekombination stattgefunden hat (links) mit der 3' Sonde.

Diese 7 Klone wurden aufgetaut, da nach der Isolierung die Zellen zunächst in 96-Lochplatten bei -80 °C eingefroren wurden. Bei -80 °C beträgt die Überlebensdauer der ES-Zellen maximal 3 Monate, weshalb sie möglichst bald wieder aufgetaut, expandiert und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren werden sollten, wo sie nahezu unbegrenzt haltbar sind. Die in Tabelle 7-4 aufgelisteten Klone wurden also wie beschrieben aufgetaut und nach drei Passagierungen wieder eingefroren, diesmal in flüssigem Stickstoff bei -183 °C. Bei dem letzten Passagierungsschritt wurden einige Zellen ausgesät, um

nochmals die genomische DNS zu isolieren und sie ein weiteres Mal mit Southern Blot Experimenten auf das Rekombinationsereignis kontrollieren zu können. Nach Inkubation der DNS mit den entsprechenden Restriktionsenzymen für Southern Blots mit der 5'-Sonde, bzw. der Neomycin-Sonde und der 3'-Sonde wurde der Blot und die Hybridisierung durchgeführt.

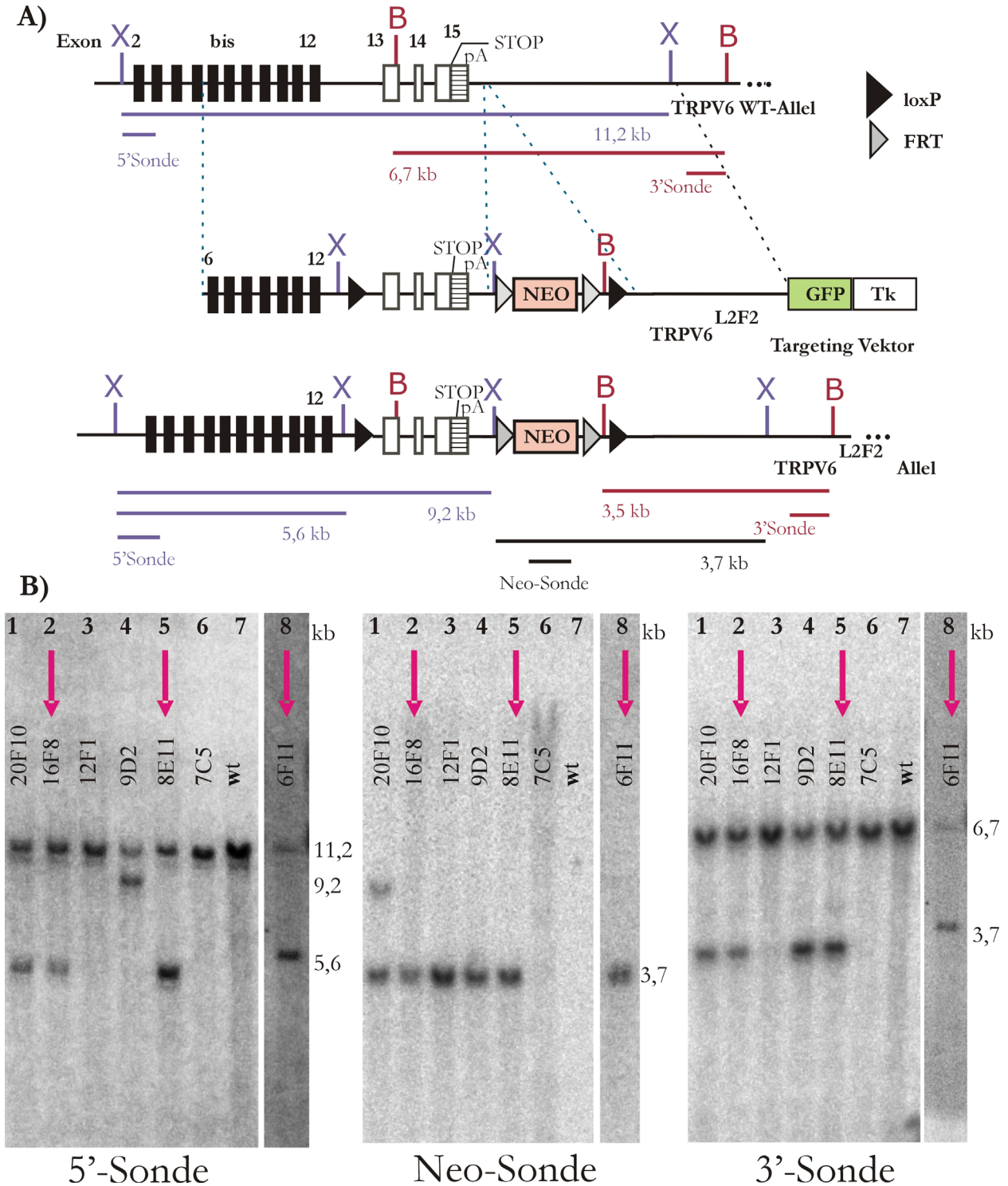


Abbildung 7-29 Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pmCaTL₅₄ und pmCaTL_{54-A} – Ergebnis.

Hybridisierung der, im Screening mit der 3'-Sonde positiven, Klone mit allen drei Sonden. Von den im ersten Screening identifizierten 7 Klonen waren nur 3 Klone mit allen Sonden positiv: 6F11, 8E11, 16F8 (mit einem roten Pfeil markiert).

Abbildung 7-29 zeigt die drei Blots im unteren Teil (B); oben sind die Orientierung der zu erwartenden DNS-Fragmente nach Hybridisierung mit der jeweiligen Sonde zu sehen.

Die 5'-Sonde hybridisiert mit dem 5,6 kb Fragment, das bei homologer Rekombination zu erwarten ist, in den Spuren eins, zwei, fünf und acht des Southern Blots. Zusätzlich erkennt sie z.B. in Spur vier ein 9,2 kb Fragment, das nur dann entstehen kann, wenn die Restriktionsschnittstelle für XhoI (X in Abbildung 7-29) die vor der ersten loxP Seite eingefügt wurde, fehlt. Man kann davon ausgehen, dass in der DNS dieses Zellklons auch die loxP-Seite fehlt. Gleichzeitig hybridisiert die 5'-Sonde in allen acht Spuren (Spur sieben enthält DNS von Wildtyp-Zellen als Kontrolle) mit dem 11,2 kb Fragment, das vom Wildtyp-Allel abstammt.

Die Neo-Sonde hybridisiert mit einem Teil des Neomycin-Resistenzgens, das in allen rekombinanten Klonen vorhanden sein sollte. Tatsächlich hybridisiert die Sonde nur mit der DNS von sechs der sieben Klone (Abbildung 7-29 B: Spuren eins bis fünf und acht im mittleren Röntgenfilm). Die DNS der sechsten Spur verhält sich wie die DNS vom Wildtyp in der siebten Spur (Abbildung 7-29). Weiterhin ist zu erkennen, dass die Neo-Sonde in der ersten Spur mit einem weiteren Fragment hybridisiert. Offensichtlich ist das Neomycin-Resistenzgen zweimal in das Genom integriert worden.

Die 3'-Sonde hybridisiert mit DNS in den Spuren eins, zwei, vier, fünf und acht sowohl mit dem Wildtypfragment von 6,7 kb als auch mit dem zu erwartenden 3,7 kb Fragment, das bei Rekombination auftreten sollte. Vergleicht man die Ergebnisse aus allen drei Hybridisierungen wird deutlich, dass sich nur mit der DNS von drei Zellklonen alle drei Sonden das für eine korrekte Rekombination zu erwartende Ergebnis nachweisen lässt. Dies ist die DNS von Spur zwei (Klon 16F8), Spur fünf (Klon 8E11) und Spur acht (Klon 6F11). Nur bei der DNS dieser drei Klone lässt sich das korrekte Bandenmuster nachweisen. Bei den anderen ES-Klonen scheint entweder die Neomycin-Resistenzkassette zweimal enthalten zu sein (20F10), eine loxP-Sequenz zu fehlen (9D2), oder aber das Bandenmuster ist nicht erklärbar (12F1); schließlich scheint der Klon 7C5 in keiner Weise das Targetingkonstrukt inseriert zu haben. Zusammenfassend weisen also drei von 1140 isolierten Zellklonen das beabsichtigte Rekombinationsereignis auf; sie sind heterozygot für die eingefügte Mutation. Die Rekombinationseffizienz bei diesem Targeting liegt also bei 2,6 Promille.

7.4 INJEKTION DER REKOMBINANTEN ES-ZELLKLONE IN BLASTOZYSTEN UND CHARAKTERISIERUNG DER CHIMÄREN

Aus dem Targeting des TRPV6 Genlocus sind insgesamt drei homolog rekombinante ES-Zellklone hervorgegangen: Die Klone 6F11, 8E11 und 16F8. Diese Klone sind bezüglich des TRPV6-Genlocus heterozygot: Der Zellklon 6F11 ist aus der Elektroporation des Targetingkonstruktes pmCaTL_54 hervorgegangen, er besitzt deshalb ein Wildtyp- und ein L2F2_Allel. Die beiden Zellklone 8E11 und 16F8, die durch Elektroporation des Targetingkonstruktes pmCaTL_54-A entstanden sind, besitzen ein Wildtyp- und ein L2F2-D541A-Allel. Da nur drei ES-Zellklone für eine Blastozysteninjektion zur Verfügung standen musste keine Auswahl bezüglich der morphologisch schönsten Klone getroffen werden - alle Klone wurden injiziert.

Durch die Blastozysteninjektion entstehen so genannte Chimären: Tiere, die aus Zellen verschiedenen Ursprungs zusammengesetzt sind, in diesem Fall aus Zellen der Blastozyste und der injizierten ES-Zellen. Um den Beitrag der injizierten ES-Zellen zum Tier abschätzen zu können, wurden für die Injektion Blastozysten der Mauslinie C57bl/6 verwendet, die eine dunkle Fellfarbe besitzen. Die von uns verwendeten R1 ES-Zellen sind dagegen homozygot für white-bellied agouti Allel (A^w/A^w), dieses Allel kodiert für ein helles, cremefarbenes Fell. Die von den Ammenmüttern geborenen chimären Tiere wurden anhand ihrer Fellfarbe in hochchimär – diese Tiere bestehen zu einem großen Anteil aus injizierten ES-Zellen – bis wenig chimär eingestuft. Man geht also davon aus, dass der Prozentsatz an aus ES-Zellen hervorgegangenen Zellen in den restlichen Geweben der chimären Mäuse ähnlich hoch ist wie im Fell.

Tabelle 7-5 Ergebnis der Blastozysteninjektionen

Zellklon	Termin	Passage	ES-Zellen pro Blastozyste	Zahl der Blastozysten	Zahl der Ammenmütter	Geborene Tiere
6F11	15. April 2005	27	9 bis 11	44	4	26
8E11	24. März 2005	28	11 bis 13	30	3	3
8E11	15. April 2005	28	9 bis 11	42	4	12
16F8	24. März 2005	27	11 bis 13	31	3	4

Es wurden zwei Blastozysteninjektionen durchgeführt, jeweils mit zwei ES-Zellklonen. Dazu wurden die ES-Zellen zunächst in Kultur genommen und wie beschrieben am 24. März 2005 injiziert. Verwendet wurden die ES-Zellklone 8E11 und 16F8; beides Klone die aus dem Targeting mit dem Konstrukt pmCaTL_54-A hervorgegangen sind. Bei dieser Blastozysteninjektion wurden pro Blastozyste 11 bis 13 ES-Zellen injiziert. Aus diesem Experiment wurden nur wenige lebensfähige

chimäre Tiere – erkennbar an der braunen Fellfarbe – geboren (vgl. Tabelle 7-5). Deshalb wurde bei dem zweiten Termin, am 15. April 2005, nur 9 bis 11 ES-Zellen pro Blastozyste injiziert. Bei diesem Experiment wurden die ES-Zellklone 8E11 und 6F11 verwendet. Insgesamt wurde auch eine größere Anzahl von Blastozysten injiziert. Aus diesem Versuch gingen wesentlich mehr chimäre Tiere hervor. Die Ergebnisse der beiden Blastozysteninjektionen sind in Tabelle 7-5 und Tabelle 7-6 zusammengefasst.

Tabelle 7-6 Aufschlüsselung der geborenen Tiere und Abschätzen des Chimärismus

Der Grad an Chimärismus, also der Anteil der injizierten ES-Zellen an dem geborenen Tier, wird anhand der Fellfarbe abgeschätzt. Tiere mit hauptsächlich agouti-farbenem Fell werden als hochchimär, Tiere mit hauptsächlich dunklem Fell als wenig chimär definiert.

Geschlecht	Injektion		Außmaß des Chimärismus			
	Termin	Zelle	hoch	mittel	wenig	nicht sichtbar
Männlich	15.04.05	6F11	12	3	3	0
	24.03.05	8E11	1	1	0	0
	15.04.05	8E11	4	0	1	2
	24.03.05	16F8	2	1	0	2
Weiblich	15.04.05	6F11	2	0	4	2
	24.03.05	8E11	0	0	0	1
	15.04.05	8E11	0	1	1	3
	24.03.05	16F8	0	0	0	0
Gesamtzahl der Tiere:			21	6	9	10

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die durch die Blastozysteninjektionen generierten Tiere in der Lage sind das rekombinante Allel an ihre Nachkommen weiterzugeben, das heißt ob sie ‚keimbahngängig‘ sind. Die in Tabelle 7-6 aufgelisteten chimären Tiere bestehen aus Geweben, die aus den injizierten ES-Zellen hervorgegangen sind und aus Geweben, die von der Empfängerblastozyste abstammen. Entscheidend für die Keimbahntransmission ist, dass die Zellen der Keimbahn aus den injizierten ES-Zellen hervorgegangen sind. Dies ist bei hochchimären Mäusen wahrscheinlicher als bei wenig chimären, deshalb wurden für Verpaarungen möglichst hochchimäre Tiere ausgewählt. Die verwendeten R1 ES-Zellen entstammen einer männlichen Sv129 Blastozyste (Nagy et al., 1993). Daraus ergeben sich folgenden Konsequenzen: Zum einen können nur männliche Chimären die Mutation in der Keimbahn haben und an ihre Nachkommen weitergeben, des Weiteren sind diese Zellen homozygot für white-bellied agouti Allel (A^w/A^w). Nachkommen einer Verpaarung der männlichen Chimären mit schwarzen C57/Bl6 Weibchen sollten also agouti-farben (gelbbraun) sein, wenn sie heterozygot für die Mutation im TRPV6-Gen sind.

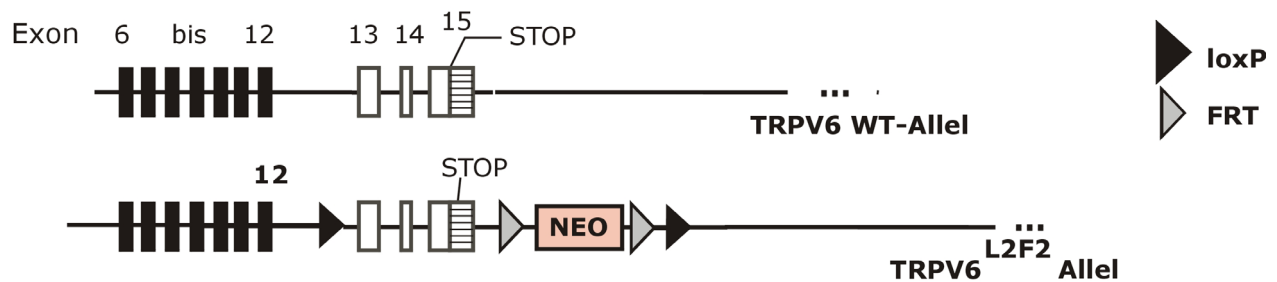
Die aus den Schwangerschaften der Leihmütter entstandenen Tiere (Tabelle 7-6) wurden auf ihre Fellfarbe hin untersucht. Da die verwendete Stammzelllinie männlich war, wurden nur hoch- bis mittelmäßig chimäre Männchen im Alter von 7-8 Wochen mit C57/Bl6 Weibchen verpaart. Nachkommen dieser Männchen wurden wie in Kapitel 7.5.1 beschrieben genotypisiert; Nachkommen mit hellbraunem (agouti-farbenem) Fell sollten einen heterozygoten Genotyp besitzen.

Tabelle 7-7 Nachkommen aus den Verpaarungen männlicher Chimären (Zellklone 6F11, 8E11 und 16F8)

Zellklon	Chimäre	Nachkommen (insgesamt)	davon heterozygote Nachkommen (+/L2F2)
<i>- Aus Targetingkonstrukt pmCaTL₅₄ -</i>			
6F11	L3075	6	4
6F11	L3076	30	12
6F11	L3077	7	4
6F11	L3078	12	4
6F11	L3079	12	5
6F11	L3080	21	0
6F11	L3081	28	9
6F11	L3083	14	7
6F11	L3084	14	0
6F11	L3085	30	16
6F11	L3086	18	8
6F11	L3087	24	11
6F11	L3088	14	9
6F11	L3090	23	7
6F11	L3092	31	14
<i>- Aus Targetingkonstrukt pmCaTL_{54-A} -</i>			
davon heterozygote Nachkommen (+/L2F2-D541A)			
8E11	L3093	27	10
8E11	L3094	23	10
8E11	L3095	45	18
16F8	L3073	81	17

In Tabelle 7-7 sind die aus den Verpaarungen der chimären Männchen geborenen Nachkommen aufgelistet. Von den Chimären, die aus der Blastozysteninjektion des ES-Zellklons 6F11 hervorgegangen sind, waren bis auf zwei Tiere (L3080 und L3084) alle Männchen in der Lage das mutierte Allel L2F2 (Abbildung 7-30 oben) an ihre Nachkommen zu vererben. Die aus den ES-Zellklonen 8E11 und 16F8 hervorgegangenen chimären Männchen waren ausnahmslos keimbahngängig; heterozygote Nachkommen aus diesen Verpaarungen besitzen das Allel L2F2-D541A (Abbildung 7-30 unten).

Chimären aus Klon 6F11 mit WT \rightarrow +/L2F2



Chimären aus Klon 8E11 und 16F8 mit WT \rightarrow +/L2F2-D541A

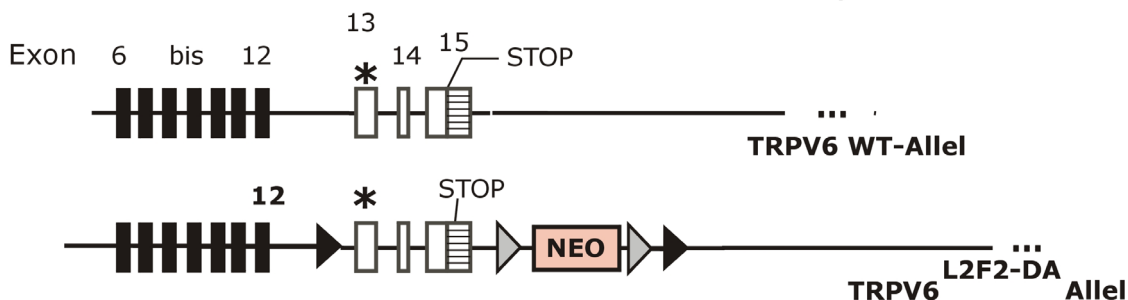


Abbildung 7-30 Genotyp der Nachkommen aus den Verpaarungen der Chimären

7.5 BESTIMMUNG DER MAUS-GENOTYPEN

7.5.1 GENOTYPISIERUNG DER NACHKOMMEN DER CHIMÄREN

Bei Verpaarung der chimären Männchen mit Wildtyp-Weibchen können Nachkommen entstehen, die entweder zwei Wildtyp-Allele oder ein Wildtyp- und ein L2F2- bzw. L2F2-D541A-Allel besitzen, also heterozygot sind. Die heterozygoten Nachkommen werden für die weitere Zucht verwendet, um sie zu identifizieren wurde ein PCR-Protokoll zur Genotypisierung entwickelt, bei dem ein kurz hinter dem Exon 15 gelegener Primer (mcat121) mit zwei unterschiedlichen Primern des reversen DNS-Strangs (mcat120 und m4_194) kombiniert wird (Abbildung 7-31). Diese Primer sind für beide rekombinanten Allele – für L2F2 und für L2F2-D541A – geeignet, da die Punktmutation D541A im Exon 13 liegt. DNS ohne das rekombinante Allel sollten nur ein Amplifikat mit der Primerkombination mcat121/mcat120 ergeben, DNS mit rekombinantem Allel Amplifikate mit

beiden Primerkombinationen. Um die optimalen Bedingungen für diese PCR herauszufinden, wurde das gleiche Amplifizierungs-Protokoll bei acht verschiedenen Annealingtemperaturen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente dabei genomische DNS aus dem homolog rekombinanten ES-Zellklon 8E11. Als geeignetste Annealingtemperatur erwies sich 62 °C.

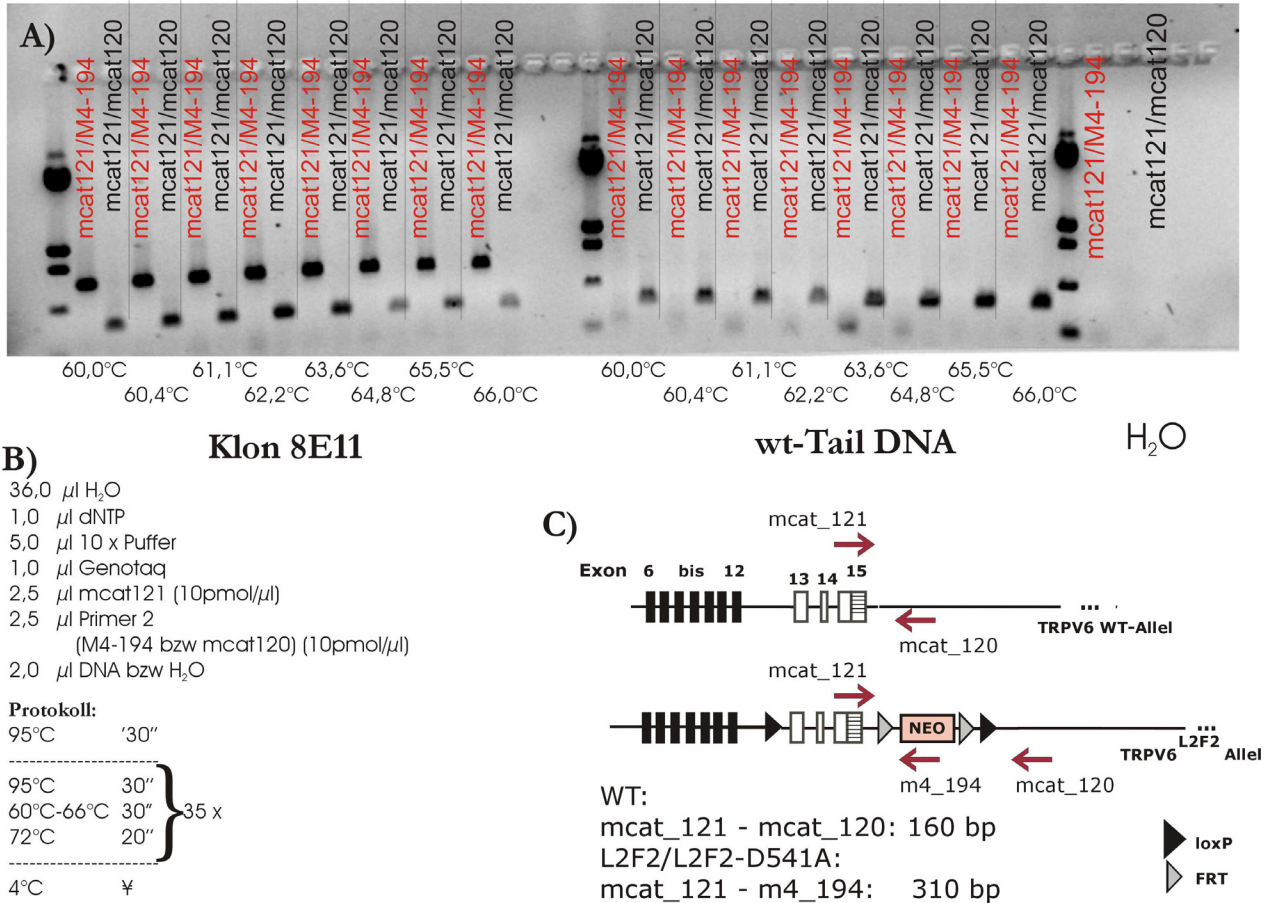


Abbildung 7-31 Targeting von mTRPV6 - Optimierung des PCR-Protokolls zur Bestimmung der Genotypen

Zu sehen sind die auf einem Agarosegel aufgetrennten DNS-Fragmente, die unter verschiedenen Bedingungen amplifiziert wurden (siehe Text) (A). Die Zusammensetzung der PCR-Reaktion und verwendete Amplifizierungs-Protokolle (B). Die jeweiligen Allele und die relative Lage der verwendeten Primer (C).

Nach der Optimierung des PCR-Protokolls wurden die ersten Nachkommen aus den Verpaarungen der Chimäre L3095 mit Wildtyp-Weibchen genotypisiert. Schon im ersten Wurf konnten von acht Tieren zwei heterozygote Nachkommen CA 5.1.2 und CA 5.1.8 identifiziert werden Abbildung 7-32. Beide Tiere sind Weibchen.

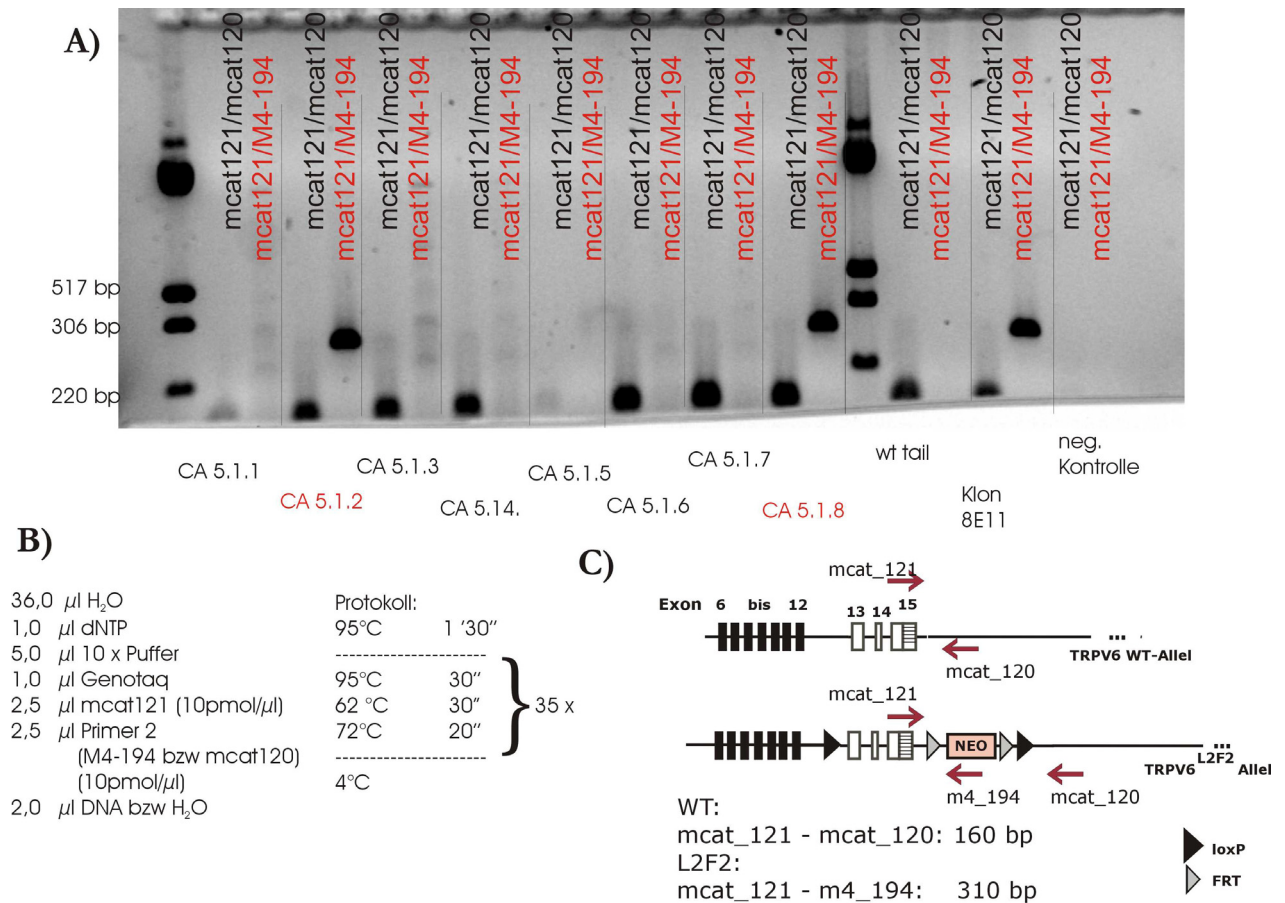


Abbildung 7-32 Targeting von mTRPV6 - Genotypisierung der Nachkommen aus dem ersten Wurf

Zu sehen sind die auf ein Agarosegel auftrennten amplifizierte DNS-Fragmente von verschiedenen Tieren (A). Die Zusammensetzung der PCR-Reaktion und das verwendete Protokoll (B). Die jeweiligen Allele und die relative Lage der verwendeten Primer (C).

7.5.2 GENOTYPISIERUNG DER NACHKOMMEN HETEROZYGOTER TIERE NACH VERPAARUNG MIT CRE-DELETER-TIEREN

Die in Tabelle 7-7 aufgelisteten heterozygoten Tiere wurden zum einen mit der Cre-Deleter Mauslinie verpaart, die die Cre-Rekombinase in allen Zellen des Organismus exprimiert. Nachkommen dieser Verpaarungen besitzen entweder zwei TRPV6 Wildtyp-Allele oder ein Wildtyp- und ein L1-Allel. Bei dem L1-Allel oder ‚minus‘-Allel (‚-‘-Allel) wurden durch Einwirken der Cre-Rekombinase alle DNS-Abschnitte zwischen den beiden loxP-Sequenzen entfernt; als Folge kann nur ein nichtfunktionelles TRPV6-Transkript exprimiert werden. Nachkommen, die je ein Wildtyp- und ein L1-Allel tragen, werden untereinander verpaart, um so Tiere zu erhalten, die homozygot für die eingeführte Mutation sind – also zwei L1-Allele besitzen. Zur Identifizierung der heterozygoten Nachkommen mit dem WT/L1-Genotyp wurde ein Protokoll entwickelt bei dem eine PCR mit einem hinter dem Exon 15 gelegenen reversen Primer (mcat120) und zwei unterschiedlichen forward Primern (mcat121 und mcat144) durchgeführt wird (Abbildung 7-33). Aus DNS von Wildtyp-Tieren sollte nur ein DNS-Fragment mit der Primerkombination mcat121/mcat120 amplifiziert werden können, aus DNS von heterozygoten Tieren dagegen mit beiden Primerkombinationen, eines für das Wildtyp-Allel und eines für das mutierte L1-Allel.

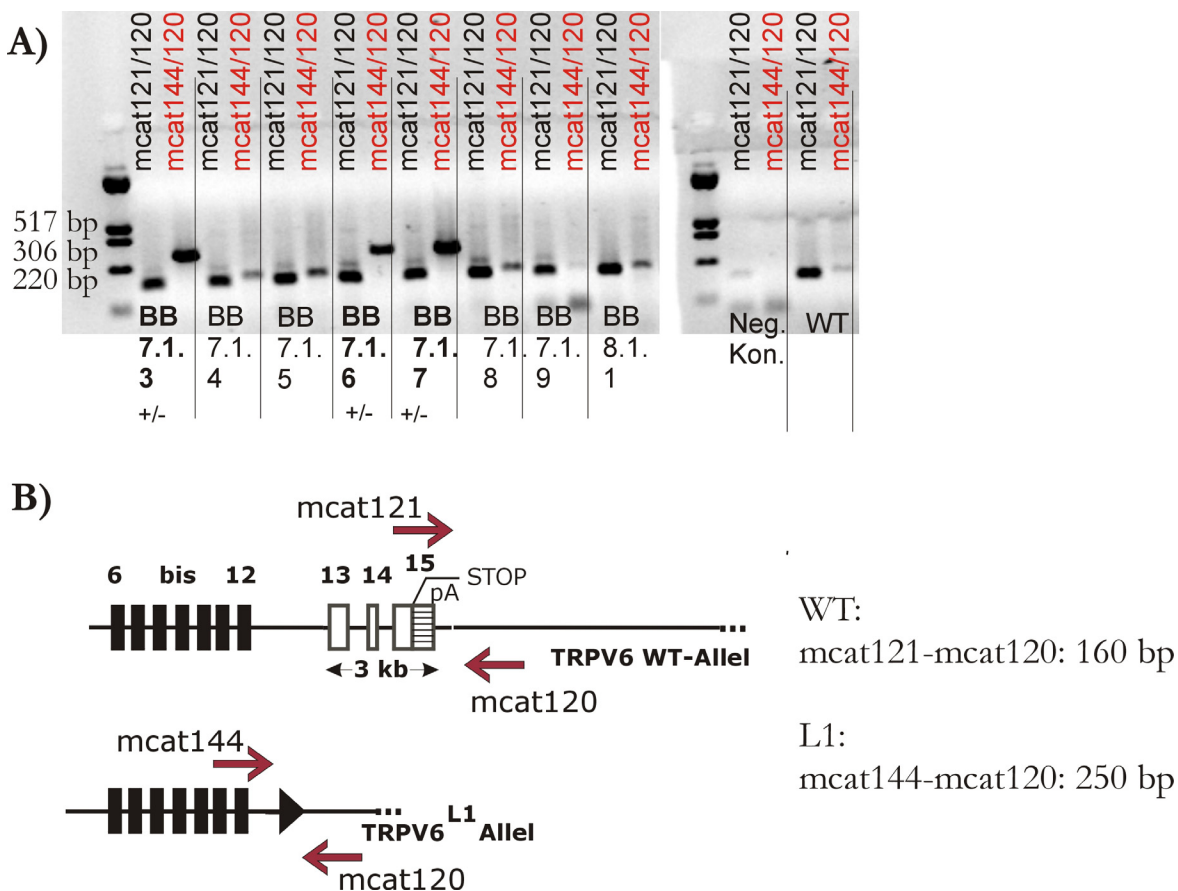


Abbildung 7-33 Genotypisierung der Nachkommen nach Verpaarung mit Cre.

Zu sehen sind die auf einem Agarosegel (A) aufgetrennten amplifizierten DNS-Fragmente von zehn Tieren. (B). Ausschnitte der beiden Allele mit Exons (Rechtecke) und Lage der verwendeten Primer.

7.5.3 GENOTYPISIERUNG DER NACHKOMMEN DER HETEROZYGOTEN MÄUSE NACH VERPAARUNG MIT DER FLP-MAUSLINIE

Die in Tabelle 7-7 aufgelisteten heterozygoten Tiere wurden auch mit der Flp-Mauslinie gekreuzt welche die Flp-Rekombinase in allen Zellen exprimiert. Nachkommen dieser Verpaarung besitzen entweder zwei TRPV6 Wildtyp-Allele oder ein Wildtyp- und ein L2F1- bzw. L2F1-D541A-Allel. Bei dem L2F1-Allel wurde durch Einwirken der Flp-Rekombinase das zwischen den *frt*-Sequenzen liegende Neomycin-Resistenzgen entfernt. Es resultiert das so genannte ‚gefloxte-Allel‘, das sich von dem TRPV6-Wildtyp-Allel nur durch das Vorhandensein der *loxP*- und *frt*- Erkennungssequenzen (im Fall des L2F1-Allels) bzw. durch die D541A-Mutation (im Fall des L2F1-D541A-Allels) unterscheidet. Nachkommen mit einem Wildtyp- und einem geflochten Allel sollen weiter untereinander verpaart werden, um auf diese Weise Tiere mit zwei geflochten Allelen zu erhalten. Zur Identifizierung der Nachkommen mit WT/L2F1-Genotyp aus der Verpaarung der heterozygoten Tiere mit Flp-Tieren wurde ein PCR-Protokoll entwickelt bei dem ein kurz hinter dem Exon 15 gelegener forward Primer (*mcat121*) mit einem weiter 3' gelegenen reversen Primer (*mcat120*) kombiniert wird (Abbildung 7-34). Aus dem Wildtyp-Allel kann ein DNS-Fragment von 160 bp, aus dem L2F1-Allel ein DNS-Fragment von 228 bp amplifiziert werden.

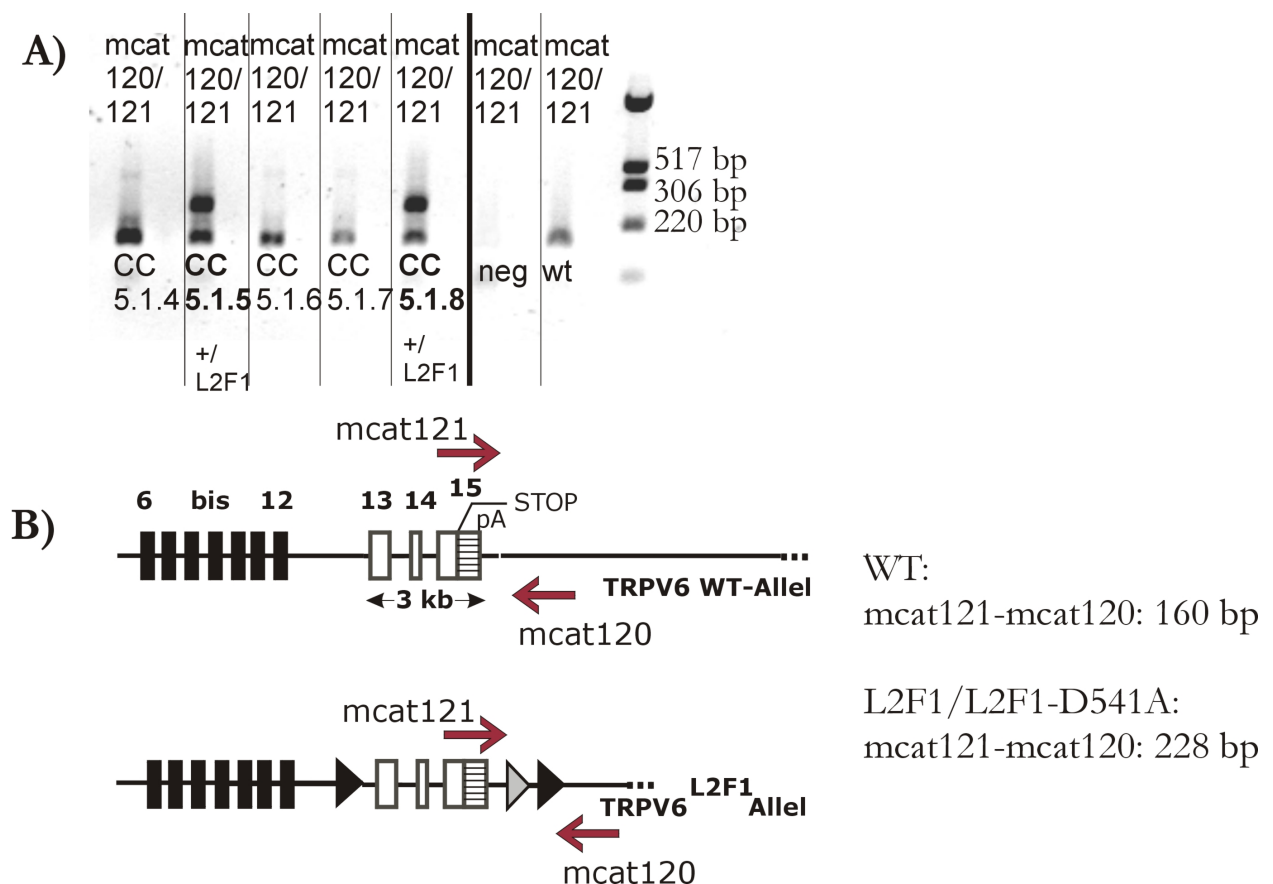


Abbildung 7-34 Genotypisierung der Nachkommen nach Verpaarung mit Flp.

Zu sehen sind die auf ein Agarosegel aufgetrennt amplifizierte DNS-Fragmente von sieben Tieren (A). Außerdem die nachgewiesenen Allele und die relative Lage der verwendeten Primer (B).

7.5.4 GENOTYPISIERUNG DER KNOCK-OUT MÄUSE

Aus Verpaarung der heterozygoten Tiere mit der Cre-Deleter Mauslinie wurden Nachkommen erhalten, die ein Wildtyp- und ein L1-Allel, also den Genotyp WT/L1, besaßen. Diese Tiere wurden anschließend untereinander verpaart, um so Tiere mit zwei L1-Allelen zu erhalten. Tiere mit dem Genotyp L1/L1 werden auch als TRPV6 knock-out Mäuse bezeichnet, da sie kein funktionsfähiges TRPV6-Allel mehr besitzen. Zur Identifizierung der Nachkommen mit dem L1/L1-Genotyp wurde das in Kapitel 7.5.2 beschriebene PCR-Protokoll verwendet bei dem ein hinter dem Exon 15 gelegener reverse Primer (mcat120) mit zwei unterschiedlichen forward Primern (mcat121 und mcat144) kombiniert wird (Abbildung 7-35). Aus DNS mit zwei L1-Allelen sollte nur ein DNS-Fragment mit der Primerkombination mcat144/mcat120 amplifiziert werden können.

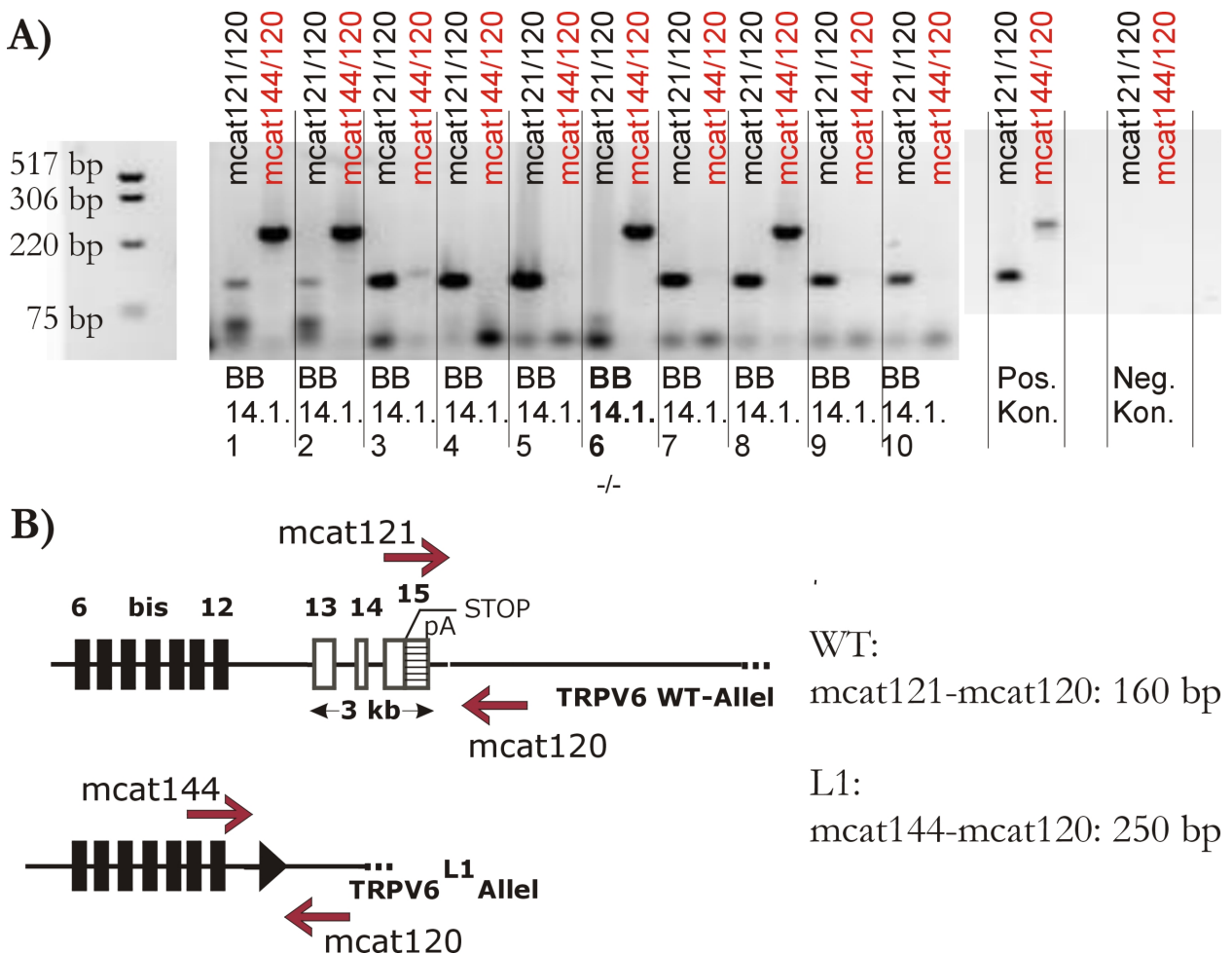


Abbildung 7-35 Genotypisierung der knock-out Mäuse

Zu sehen sind die auf ein Agarosegel aufgetrennt amplifizierten DNS-Fragmente von verschiedenen Tieren (A). Außerdem die nachgewiesenen Allele und die relative Lage der verwendeten Primer (B).

Abbildung 7-36 fasst die Allele, die bei den verschiedenen Verpaarungen entstehen können, zusammen; gleichzeitig ist die relative Lage der verwendeten Primer zur Genotypisierung mittels PCR

gezeigt. Tabelle 7-8 listet die entsprechenden Primerkombinationen und zu erwartende Länge der amplifizierten DNS-Fragmente auf.

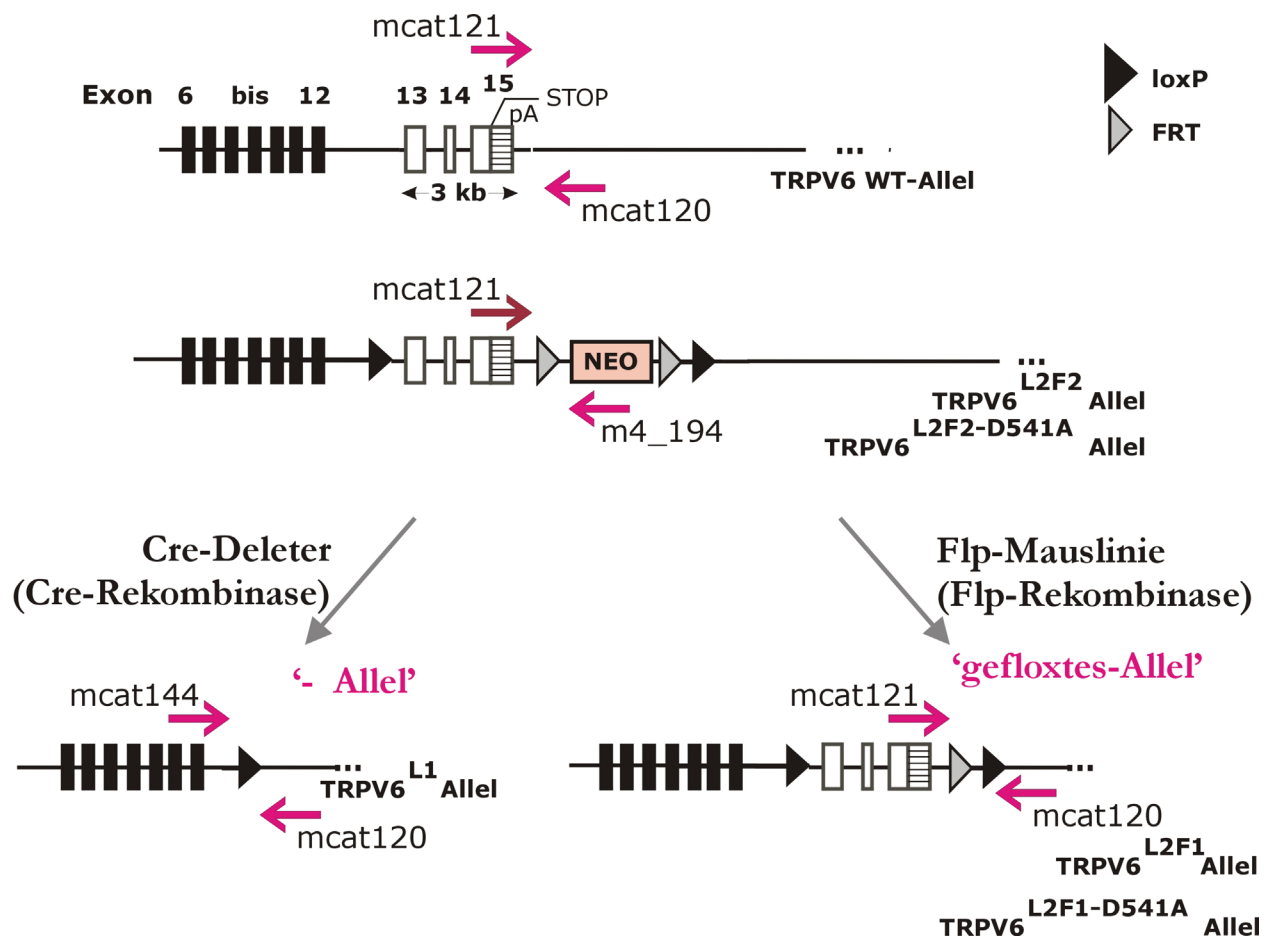


Abbildung 7-36 TRPV6-Allele und relative Lage der Primer, die zur Genotypisierung verwendet wurden.

Tabelle 7-8 Für die Genotypisierungs-PCR verwendete Primer.

Aufgelistet sind die Primerkombinationen, die verwendeten Primer, das mit der jeweiligen Kombination nachgewiesene Allel und die Länge des amplifizierten DNS-Fragments.

Primerkombination	Verwendete Primer	Nachgewiesenes Allel	Amplifiziertes Fragment
1	mcat121, mcat120	WT-Allel	160 bp
		gefloxte-Allele (L2F1 und L2F1-D541A)	228 bp
2	mcat121, m4_194	L2F2-Allel	250 bp
3	mcat144, mcat120	- Allel (L1-Allel)	310 bp

Tabelle 7-9 fasst die jeweiligen Verpaarungen, den Genotyp der Nachkommen und die verwendeten Primer zusammen. Um die einzelnen Zuchten übersichtlich zu dokumentieren, wurden den

Verpaarungen neben einer laufenden Nummer - z.B. Verpaarung 6 (V6) - noch zwei Buchstaben vorangestellt: V6-BA, V6 -BB und V6-BC für Tiere, die von dem ES-Zellklon 6F11 abstammen und V6-CA, V6-CB und V6-CC für Tiere die von den ES-Zellklonen 8E11 und 16F8 abstammen.

Tabelle 7-9 Dokumentation der Zuchten und Genotypisierungs-Protokolle.

Verpaarungs- Nummer	Verpaarte Tiere	Genotyp der Nachkommen	Verwendete Primerkombination
<i>Tiere, die aus der Blastozysteninjektion von Klon 6F11 entstanden sind:</i>			
V6-BA	Chimäre mit WT	+/L2F2	1 (WT), 2(L2F2)
V6-BB	+/L2F2 mit Cre-Deleter	+/-	1 (WT), 3 (L1)
V6-BC	+/L2F2 mit der Flp-Mauslinie	+/L2F1	1 (WT; L2F1)
<i>Tiere, die aus den Blastozysteninjektionen der Klone 8E11 und 16F8 entstanden sind:</i>			
V6-CA	Chimäre mit WT	+/L2F2- D541A	1 (WT), 2(L2F2)
V6-CB	+/L2F2-D541A mit Cre-Deleter	+/-	1 (WT), 3 (L1)
V6-CC	+/L2F2- D541A mit der Flp-Mauslinie	+/L2F1 D541A	1 (WT; L2F1)

7.6 TRPV6 KNOCK-OUT TIERE

Im vorgegangenen Kapitel habe ich bereits die verschiedenen Protokolle beschrieben, die notwendig sind, um Tiere der verschiedenen Genotypen zu charakterisieren. So ist im unteren Teil von Abbildung 7-36 (Seite 149) gezeigt, welche Genotypen nach Verpaarung von heterozygoten L2F2 bzw. L2F2-D541A-Tieren mit Cre-Deleter- bzw. Flp-Tieren zu erwarten sind.

Um Tiere zur Untersuchung des Einflusses der D541A Mutation zu erhalten, bzw. Tiere, bei denen TRPV6 spezifisch in bestimmten Zellen oder gezielt in einem Zeitfenster ausgeschaltet werden kann, ist es zunächst notwendig, dass Neomycin-Resistenzgen wieder zu entfernen. Dazu werden Tiere, die heterozygot für die eingeführte Mutation sind, mit der so genannten Flp-Mauslinie gekreuzt (Farley et al., 2000) (Abbildung 7-36 rechts). Die Flp-Mauslinie exprimiert die Flp-Rekombinase in allen Zellen; die Linie wurde von den Jackson Laboratories bezogen. Die Nachkommen sollten anstelle des rekombinanten L2F2- bzw. L2F2-D541A-Allels das so genannte ‚gefloxte-Allel‘ exprimieren; dieses unterscheidet sich im Fall des L2F2-Allels von dem TRPV6-Wildtyp-Allel nur durch das Vorhandensein der loxP- und frt- Erkennungssequenzen. Tiere mit dem L2F2-D541A-Allel sollten nach Kreuzung mit Flp-Tieren zu Nachkommen führen, welche die D541A-Mutation enthalten, so

dass das TRPV6-Protein mit dieser Mutation exprimiert wird. Diese Nachkommen wurden wie in Kapitel 7.5.3 beschrieben genotypisiert. Es konnten Tiere mit dem Genotyp WT/L2F1 und WT/L2F1-D541A identifiziert werden. Diese werden jetzt untereinander gekreuzt um Tiere mit zwei geflochten Allelen zu erhalten.

Zum anderen soll untersucht werden, welchen Einfluss die völlige Abwesenheit des TRPV6-Gens hat, es soll also ein knock-out des TRPV6-Gens in allen Geweben der Maus erreicht werden. Dazu werden heterozygote Mäuse mit der so genannten ‚Cre-Deleter‘ Mauslinie (Tang et al., 2002) verpaart (Abbildung 7-36 links). Diese Linie, CMV-Cre, wurde uns von Prof. P. Chambon, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire IGBMC, Strassbourg, überlassen. Tiere dieser Linie exprimieren die Cre-Rekombinase in allen Zelltypen und aus dem rekombinanten L2F2 bzw. L2F2-D541A-Allel entsteht das so genannte L1- bzw. ‚- Allel‘ das TRPV6-Gen wird nicht mehr funktionell exprimiert. Die Nachkommen dieser Verpaarungen wurden, wie in Kapitel 7.5.2 beschrieben, genotypisiert. Es konnten Tiere mit dem Genotyp WT/L1 identifiziert werden.

Diese Tiere wurden anschließend gekreuzt um Nachkommen mit dem Genotyp L1/L1 zu erhalten; diese so genannten TRPV6 knock-out Mäuse sollten keine funktionsfähigen TRPV6-Transkripte exprimieren. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit waren acht Würfe mit insgesamt 59 Nachkommen aus diesen Verpaarungen geboren worden. Sie wurden wie in Kapitel 7.5.4 beschrieben genotypisiert. Dabei zeigte sich, dass 29 Tiere oder 49% der Nachkommen Wildtyp-Tiere waren; 26 Tiere oder 44% waren heterozygot und vier Tiere bzw. 7% der Nachkommen waren homozygot für die eingeführte Mutation. Diese vier Tiere sind knock-out Tiere, d.h. ihnen fehlt ein funktionsfähiges TRPV6-Gen. Nach den Mendelschen Gesetzen sollten bei Verpaarung von Tieren des heterozygoten Genotyps ab im Durchschnitt jeweils 25% der Nachkommen den homozygoten Genotyp a bzw. b aufweisen und 50% den heterozygoten Genotyp ab. Dass diese typische Verteilung nach den bisherigen Verpaarungen nicht erhalten wird könnte an der bisher kleinen Zahl von Nachkommen liegen. Alternativ könnte es ein Hinweis sein, dass TRPV6-defiziente Tiere in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt sind.

Abbildung 7-37 zeigt eine solche TRPV6 knock-out Maus – gekennzeichnet mit einem Pfeil - inmitten ihrer Geschwister. Sie unterscheidet sich bisher nicht von den Geschwistern und auch in ihrem Verhalten sind bisher keine Auffälligkeiten zu erkennen.

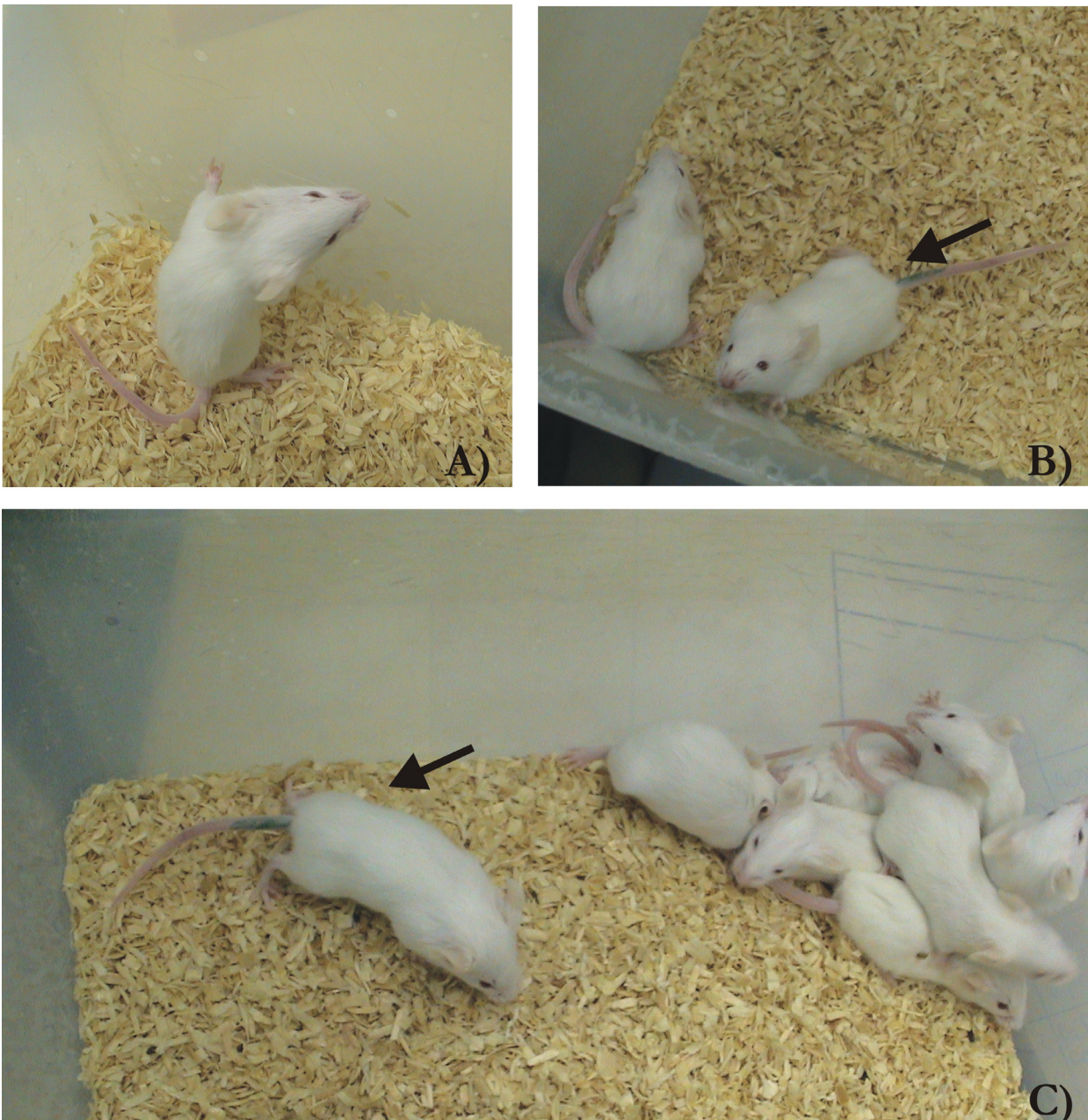


Abbildung 7-37 TRPV6 knock-out Maus mit Geschwistern.

Zu sehen sind die TRPV6 knock-out Maus BB14.1.6 allein (A) und mit ihren Geschwistern (B und C). In B) und C) ist Maus BB14.1.6 durch einen schwarzen Pfeil markiert.

Somit stehen jetzt Tiere zur Verfügung, die das TRPV6-Gen nicht mehr exprimieren. In Zukunft können durch weitere Zuchten Tiere erhalten werden, bei denen das TRPV6-Protein ganz gezielt in einigen Zellen, in denen es normalerweise exprimiert wird, fehlt. Parallel wird es Tiere geben, die zwar ein TRPV6-Protein exprimieren, das aber aufgrund der D541A-Mutation nicht funktionsfähig sein wird. Aus der Untersuchung dieser Tiere erhoffen wir uns Aufschluss darüber zu erhalten, inwieweit das TRPV6-Protein Funktionen erfüllt, die über die Kanalfunktion hinausgehen.

8 DISKUSSION

In dieser Arbeit wird das erfolgreiche Targeting des TRPV6-Gens von Maus beschrieben. Zum Zeitpunkt, an dem diese Arbeit verfasst wird, existieren Maus-Tiermodelle, die homozygot für die eingefügte Mutation im TRPV6 Gen sind. Diese Tiere werden zurzeit weitergezüchtet.

Die Arbeit wurde begonnen mit der Identifizierung und Klonierung der cDNS von TRPV6 von Maus. Untersuchungen des Expressionsmusters ergaben, dass Transkripte des Gens in Nierengewebe, Plazenta und Pankreas exprimiert werden. Im Folgenden wurden insgesamt drei Strategien verfolgt, um das TRPV6-Gen in Maus zu inaktivieren. Wie im Ergebnisteil aufgeführt, haben zwei dieser Strategien - leider die ersten beiden - nicht zum beabsichtigtem Ergebnis geführt. Die Gründe, weshalb die eine Gene-Targeting Strategie realisierbar ist, die andere jedoch nicht, sind unbekannt. Ich will versuchen, sie zu diskutieren. Gleichzeitig will ich aber hinzufügen, dass zwei weitere Gen-Targeting Experimente, an denen ich parallel zu meinen Arbeiten an TRPV6 mitgearbeitet habe, mit den gleichen Targeting-Strategien, die im Fall des TRPV6-Gens nicht zum Ergebnis führten – z.B. Verwendung des Tetracyclin-Regulationssystems und Targeting des ersten Exons – im Fall des Targetings des TRPM7-Gens bzw. des TRPM4-Gens erfolgreich waren. Zunächst aber einige Überlegungen, welche Faktoren die Targetingeffizienz beeinflussen könnten.

Nach der Transfektion eines Targeting Vektors in ES-Zellen laufen zwei konkurrierende Reaktionen ab, die homologe Rekombination und parallel dazu deren zufällige Integration in das Genom der Zelle. Die Häufigkeit der zufälligen Integration ist höher als die gezielte Integration durch homologe Rekombination. Die Effizienz eines Targetingvektors wird durch die Länge seiner homologen Arme (Hasty et al., 1991; Thomas and Capecchi, 1987) positiv und durch die Zahl der abweichenden Basen im Vektor im Vergleich zur Zielsequenz negativ (te Riele et al., 1992) bestimmt. So ist die homologe Rekombinationseffizienz direkt mit der Länge der homologen Arme korreliert. Als ideal wird eine Länge zwischen 5 und 10 kb angesehen (Joyner and Sedivy, 2000). Zwar würde die Rekombinationseffizienz sich bei Verwendung längerer homologer Arme noch erhöhen, doch wären Plasmide dieser Größe für die zahlreichen Subklonierungsschritte denkbar ungeeignet. Die homologen Arme sollten gleichmäßig über das gesamte Targetingkonstrukt verteilt sein. So sollte die Länge des kürzeren Armes 2 kb nie unterschreiten (Thomas et al., 1992). Der Einfluss von Basenabweichungen auf die homologe Rekombinationseffizienz kann durch das ‚DNA-Mismatch-Repair‘ System erklärt werden. Es ist ein hochkonserviertes biologisches System das die Rekombination nicht völlig identischer Sequenzen verhindert (Kolodner, 1996; Modrich and Lahue, 1996). Um zu verhindern, dass dieses System aktiviert wird, ist es wichtig solche DNS bei der Konstruktion des Targetingvektors zu verwenden, die aus den später verwendeten ES-Zellen stammt. Der Grad an Basenabweichungen oder Polymorphismen variiert nämlich zwischen Mauslinien und kann für einen einzelnen Genlocus nicht

vorhergesagt werden. In der Regel weisen Introns stärkere Abweichungen auf als Exons (Joyner and Sedivy, 2000).

Zur Erhöhung der Rekombinationseffizienzen in Gene-Targeting Experimenten hat weiterhin maßgeblich die Entwicklung der Positiv-Negativ-Selektion beigetragen (Mansour et al., 1988). Durch sie kann eine zwei- bis zwanzigfache Anreicherung von homolog rekombinanten Klonen erreicht werden (Joyner and Sedivy, 2000). Alle diese Überlegungen sind bei den verschiedenen Strategien, die zur gezielten Mutation des TRPV6-Gens in der Maus angewendet wurden, von mir berücksichtigt worden – mit unterschiedlichem Erfolg. Parallel zu meinen beschriebenen Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe zwei weitere Targetingexperimente durchgeführt. Im ersten der beiden Experimente war das Zielgen TRPM4 von Maus, im zweiten TRPM7 von Maus. Die Experimente wurden von Dr. Rudi Vennekens (TRPM4) bzw. Stefanie Buchholz gemeinsam mit mir und Dr. Marc Freichel durchgeführt (TRPM7). Insbesondere bei den TRPM4-Experimenten habe ich wesentlich mitgearbeitet. Beide Experimente sind auch deshalb für meine Arbeiten interessant, weil sehr ähnliche, zum Teil identische Targeting-Strategien verwendet wurden. So bediente sich die Strategie zur Inaktivierung des TRPM7-Gens ebenfalls das Tetracyclin-Regulationssystem und das Targetingziel bei dieser Strategie war ebenfalls das erste kodierende Exon des TRPM7-Gens. Auf die beiden parallel durchgeführten Experimente des TRPM7- und des TRPM4-Gens möchte ich deshalb kurz eingehen.

Das TRPM7-Gen kodiert ein Protein, das einen Ionenkanal und eine Proteinkinase-Domäne in einem Molekül vereinigt. TRPM7-Transkripte konnten wir in Endothel, Mastzellen, in Niere, Herz, Gehirn, Plazenta sowie in ES-Zellen mit Northern Blots nachweisen. Zur Inaktivierung des Gens wurde die gleiche Targeting-Strategie angewendet, die ich zunächst auch für die Inaktivierung des TRPV6-Gens verfolgt habe, die Targeting-Strategie mit den Targetingvektoren pmCaTL_26 und pmCaTL_36. Auch für den TRPM7-Targetingvektor wurde eine DNS-Kassette bestehend aus Sequenzen für den Tetracyclin-Transaktivator, für die Neomycinresistenz und für einen mit tet-Operator Sequenzen gekoppelten CMV-Promotor zwischen den Transkriptions- und Translationsstart (Abbildung 8-1) des TRPM7 Gens kloniert. Nach homologer Rekombination in den TRPM7 Genlocus sollte von diesem Allel ein funktionelles und in der Aminosäuresequenz unverändertes TRPM7 Protein synthetisiert werden; dessen Expression in Anwesenheit von Doxycyclin aber inhibiert sein sollte. Insgesamt wurde mit diesem Targetingkonstrukt, dem Konstrukt pMN_18 ein Targetingexperiment durchgeführt. Da TRPM7 - wie im Northern Blot gezeigt wurde - in ES-Zellen exprimiert wird und das integrierte Tetracyclin-Regulationssystem zur Überexpression des nachgeschalteten Gens führen kann, wurde bei der Hälfte der isolierten Klone Doxycyclin-haltiges Medium verwendet. Insgesamt wurden 816 der selektionierten ES-Zellklone isoliert und hinsichtlich des Rekombinationsereignisses untersucht (Tabelle 8-1). Von den 816 isolierten Klonen zeigten daraufhin 52 Klone die erwartete homologe Rekombination, darunter Klone, die mit bzw. ohne Doxycyclin im Medium kultiviert worden waren

(Tabelle 8-1). Für die Blastozysteninjektion wurden ausschließlich solche ES-Klone verwendet, die ohne Doxycyclin im Medium kultiviert worden waren und es wurden auf Anhiob hochchimäre Tiere geboren, die nach Verpaarung zu Mäusen führten, die heterozygot für die eingeführte Mutation waren. Dies bedeutet, dass die Effizienz der Rekombination hier relativ hoch lag; 52 Klone oder 6,4 % der isolierten Klone zeigten das korrekte Rekombinationsereignis.

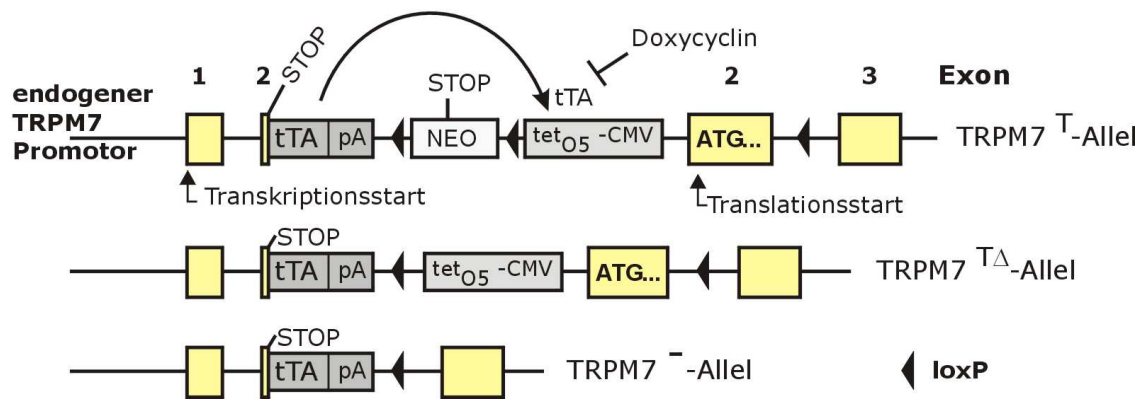


Abbildung 8-1 Wildtyp-Allel, Targetingvektor und erwartetes mutiertes Allel bei der Inaktivierung des TRPM7 Gens von Maus

Tabelle 8-1 Übersicht über die bei den Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pMN_18 erhaltenen Klone.

Elektroporation A und B; verwendete ES-Zellen Chargen: ESR1 Nagy 1998; verwendetes FCS: Invitrogen, Kat.No:10437028; LotNr: 1016785.

	Anzahl der elektroporierten ES-Zellen	Passagen der ES-Zellen	Eingesetzte Menge an DNS	$\frac{\mu\text{g DNA}}{10^7 \text{ Zellen}}$	Anzahl der isolierten Klone	Anzahl der homolog rekombinanten Klone
Elektroporation A 23.07.02	$1,5 \times 10^7$	16	32 μg	25	Ohne Dox: 211 Mit Dox: 42	10 keine
Elektroporation B 23.07.02	$1,5 \times 10^7$	16	60 μg	40	Ohne Dox: 413 Mit Dox: 115	37 5
Gesamtzahl der isolierten ES-Zellklone, die mittels Southern Blots untersucht wurden:					816	

Das TRPM4-Gen kodiert einen nichtselektiven Kationenkanal, der Ca^{2+} -Ionen zwar selbst nicht leitet, aber bei Anstieg der intrazellulären Konzentrationen von Ca^{2+} -Ionen kurzzeitig aktiviert wird. Die dadurch ausgelöste Zelldepolarisation kann z.B. in Mastzellen oder Endothelzellen die treibende Kraft für den Ca^{2+} Einstrom durch nicht-spannungsabhängige Kalziumkanäle verringern und hätte damit in Mastzellen Auswirkungen beispielsweise auf die Histaminfreisetzung. Wir haben in der Arbeitsgruppe die TRPM4 cDNS von Maus kloniert und TRPM4 Transkripte und Proteine in Endothelzellen, Magen, Darm, Herz, Niere, Pankreas, ES-Zellen und Mastzellen nachgewiesen (Nilius et al., 2003). Zum Targeting des TRPM4-Gens wurde ein Vektor konstruiert, der nach homologer Rekombination in ES Zellen das TRPM4^{L3F2}-Allel (Abbildung 8-2) hervorbrachte. Es enthält insgesamt 3 loxP- bzw. 2 frt-Erkennungssequenzen für die Cre- bzw. Flp-Rekombinase und eine mit einer Splice-

Akzeptorsequenz versehene lacZ-Kassette. Die lacZ-Kassette stammt von dem lacZ-Gen des lac-Operons von *E. coli*. Es kodiert für die 120 kDa große β -Galactosidase. In *E. coli* dient dieses Enzym der Spaltung von Lactose in Glucose und Galactose. In diesem Mausmodell wird dagegen die Fähigkeit von β -Galactosidase ausgenutzt, auch andere Substrate umzusetzen. Die lacZ-Kassette kann über die Spließakzeptorstelle an das 5' davon gelegene Exon S1 fusioniert werden. dadurch kommt es zur Expression eines TRPM4- β -Galactosidase-Fusionsproteins. Gewebe, die das Fusionsprotein aus TRPM4 und β -Galactosidase exprimieren, setzen nach Zugabe von IPTG und X-Gal das farblose X-Gal zu dem blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo um. Auf diese Weise können direkt über die Blaufärbung diejenigen Zellen identifiziert werden, die TRPM4 exprimieren. Bei diesem Experiment wurden insgesamt 320 der selektierten Zellklone isoliert und hinsichtlich des Rekombinationsereignisses untersucht (Tabelle 8-2). Acht ES-Zellklone von insgesamt 320 zeigten das korrekte homologe Rekombinationsereignis, das heißt die Effizienz liegt hier bei 2,5 %. Zwei Klone wurden für die Blastozysteninjektion ausgewählt, aus ihnen gingen hochchimäre Tiere hervor. Diese führten nach Verpaarung zu Mäusen, die heterozygot für die eingefügte Mutation sind.

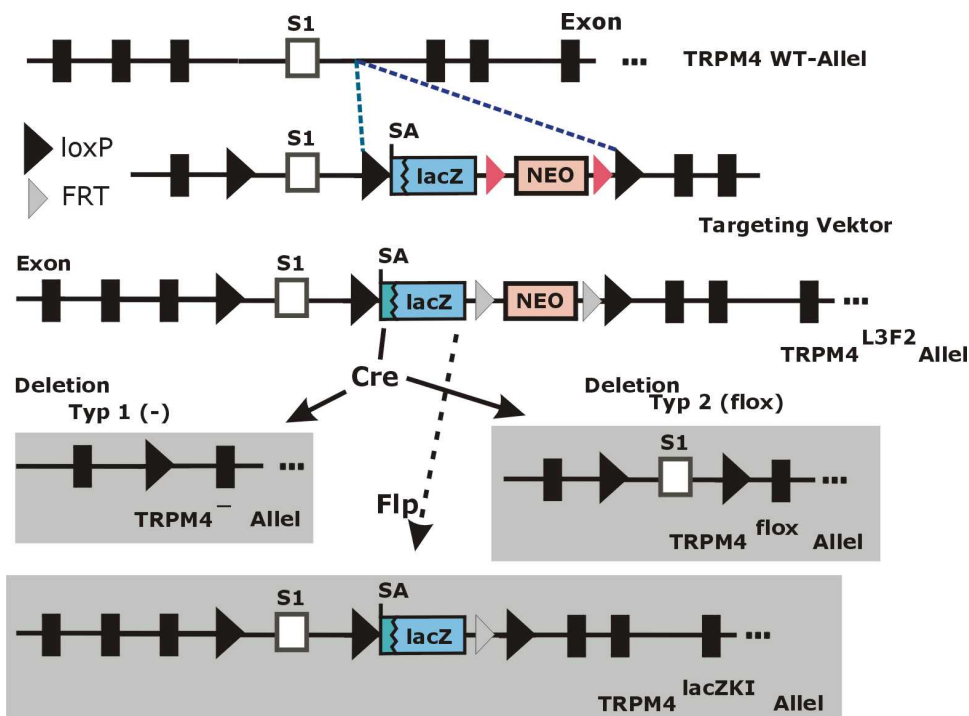


Abbildung 8-2 Wildtyp-Allel, Targetingvektor und rekombinantes Allel L3F2 des TRPM4 Gens.

Weiterhin sind die verschiedenen Allele skizziert, die nach Verpaarung von Mäusen, die das rekombinante L3F2 tragen, mit transgenen Cre-Mauslinien bzw. transgenen Flp-Mauslinien erwartet werden. Typ1-Deletion (links unten) wäre eine Inaktivierung des TRPM4-Gens in allen Geweben durch Herausschneiden des Exons S1. Typ2-Deletion (rechts unten) wäre ein Gen, das sich nur in den beiden loxP-Seiten, die das Exon S1 flankieren, vom Wildtyp-Gen unterscheidet. Mauslinien mit diesem Allel können erneut mit Cre-Mauslinien verpaart werden. Es resultierte dann die Inaktivierung des TRPM4-Gens – wie bei der Typ1-Deletion rechts. Verpaarung von Tieren mit dem L3F2-Allel mit Mäusen, die transgen die Flp-Rekombinase exprimieren, führt zu Entfernung des Neomycin-Resistenzgens. Es wird ein TRPM4-LacZ Fusionsprotein exprimiert.

Tabelle 8-2 Übersicht über die bei den Elektroporationen mit dem Targetingkonstrukt pM4-27 erhaltenen Klone.

Elektroporation A und B; verwendete ES-Zellen Charge: ESR1 Nagy 1998; verwendetes FCS: Invitrogen, Kat.No: 10437028; LotNr: 1016785.

	Anzahl der elektroporierten ES-Zellen	Passagen der ES-Zellen	Eingesetzte Menge an DNS	$\mu\text{g DNA}$ 10^7 Zellen	Anzahl der isolierten Klone	Anzahl der homolog rekombinanten Klone
Elektroporation A 04.03.03	1×10^7	16	15 μg	15	11	keine
Elektroporation B 04.03.03	$1,5 \times 10^7$	16	120 μg	30	309	8

Gesamtzahl der isolierten ES-Zellklone, die mittels Southern Blots untersucht wurden: 320

Tabelle 8-3 fasst die Ergebnisse des Targetings des TRPV6 Gens, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben sind noch mal mit denjenigen Untersuchungen zusammen an denen ich mitgearbeitet habe (TRPM4 und TRPM7) sowie mit weiteren vergleichbaren Experimenten, die in den letzten sechs Jahren in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt worden sind.

Tabelle 8-3 Targeting des TRPV6-Gens im Vergleich zum Targeting anderer Gene von Ionenkanalproteinen, das von der Arbeitsgruppe in den letzten sechs Jahren durchgeführt wurde.

Zielgen	Zielexon	Zahl der isolierten ES-Zellklone	Negativ-Selektion	Zahl der ES-Zellklone mit korrekter Rekombination	Gen-defiziente Tiere	Referenz
TRPV6	Exon1	1279	nein	keine	keine	diese Arbeit
	Exon1	289	Diphtherie Toxin-A	keine	keine	diese Arbeit
	Exon13-15 (Pore)	1140	GFP Thymidinkinase	3	ja	diese Arbeit
TRPM7	Exon1	816	nein	52	ja	diese Arbeit*
TRPM4	Exon S1 (Transmembranregion)	320	Thymidinkinase	8	ja (letal)	diese Arbeit*
TRPC4	Exon S4/S5 (4. u. 5. Transmembranregion)	250	Thymidinkinase	6	ja	(Freichel et al., 2001)
$\text{Ca}_v\beta_3$	Exon 4	470	Thymidinkinase	3	ja	(Murakami et al., 2002)
$\text{Ca}_v\beta_2$	Exon 16	859	nein	14	ja (letal)	(Weißgerber et al., in Vorbereitung)
$\text{Ca}_v\gamma_1$	Exon 1	334	Thymidinkinase	11	ja	(Freise et al., 2000)

* An beiden Targetingexperimenten habe ich mitgearbeitet, insbesondere an TRPM4. Eine Publikation zu TRPM4 ist in Vorbereitung (Vennekens, Freichel, Olausson et al.).

Zusammenfassend bleibt zu konstatieren, dass der 5' Bereich des TRPV6-Gens ein Genlocus mit schlechter Rekombinationseffizienz zu sein scheint. Die Unterschiede in den Targetingeffizienzen verschiedener Genloci sind noch nicht vollständig verstanden (Joyner and Sedivy, 2000). Es wurde beobachtet, dass nicht-transkribierte Gene in geringerem Maß rekombinieren als transkribierte (Dominguez-Bendala and McWhir, 2004). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass das Chromosom während der Transkription der Rekombination leichter zugänglich ist (Blackwell et al., 1986). Auch gibt es Hinweise, dass die Methylierung von nicht-transkribierten Genen die Rekombination hemmt. So kann die Rekombinationseffizienz durch Deletieren endogener DNS-Methylasen deutlich gesteigert werden (Dominguez-Bendala and McWhir, 2004), wobei diese Prozesse jedoch noch nicht vollständig geklärt sind (Paldi et al., 1995). Inwieweit solche Vorgänge beim Targeting von Exon 1 des TRPV6-Gens eine Rolle gespielt haben bleibt offen. Nachdem anstelle von Exon 1 die Exonabschnitte 13, 14 und 15 des TRPV6-Gens gewählt wurden, war ein erfolgreiches Targeting dieses Gens möglich. Im Vordergrund der zukünftigen Aufgaben steht jetzt die Zucht von Tieren denen homozygot das TRPV6-Gen fehlt. Dabei werden sowohl solche Tiere gezüchtet, denen das Gen in all den Organen und Zellen fehlt, in denen es normalerweise exprimiert wird, d.h. Niere, Pankreas und Plazenta. Nicht auszuschließen ist, dass TRPV6 noch in weiteren Organen und Zellen exprimiert wird, z.B. in Speicheldrüsen, Darmepithelien, möglicherweise in Prostata oder im ZNS. Parallel dazu werden wir Tiere züchten, bei denen TRPV6 nur in bestimmten Zellen fehlt, zunächst in Azinuszellen und in Synzytiotrophoblasten der Plazenta.

TRPV6 kodiert einen Kationenkanal, der Ca^{2+} selbst bei Anwesenheit hoher Na^+ -Konzentrationen leitet. Erst wenn alle divalenten Kationen aus dem extrazellulären Medium weggenommen sind, leitet dieser Kanal auch Na^+ . Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+} -Ionen, die durch den Kanal in die Zelle strömen, den Kanal über verschiedene Mechanismen sehr rasch schließen. Möglicherweise ist der TRPV6-Kanal aufgrund dieser Eigenschaften an der Ca^{2+} -Aufnahme z.B. in Nierenepithelien oder der Plazenta verantwortlich. Er würde bei niedriger intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration geöffnet sein, Ca^{2+} -Einstrom kurz ermöglichen und dann schließen. Auf diese Weise würde zwar Ca^{2+} von der Zelle aufgenommen, aber gleichzeitig eine Ca^{2+} -Überladung und Schädigung der Zelle verhindert.

Mithilfe des TRPV6-defizienten Tiermodells, dessen Herstellung ich in dieser Arbeit beschrieben habe, wird sich diese Funktion klären lassen. Eine Bestätigung der gerade beschriebenen potentiellen Funktionen würde TRPV6 zu einem viel versprechendem Zielmolekül für neue Pharmaka zur Behandlung von Ca^{2+} -Mangelzuständen machen, möglicherweise auch zur Behandlung von Entzündungen der Bauchspeicheldrüse, der Pankreatitis.

Tabelle 8-4 Etablierte TRP-defiziente Mausmodelle bzw. Erbkrankheiten, die durch Mutationen von TRP-Genen in Mensch bzw. Maus entstehen.

Gen	Spezies	Art der Mutation	Phänotyp	Erste Publikation
TRPC2	Maus	Targeting	Defekt in der Pheromonwahrnehmung	(Stowers et al., 2002)
TRPC4	Maus	Targeting	Defekt in der Endothelfunktion	(Freichel et al., 2001)
TRPC6	Maus	Targeting	Defekt in der Gefäßfunktion	(Dietrich et al., 2005)
TRPC6	Mensch	Spontan	Familiäre Glomerusklerose	(Reiser et al., 2005; Winn et al., 2005)
TRPV1	Maus	Targeting	Verminderte Schmerzempfindung	(Caterina et al., 2000)
TRPV3	Maus	Targeting	Verminderte Schmerzempfindung	(Moqrich et al., 2005)
TRPV4	Maus	Targeting	Veränderte Vasopressinsekretion und verändertes Trinkverhalten	(Liedtke and Friedman, 2003; Mizuno et al., 2003)
TRPV5	Maus	Targeting	Reduzierte Knochendichte	(Hoenderop et al., 2003a)
TRPM5	Maus	Targeting	Fehlende Geschmackswahrnehmung	(Zhang et al., 2003)
TRPM6	Mensch	Spontan	Familiäre Hypomagenesiämie	(Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002)
TRPP2	Mensch	Spontan	Polyzystische Nierenerkrankung (PKD2)	(Mochizuki et al., 1996)
TRPP2	Maus	Targeting	Polyzystische Nierenerkrankung	(Wu et al., 1998)
TRPML1	Mensch	Spontan	Katarakt, geistige Retardierung im Kindesalter (Mucopolidose Typ IV)	(Bargal et al., 2000)
TRPML3	Maus	Spontan	Varint Waddler Maus Taubheit und perinatal letal	(Di Palma et al., 2002)

Nach wie vor ist ungeklärt, inwieweit TRPV6 in Primärzellen, in denen das Gen normalerweise exprimiert wird, auf die gleiche Weise funktioniert wie nach Überexpression seiner cDNAs in üblichen Kulturzelllinien und Oozyten. Alle Daten zur Ionenkanalfunktion von TRPV6 und seines engsten Verwandten TRPV5 stammen aus solchen Überexpressionsexperimenten. Die gleichen Protokolle angewandt auf Primärzelllinien haben bisher in keinem Fall zur Charakterisierung einer vergleichbaren Kanalaktivität geführt. Dies könnte durchaus bedeuten, dass TRPV6 in Primärzellen entweder gar nicht in der Plasmamembran lokalisiert ist oder aber in Plasmamembranstrukturen, die einer elektrophysiologischen Analyse nicht ohne weiteres zugänglich sind, z.B. in den Zilien von Epithelen. Auch diese Fragen hoffen wir zu klären, einmal durch funktionellen Vergleich von Primärzellen, die TRPV6 exprimieren mit den entsprechenden Zellen aus TRPV6-defizienten Tieren. Zum anderen mit dem zweiten TRPV6-Tiermodell, bei dem wir eine Punktmutation in die Porenregion eingeführt haben. Bei diesem Modell sollte das TRPV6-Protein weiter gebildet werden, allerdings mit reduzierter bzw. fehlender Funktion. Untersuchungen von Zellen mit derart geändertem TRPV6-Protein sollten es erlauben, Hinweise zu erhalten, inwieweit TRPV6 abgesehen von seiner Kanalfunktion möglicherweise auch strukturelle Aufgaben innerhalb der Zelle, beispielsweise für die Polarität von Epithelien, den Zilienaufbau oder das Trafficking anderer Kanalproteine zur Plasmamembran, hat.

Die Kenntnisse über die Funktionen von TRP-Proteinen in Säugergewebe sind seit den ersten Publikationen vor zehn Jahren (Hu et al., 1994; Philipp et al., 1996; Wes et al., 1995) in großem Umfang angestiegen. Um diese Funktionen in physiologische und pathophysiologische Abläufe des Säugerorganismus einordnen zu können, haben sich Gen-defiziente Tiermodelle als äußerst wertvoll erwiesen. Tabelle 8-4 fasst die zum Zeitpunkt des Abfassens dieser Arbeit publizierten TRP-defizienten Tiermodelle zusammen. Im Wesentlichen aufgrund dieser Tiermodelle war es möglich, einzelne TRP-Proteine als Zielmoleküle von neu zu entwickelnden Pharmaka, z.B. zur Behandlung von Schmerz (TRPV1, TRPV3), zu definieren. Es ist abzusehen, dass eine solche Entwicklung auch für TRPV6 einsetzen wird.

9 LITERATURVERZEICHNIS

9.1 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

- HIRNET, D*, OLAUSSON, J*, FECHER-TROST, C., BODDING, M., NASTAINCZYK, W., WISSENBACH, U., FLOCKERZI, V. & FREICHEL, M. (2003) The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium*, 33, 509-18. * Gemeinsame Erstautorenschaft
- FREICHEL, M., VENNEKENS, R., OLAUSSON, J., HOFFMANN, M., MULLER, C., STOLZ, S., SCHEUNEMANN, J., WEISSGERBER, P. & FLOCKERZI, V. (2004) Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models. *Biochem Biophys Res Commun*, 322, 1352-8.
- FREICHEL, M., VENNEKENS, R., OLAUSSON, J., STOLZ, S., PHILIPP, S. E., WEISSGERBER, P. & FLOCKERZI, V. (2005) Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *J Physiol*, 567, 59-66.

9.2 ZITIERTE VERÖFFENTLICHUNGEN

- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.
- ALWINE, J. C., KEMP, D. J., PARKER, B. A., REISER, J., RENART, J., STARK, G. R. & WAHL, G. M. (1979) Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzylxymethyl paper. *Methods Enzymol*, 68, 220-42.
- ARISTOTELES, PLUTARCHUS, AVERROES & ARISTOTELES (1954) *Aristotelis De anima*, Cahirae, s.n.
- BARGAL, R., AVIDAN, N., BEN-ASHER, E., OLENDER, Z., ZEIGLER, M., FRUMKIN, A., RAAS-ROTHSCHILD, A., GLUSMAN, G., LANCET, D. & BACH, G. (2000) Identification of the gene causing mucopolidosis type IV. *Nat Genet*, 26, 118-23.
- BASSI, M. T., MANZONI, M., MONTI, E., PIZZO, M. T., BALLABIO, A. & BORSANI, G. (2000) Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucopolidin and identification of the two major founder mutations causing mucopolidosis type IV. *Am J Hum Genet*, 67, 1110-20.
- BEDDINGTON, R. S. & ROBERTSON, E. J. (1989) An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development*, 105, 733-7.
- BERTANI, G. & WEIGLE, J. J. (1953) Host controlled variation in bacterial viruses. *J Bacteriol*, 65, 113-21.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.
- BLACKWELL, T. K., MOORE, M. W., YANCOPOULOS, G. D., SUH, H., LUTZKER, S., SELSING, E. & ALT, F. W. (1986) Recombination between immunoglobulin variable region gene segments is enhanced by transcription. *Nature*, 324, 585-9.
- BOND, C. T., SPRENGEL, R., BISSONNETTE, J. M., KAUFMANN, W. A., PRIBNOW, D., NEELANDS, T., STORCK, T., BAETSCHER, M., JERICIC, J., MAYLIE, J., KNAUS, H. G., SEEBURG, P. H. &

- ADELMAN, J. P. (2000) Respiration and parturition affected by conditional overexpression of the Ca²⁺-activated K⁺ channel subunit, SK3. *Science*, 289, 1942-6.
- BRADLEY, A., EVANS, M., KAUFMAN, M. H. & ROBERTSON, E. (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309, 255-6.
- BRAKEBUSCH, C., GROSE, R., QUONDAMATTEO, F., RAMIREZ, A., JORCANO, J. L., PIRRO, A., SVENSSON, M., HERKEN, R., SASAKI, T., TIMPL, R., WERNER, S. & FASSLER, R. (2000) Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes. *Embo J*, 19, 3990-4003.
- BUCHHOLZ, F., ANGRAND, P. O. & STEWART, A. F. (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol*, 16, 657-62.
- BULLOCK, W. O., FERNANDEZ, J.M. AND SHORT, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with b-galactosidase selection. *BioTechniques*, 5, 376-378.
- BURGE, C. & KARLIN, S. (1997) Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol*, 268, 78-94.
- CAPECCHI, M. R. (2005) Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*, 6, 507-12.
- CATERINA, M. J., LEFFLER, A., MALMBERG, A. B., MARTIN, W. J., TRAFTON, J., PETERSEN-ZEITZ, K. R., KOLTZENBURG, M., BASBAUM, A. I. & JULIUS, D. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288, 306-13.
- CATERINA, M. J., ROSEN, T. A., TOMINAGA, M., BRAKE, A. J. & JULIUS, D. (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, 398, 436-41.
- CATERINA, M. J., SCHUMACHER, M. A., TOMINAGA, M., ROSEN, T. A., LEVINE, J. D. & JULIUS, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-24.
- CHO, K. O., HUNT, C. A. & KENNEDY, M. B. (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*, 9, 929-42.
- CHUANG, H. H., PRESCOTT, E. D., KONG, H., SHIELDS, S., JORDT, S. E., BASBAUM, A. I., CHAO, M. V. & JULIUS, D. (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature*, 411, 957-62.
- CHUNG, C. T., NIEMELA, S. L. & MILLER, R. H. (1989) One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2172-5.
- DANIELIAN, P. S., MUCCINO, D., ROWITCH, D. H., MICHAEL, S. K. & 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.
- DAVIS, S., ALDRICH, T. H., STAHL, N., PAN, L., TAGA, T., KISHIMOTO, T., IP, N. Y. & YANCOPOULOS, G. D. (1993) LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science*, 260, 1805-8.

- DEN DEKKER, E., HOENDEROP, J. G., NILIUS, B. & BINDELS, R. J. (2003) The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium*, 33, 497-507.
- DI PALMA, F., BELYANTSEVA, I. A., KIM, H. J., VOGT, T. F., KACHAR, B. & NOBEN-TRAUTH, K. (2002) Mutations in Mcoln3 associated with deafness and pigmentation defects in varitint-waddler (Va) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14994-9.
- DIETRICH, A., MEDEROS, Y. S. M., KALWA, H., STORCH, U. & GUDERMANN, T. (2005) Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 371, 257-65.
- DOMINGUEZ-BENDALA, J. & MCWHIR, J. (2004) Enhanced gene targeting frequency in ES cells with low genomic methylation levels. *Transgenic Res*, 13, 69-74.
- DRAGATSIS, I., LEVINE, M. S. & ZEITLIN, S. (2000) Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet*, 26, 300-6.
- DUNCAN, L. M., DEEDS, J., HUNTER, J., SHAO, J., HOLMGREN, L. M., WOOLF, E. A., TEPPER, R. I. & SHYJAN, A. W. (1998) Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res*, 58, 1515-20.
- ENGELKE, D. R., KRIKOS, A., BRUCK, M. E. & GINSBURG, D. (1990) Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem*, 191, 396-400.
- ERLER, I., HIRNET, D., WISSENBACH, U., FLOCKERZI, V. & NIEMEYER, B. A. (2004) Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J Biol Chem*, 279, 34456-63.
- EVANS, M. J. & KAUFMAN, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-6.
- FARLEY, F. W., SORIANO, P., STEFFEN, L. S. & DYMECKI, S. M. (2000) Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. *Genesis*, 28, 106-10.
- FEIL, R., BROCARD, J., MASCREZ, B., LEMEURE, M., METZGER, D. & CHAMBON, P. (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 10887-90.
- FOLGER, K. R., THOMAS, K. & CAPECCHI, M. R. (1985) Nonreciprocal exchanges of information between DNA duplexes coinjected into mammalian cell nuclei. *Mol Cell Biol*, 5, 59-69.
- FOLGER, K. R., WONG, E. A., WAHL, G. & CAPECCHI, M. R. (1982) Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol Cell Biol*, 2, 1372-87.
- FREICHEL, M., SUH, S. H., PFEIFER, A., SCHWEIG, U., TROST, C., WEISSGERBER, P., BIEL, M., PHILIPP, S., FREISE, D., DROGMANS, G., HOFMANN, F., FLOCKERZI, V. & NILIUS, B. (2001) Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol*, 3, 121-7.
- FREISE, D., HELD, B., WISSENBACH, U., PFEIFER, A., TROST, C., HIMMERKUS, N., SCHWEIG, U., FREICHEL, M., BIEL, M., HOFMANN, F., HOTH, M. & FLOCKERZI, V. (2000) Absence of the gamma subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca²⁺ currents and alters channel inactivation properties. *J Biol Chem*, 275, 14476-81.

- FURTH, P. A., ST ONGE, L., BOGER, H., GRUSS, P., GOSSEN, M., KISTNER, A., BUJARD, H. & HENNIGHAUSEN, L. (1994) Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9302-6.
- GOSSEN, M. & BUJARD, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5547-51.
- GOSSEN, M., FREUNDLIEB, S., BENDER, G., MULLER, G., HILLEN, W. & BUJARD, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268, 1766-9.
- GOSSLER, A., DOETSCHMAN, T., KORN, R., SERFLING, E. & KEMLER, R. (1986) Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 9065-9.
- GRAVES, K. H. & MOREADITH, R. W. (1993) Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev*, 36, 424-33.
- GREKA, A., NAVARRO, B., OANCEA, E., DUGGAN, A. & CLAPHAM, D. E. (2003) TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat Neurosci*, 6, 837-45.
- GRIMM, C., KRAFT, R., SAUERBRUCH, S., SCHULTZ, G. & HARTENECK, C. (2003) Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem*, 278, 21493-501.
- GU, H., MARTH, J. D., ORBAN, P. C., MOSSMANN, H. & RAJEWSKY, K. (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 265, 103-6.
- GULER, A. D., LEE, H., IIDA, T., SHIMIZU, I., TOMINAGA, M. & CATERINA, M. (2002) Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci*, 22, 6408-14.
- GUY, J., HENDRICH, B., HOLMES, M., MARTIN, J. E. & BIRD, A. (2001) A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet*, 27, 322-6.
- HAMMER, R. E., BRINSTER, R. L., ROSENFELD, M. G., EVANS, R. M. & MAYO, K. E. (1985) Expression of human growth hormone-releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth. *Nature*, 315, 413-6.
- HANAHAH, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80.
- HARA, Y., WAKAMORI, M., ISHII, M., MAENO, E., NISHIDA, M., YOSHIDA, T., YAMADA, H., SHIMIZU, S., MORI, E., KUDOH, J., SHIMIZU, N., KUROSE, H., OKADA, Y., IMOTO, K. & MORI, Y. (2002) LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*, 9, 163-73.
- HASAN, M. T., SCHONIG, K., BERGER, S., GRAEWE, W. & BUJARD, H. (2001) Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis*, 29, 116-22.
- HASTY, P., RIVERA-PEREZ, J. & BRADLEY, A. (1991) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 11, 5586-91.
- HIRNET, D., OLAUSSON, J., FECHER-TROST, C., BODDING, M., NASTAINCZYK, W., WISSENBACH, U., FLOCKERZI, V. & FREICHEL, M. (2003) The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium*, 33, 509-18.

- HOENDEROP, J. G., NILIUS, B. & BINDELS, R. J. (2002a) ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca²⁺ transport. *Biochim Biophys Acta*, 1600, 6-11.
- HOENDEROP, J. G., NILIUS, B. & BINDELS, R. J. (2002b) Molecular mechanism of active Ca²⁺ reabsorption in the distal nephron. *Annu Rev Physiol*, 64, 529-49.
- HOENDEROP, J. G., VAN DER KEMP, A. W., HARTOG, A., VAN DE GRAAF, S. F., VAN OS, C. H., WILLEMS, P. H. & BINDELS, R. J. (1999) Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D₃-responsive epithelia. *J Biol Chem*, 274, 8375-8.
- HOENDEROP, J. G., VAN LEEUWEN, J. P., VAN DER EERDEN, B. C., KERSTEN, F. F., VAN DER KEMP, A. W., MERRILLAT, A. M., WAARSING, J. H., ROSSIER, B. C., VALLON, V., HUMMLER, E. & BINDELS, R. J. (2003a) Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest*, 112, 1906-14.
- HOENDEROP, J. G., VOETS, T., HOEFS, S., WEIDEMA, F., PRENEN, J., NILIUS, B. & BINDELS, R. J. (2003b) Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *Embo J*, 22, 776-85.
- HOFMANN, T., OBUKHOV, A. G., SCHAEFER, M., HARTENECK, C., GUDERMANN, T. & SCHULTZ, G. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397, 259-63.
- HOLMES, D. S. & QUIGLEY, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*, 114, 193-7.
- HOLZENBERGER, M., LENZNER, C., LENEUVE, P., ZAOUI, R., HAMARD, G., VAULONT, S. & BOUC, Y. L. (2000a) Cre-mediated germline mosaicism: a method allowing rapid generation of several alleles of a target gene. *Nucleic Acids Res*, 28, E92.
- HOLZENBERGER, M., ZAOUI, R., LENEUVE, P., HAMARD, G. & LE BOUC, Y. (2000b) Ubiquitous postnatal LoxP recombination using a doxycycline auto-inducible Cre transgene (DAI-Cre). *Genesis*, 26, 157-9.
- HU, Y., VACA, L., ZHU, X., BIRNBAUMER, L., KUNZE, D. L. & SCHILLING, W. P. (1994) Appearance of a novel Ca²⁺ influx pathway in Sf9 insect cells following expression of the transient receptor potential-like (trpl) protein of Drosophila. *Biochem Biophys Res Commun*, 201, 1050-6.
- IANNACCONE, P. M., TABORN, G. U., GARTON, R. L., CAPLICE, M. D. & BRENIN, D. R. (1994) Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev Biol*, 163, 288-92.
- JAQUEMAR, D., SCHENKER, T. & TRUEB, B. (1999) An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem*, 274, 7325-33.
- JORDT, S. E., BAUTISTA, D. M., CHUANG, H. H., MCKEMY, D. D., ZYGMUNT, P. M., HOGESTATT, E. D., MENG, I. D. & JULIUS, D. (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, 427, 260-5.
- JOYNER, A. L. & SEDIVY, J. M. (2000) *Gene targeting: a practical approach*, Oxford; New York, Oxford University Press.

- JUNGNICKEL, M. K., MARRERO, H., BIRNBAUMER, L., LEMOS, J. R. & FLORMAN, H. M. (2001) Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol*, 3, 499-502.
- KELLENDONK, C., TRONCHE, F., CASANOVA, E., ANLAG, K., OPHERK, C. & SCHUTZ, G. (1999) Inducible site-specific recombination in the brain. *J Mol Biol*, 285, 175-82.
- KELLENDONK, C., TRONCHE, F., MONAGHAN, A. P., ANGRAND, P. O., STEWART, F. & SCHUTZ, G. (1996) Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res*, 24, 1404-11.
- KISTNER, A., GOSSEN, M., ZIMMERMANN, F., JERECIC, J., ULLMER, C., LUBBERT, H. & BUJARD, H. (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 10933-8.
- KOLLER, B. H., HAGEMANN, L. J., DOETSCHMAN, T., HAGAMAN, J. R., HUANG, S., WILLIAMS, P. J., FIRST, N. L., MAEDA, N. & SMITHIES, O. (1989) Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 8927-31.
- KOLODNER, R. (1996) Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev*, 10, 1433-42.
- KRESTEL, H. E., MAYFORD, M., SEEBURG, P. H. & SPRENGEL, R. (2001) A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse. *Nucleic Acids Res*, 29, E39.
- KUHN, R., SCHWENK, F., AGUET, M. & RAJEWSKY, K. (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science*, 269, 1427-9.
- KYTE, J. & DOOLITTLE, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157, 105-32.
- LAUNAY, P., FLEIG, A., PERRAUD, A. L., SCHARENBERG, A. M., PENNER, R. & KINET, J. P. (2002) TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, 109, 397-407.
- LEE, N., CHEN, J., SUN, L., WU, S., GRAY, K. R., RICH, A., HUANG, M., LIN, J. H., FEDER, J. N., JANOVITZ, E. B., LEVESQUE, P. C. & BLANAR, M. A. (2003) Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem*, 278, 20890-7.
- LEWANDOSKI, M. (2001) Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet*, 2, 743-55.
- LEYPOLD, B. G., YU, C. R., LEINDERS-ZUFALL, T., KIM, M. M., ZUFALL, F. & AXEL, R. (2002) Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 6376-81.
- LIEDTKE, W., CHOE, Y., MARTI-RENOM, M. A., BELL, A. M., DENIS, C. S., SALLI, A., HUDSPETH, A. J., FRIEDMAN, J. M. & HELLER, S. (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, 103, 525-35.
- LIEDTKE, W. & FRIEDMAN, J. M. (2003) Abnormal osmotic regulation in trpv4^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13698-703.

- LIMAN, E. R., COREY, D. P. & DULAC, C. (1999) TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5791-6.
- LIN, F. L., SPERLE, K. & STERNBERG, N. (1985) Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 1391-5.
- LIS, A., WISSENBACH, U. & PHILIPP, S. E. (2005) Transcriptional regulation and processing increase the functional variability of TRPM channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 371, 315-24.
- LIU, D. & LIMAN, E. R. (2003) Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15160-5.
- LURIA, S. E. & HUMAN, M. L. (1952) A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. *J Bacteriol*, 64, 557-69.
- MACK, V., BURNASHEV, N., KAISER, K. M., ROZOV, A., JENSEN, V., HVALBY, O., SEEBURG, P. H., SAKMANN, B. & SPRENGEL, R. (2001) Conditional restoration of hippocampal synaptic potentiation in Glur-A-deficient mice. *Science*, 292, 2501-4.
- MANSOUR, S. L., THOMAS, K. R. & CAPECCHI, M. R. (1988) Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 336, 348-52.
- MAROTO, R., RASO, A., WOOD, T. G., KUROSKY, A., MARTINAC, B. & HAMIL, O. P. (2005) TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol*, 7, 179-85.
- MARTIN, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 7634-8.
- MCGUFFIN, L. J., BRYSON, K. & JONES, D. T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16, 404-405.
- MCKEMY, D. D., NEUHAUSSER, W. M. & JULIUS, D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416, 52-8.
- MEYERS, E. N., LEWANDOSKI, M. & MARTIN, G. R. (1998) An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet*, 18, 136-41.
- MIZUNO, A., MATSUMOTO, N., IMAI, M. & SUZUKI, M. (2003) Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285, C96-101.
- MOCHIZUKI, T., WU, G., HAYASHI, T., XENOPHONTOS, S. L., VELDHIJSEN, B., SARIS, J. J., REYNOLDS, D. M., CAI, Y., GABOW, P. A., PIERIDES, A., KIMBERLING, W. J., BREUNING, M. H., DELTAS, C. C., PETERS, D. J. & SOMLO, S. (1996) PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*, 272, 1339-42.
- MODRICH, P. & LAHUE, R. (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*, 65, 101-33.
- MONTELL, C. (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, 2005, re3.
- MONTELL, C., BIRNBAUMER, L., FLOCKERZI, V., BINDELS, R. J., BRUFORD, E. A., CATERINA, M. J., CLAPHAM, D. E., HARTENECK, C., HELLER, S., JULIUS, D., KOJIMA, I., MORI, Y., PENNER, R.,

- PRAWITT, D., SCHARENBERG, A. M., SCHULTZ, G., SHIMIZU, N. & ZHU, M. X. (2002) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell*, 9, 229-31.
- MONTELL, C., JONES, K., HAFEN, E. & RUBIN, G. (1985) Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science*, 230, 1040-3.
- MOQRICH, A., HWANG, S. W., EARLEY, T. J., PETRUS, M. J., MURRAY, A. N., SPENCER, K. S., ANDAHAZY, M., STORY, G. M. & PATAPOUTIAN, A. (2005) Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*, 307, 1468-72.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.
- MURAKAMI, M., FLEISCHMANN, B., DE FELIPE, C., FREICHEL, M., TROST, C., LUDWIG, A., WISSENBACH, U., SCHWEGLER, H., HOFMANN, F., HESCHELER, J., FLOCKERZI, V. & CAVALIE, A. (2002) Pain perception in mice lacking the beta3 subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem*, 277, 40342-51.
- NADLER, M. J., HERMOSURA, M. C., INABE, K., PERRAUD, A. L., ZHU, Q., STOKES, A. J., KUROSAKI, T., KINET, J. P., PENNER, R., SCHARENBERG, A. M. & FLEIG, A. (2001) LTRPC7 is a Mg-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*, 411, 590-5.
- NAGAMINE, K., KUDOH, J., MINOSHIMA, S., KAWASAKI, K., ASAKAWA, S., ITO, F. & SHIMIZU, N. (1998) Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics*, 54, 124-31.
- NAGY, A. (2003) *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- NAGY, A., MOENS, C., IVANYI, E., PAWLING, J., GERTSENSTEIN, M., HADJANTONAKIS, A. K., PIRITY, M. & ROSSANT, J. (1998) Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr Biol*, 8, 661-4.
- NAGY, A., ROSSANT, J., NAGY, R., ABRAMOW-NEWERLY, W. & 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.
- NIEMEYER, B. A., BERGS, C., WISSENBACH, U., FLOCKERZI, V. & TROST, C. (2001) Competitive regulation of Ca^T-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3600-5.
- NILIUS, B., PRENEN, J., DROOGMANS, G., VOETS, T., VENNEKENS, R., FREICHEL, M., WISSENBACH, U. & FLOCKERZI, V. (2003) Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem*, 278, 30813-20.
- NILIUS, B., VENNEKENS, R., PRENEN, J., HOENDEROP, J. G., DROOGMANS, G. & BINDELS, R. J. (2001) The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block of the epithelial Ca²⁺ channel. *J Biol Chem*, 276, 1020-5.
- O'GORMAN, S., FOX, D. T. & WAHL, G. M. (1991) Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science*, 251, 1351-5.
- OBERWINKLER, J., LIS, A., GIEHL, K. M., FLOCKERZI, V. & PHILIPP, S. E. (2005) Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem*, 280, 22540-8.

- PALDI, A., GYAPAY, G. & JAMI, J. (1995) Imprinted chromosomal regions of the human genome display sex-specific meiotic recombination frequencies. *Curr Biol*, 5, 1030-5.
- PEIER, A. M., REEVE, A. J., ANDERSSON, D. A., MOQRICH, A., EARLEY, T. J., HERGARDEN, A. C., STORY, G. M., COLLEY, S., HOGENESCH, J. B., MCINTYRE, P., BEVAN, S. & PATAPOUTIAN, A. (2002) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science*, 296, 2046-9.
- PENG, J. B., CHEN, X. Z., BERGER, U. V., VASSILEV, P. M., TSUKAGUCHI, H., BROWN, E. M. & HEDIGER, M. A. (1999) Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem*, 274, 22739-46.
- PEREZ, C. A., MARGOLSKEE, R. F., KINNAMON, S. C. & OGURA, T. (2003) Making sense with TRP channels: store-operated calcium entry and the ion channel Trpm5 in taste receptor cells. *Cell Calcium*, 33, 541-9.
- PERRAUD, A. L., FLEIG, A., DUNN, C. A., BAGLEY, L. A., LAUNAY, P., SCHMITZ, C., STOKES, A. J., ZHU, Q., BESSMAN, M. J., PENNER, R., KINET, J. P. & SCHARENBERG, A. M. (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*, 411, 595-9.
- PERRAUD, A. L., SCHMITZ, C. & SCHARENBERG, A. M. (2003) TRPM2 Ca²⁺ permeable cation channels: from gene to biological function. *Cell Calcium*, 33, 519-31.
- PHILIPP, S., CAVALIE, A., FREICHEL, M., WISSENBACH, U., ZIMMER, S., TROST, C., MARQUART, A., MURAKAMI, M. & FLOCKERZI, V. (1996) A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to Drosophila TRP and TRPL. *Embo J*, 15, 6166-71.
- PHILIPP, S., HAMBRECHT, J., BRASLAVSKI, L., SCHROTH, G., FREICHEL, M., MURAKAMI, M., CAVALIE, A. & FLOCKERZI, V. (1998) A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *Embo J*, 17, 4274-82.
- PIPER, R. C. & LUZIO, J. P. (2004) CUPpling calcium to lysosomal biogenesis. *Trends Cell Biol*, 14, 471-3.
- RAMIREZ-SOLIS, R., RIVERA-PEREZ, J., WALLACE, J. D., WIMS, M., ZHENG, H. & BRADLEY, A. (1992) Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. *Anal Biochem*, 201, 331-5.
- RASTAN, S. & ROBERTSON, E. J. (1985) X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J Embryol Exp Morphol*, 90, 379-88.
- REISER, J., POLU, K. R., MOLLER, C. C., KENLAN, P., ALTINTAS, M. M., WEI, C., FAUL, C., HERBERT, S., VILLEGAS, I., AVILA-CASADO, C., MCGEE, M., SUGIMOTO, H., BROWN, D., KALLURI, R., MUNDEL, P., SMITH, P. L., CLAPHAM, D. E. & POLLAK, M. R. (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet*, 37, 739-44.
- REUBINOFF, B. E., PERA, M. F., FONG, C. Y., TROUNSON, A. & BONGSO, A. (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, 18, 399-404.
- ROBERTSON, E., BRADLEY, A., KUEHN, M. & EVANS, M. (1986) Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*, 323, 445-8.
- RUNNELS, L. W., YUE, L. & CLAPHAM, D. E. (2001) TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science*, 291, 1043-7.

- RUNNELS, L. W., YUE, L. & CLAPHAM, D. E. (2002) The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat Cell Biol*, 4, 329-36.
- RYAZANOV, A. G., WARD, M. D., MENDOLA, C. E., PAVUR, K. S., DOROVKOV, M. V., WIEDMANN, M., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., PARMER, T. G., PROSTKO, C. R., GERMINO, F. J. & HAIT, W. N. (1997) Identification of a new class of protein kinases represented by eukaryotic elongation factor-2 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4884-9.
- SAKAI, T., JOHNSON, K. J., MUROZONO, M., SAKAI, K., MAGNUSON, M. A., WIELOCH, T., CRONBERG, T., ISSHIKI, A., ERICKSON, H. P. & FASSLER, R. (2001) Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med*, 7, 324-30.
- SAMBROOK, J. A. R., DAVID W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SANO, Y., INAMURA, K., MIYAKE, A., MOCHIZUKI, S., YOKOI, H., MATSUSHIME, H. & FURUICHI, K. (2001) Immunocyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2. *Science*, 293, 1327-30.
- SAUER, B. & HENDERSON, N. (1989) Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Res*, 17, 147-61.
- SCHLINGMANN, K. P., WEBER, S., PETERS, M., NIEMANN NEJSUM, L., VITZTHUM, H., KLINGEL, K., KRATZ, M., HADDAD, E., RISTOFF, E., DINOUR, D., SYRROU, M., NIELSEN, S., SASSEN, M., WALDEGGER, S., SEYBERTH, H. W. & KONRAD, M. (2002) Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet*, 31, 166-70.
- SCHMITZ, C., PERRAUD, A. L., JOHNSON, C. O., INABE, K., SMITH, M. K., PENNER, R., KUROSAKI, T., FLEIG, A. & SCHARENBERG, A. M. (2003) Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell*, 114, 191-200.
- SEDGWICK, S. G. & SMERDON, S. J. (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci*, 24, 311-6.
- SHIN, M. K., LEVORSE, J. M., INGRAM, R. S. & TILGHMAN, S. M. (1999) The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature*, 402, 496-501.
- SMITH, A. G., HEATH, J. K., DONALDSON, D. D., WONG, G. G., MOREAU, J., STAHL, M. & ROGERS, D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336, 688-90.
- SMITH, G. D., GUNTHORPE, M. J., KELSELL, R. E., HAYES, P. D., REILLY, P., FACER, P., WRIGHT, J. E., JERMAN, J. C., WALHIN, J. P., OOI, L., EGERTON, J., CHARLES, K. J., SMART, D., RANDALL, A. D., ANAND, P. & DAVIS, J. B. (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*, 418, 186-90.
- SMITHIES, O., GREGG, R. G., BOGGS, S. S., KORALEWSKI, M. A. & KUCHERLAPATI, R. S. (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 317, 230-4.

- SOUTHERN, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98, 503-17.
- ST-ONGE, L., FURTH, P. A. & GRUSS, P. (1996) Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Res*, 24, 3875-7.
- STOWERS, L., HOLY, T. E., MEISTER, M., DULAC, C. & KOENTGES, G. (2002) Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science*, 295, 1493-500.
- STROTMANN, R., HARTENECK, C., NUNNENMACHER, K., SCHULTZ, G. & PLANT, T. D. (2000) OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol*, 2, 695-702.
- STRUBING, C., KRAPIVINSKY, G., KRAPIVINSKY, L. & CLAPHAM, D. E. (2001) TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron*, 29, 645-55.
- SUN, M., GOLDIN, E., STAHL, S., FALARDEAU, J. L., KENNEDY, J. C., ACIERNO, J. S., JR., BOVE, C., KANESKI, C. R., NAGLE, J., BROMLEY, M. C., COLMAN, M., SCHIFFMANN, R. & SLAUGENHAUPT, S. A. (2000) Mucopolipidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum Mol Genet*, 9, 2471-8.
- TAKEZAWA, R., SCHMITZ, C., DEMEUSE, P., SCHARENBERG, A. M., PENNER, R. & FLEIG, A. (2004) Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 6009-14.
- TANG, S. H., SILVA, F. J., TSARK, W. M. & MANN, J. R. (2002) A Cre/loxP-deleter transgenic line in mouse strain 129S1/SvImJ. *Genesis*, 32, 199-202.
- TANG, Y., TANG, J., CHEN, Z., TROST, C., FLOCKERZI, V., LI, M., RAMESH, V. & ZHU, M. X. (2000) Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF. *J Biol Chem*, 275, 37559-64.
- TE RIELE, H., MAANDAG, E. R. & BERNS, A. (1992) Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5128-32.
- THOMAS, K. R. & CAPECCHI, M. R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51, 503-12.
- THOMAS, K. R., DENG, C. & CAPECCHI, M. R. (1992) High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol Cell Biol*, 12, 2919-23.
- THOMAS, K. R., FOLGER, K. R. & CAPECCHI, M. R. (1986) High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, 44, 419-28.
- THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S. & JONES, J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-7.
- THOMSON, J. A., KALISHMAN, J., GOLOS, T. G., DURNING, M., HARRIS, C. P., BECKER, R. A. & HEARN, J. P. (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7844-8.

- TIRUPPATHI, C., MINSHALL, R. D., PARIA, B. C., VOGEL, S. M. & MALIK, A. B. (2002) Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*, 39, 173-85.
- TORRES, R. M. & KÜHN, R. (1997) *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*, Oxford, Oxford University Press.
- TREBAK, M., VAZQUEZ, G., BIRD, G. S. & PUTNEY, J. W., JR. (2003) The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium*, 33, 451-61.
- TSVALER, L., SHAPERO, M. H., MORKOWSKI, S. & LAUS, R. (2001) Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res*, 61, 3760-9.
- VENNEKENS, R., HOENDEROP, J. G., PRENEN, J., STUIVER, M., WILLEMS, P. H., DROOGMANS, G., NILIUS, B. & BINDELS, R. J. (2000) Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel. *J Biol Chem*, 275, 3963-9.
- VISWANATH, V., STORY, G. M., PEIER, A. M., PETRUS, M. J., LEE, V. M., HWANG, S. W., PATAPOUTIAN, A. & JEGLA, T. (2003) Opposite thermosensor in fruitfly and mouse. *Nature*, 423, 822-3.
- VOETS, T., JANSSENS, A., DROOGMANS, G. & NILIUS, B. (2004) Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel. *J Biol Chem*, 279, 15223-30.
- VOETS, T., JANSSENS, A., PRENEN, J., DROOGMANS, G. & NILIUS, B. (2003) Mg²⁺-dependent gating and strong inward rectification of the cation channel TRPV6. *J Gen Physiol*, 121, 245-60.
- WALDER, R. Y., LANDAU, D., MEYER, P., SHALEV, H., TSOLIA, M., BOROCHOWITZ, Z., BOETTGER, M. B., BECK, G. E., ENGLEHARDT, R. K., CARMİ, R. & SHEFFIELD, V. C. (2002) Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet*, 31, 171-4.
- WATANABE, H., VRIENS, J., PRENEN, J., DROOGMANS, G., VOETS, T. & NILIUS, B. (2003) Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*, 424, 434-8.
- WATNICK, T. & GERMINO, G. G. (1999) Molecular basis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Semin Nephrol*, 19, 327-43.
- WEINER, M. P., COSTA, G. L., SCHOETTLIN, W., CLINE, J., MATHUR, E. & BAUER, J. C. (1994) Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, 151, 119-23.
- WES, P. D., CHEVESICH, J., JEROMIN, A., ROSENBERG, C., STETTEN, G. & MONTELL, C. (1995) TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9652-6.
- WIGLER, M., SILVERSTEIN, S., LEE, L. S., PELLICER, A., CHENG, Y. & AXEL, R. (1977) Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell*, 11, 223-32.
- WILLIAMS, R. L., HILTON, D. J., PEASE, S., WILLSON, T. A., STEWART, C. L., GEARING, D. P., WAGNER, E. F., METCALF, D., NICOLA, N. A. & GOUGH, N. M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336, 684-7.

- WINN, M. P., CONLON, P. J., LYNN, K. L., FARRINGTON, M. K., CREAZZO, T., HAWKINS, A. F., DASKALAKIS, N., KWAN, S. Y., EBERSVILLER, S., BURCHETTE, J. L., PERICAK-VANCE, M. A., HOWELL, D. N., VANCE, J. M. & ROSENBERG, P. B. (2005) A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, 308, 1801-4.
- WISSENBACH, U., BODDING, M., FREICHEL, M. & FLOCKERZI, V. (2000) Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett*, 485, 127-34.
- WISSENBACH, U., NIEMEYER, B. A., FIXEMER, T., SCHNEIDEWIND, A., TROST, C., CAVALIE, A., REUS, K., MEESE, E., BONKHOFF, H. & FLOCKERZI, V. (2001) Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem*, 276, 19461-8.
- WONG, E. A. & CAPECCHI, M. R. (1986) Analysis of homologous recombination in cultured mammalian cells in transient expression and stable transformation assays. *Somat Cell Mol Genet*, 12, 63-72.
- WU, G., D'AGATI, V., CAI, Y., MARKOWITZ, G., PARK, J. H., REYNOLDS, D. M., MAEDA, Y., LE, T. C., HOU, H., JR., KUCHERLAPATI, R., EDELMANN, W. & SOMLO, S. (1998) Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell*, 93, 177-88.
- XU, H., RAMSEY, I. S., KOTECHEA, S. A., MORAN, M. M., CHONG, J. A., LAWSON, D., GE, P., LILLY, J., SILOS-SANTIAGO, I., XIE, Y., DISTEFANO, P. S., CURTIS, R. & CLAPHAM, D. E. (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature*, 418, 181-6.
- XU, X., LI, C., GARRETT-BEAL, L., LARSON, D., WYNHAW-BORIS, A. & DENG, C. X. (2001) Direct removal in the mouse of a floxed neo gene from a three-loxP conditional knockout allele by two novel approaches. *Genesis*, 30, 1-6.
- YAGI, T., IKAWA, Y., YOSHIDA, K., SHIGETANI, Y., TAKEDA, N., MABUCHI, I., YAMAMOTO, T. & AIZAWA, S. (1990) Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9918-22.
- YAMAGUCHI, H., MATSUSHITA, M., NAIRN, A. C. & KURIYAN, J. (2001) Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity. *Mol Cell*, 7, 1047-57.
- YELLEN, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419, 35-42.
- YU, H., KESSLER, J. & SHEN, J. (2000) Heterogeneous populations of ES cells in the generation of a floxed Presenilin-1 allele. *Genesis*, 26, 5-8.
- YUE, L., PENG, J. B., HEDIGER, M. A. & CLAPHAM, D. E. (2001) CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature*, 410, 705-9.
- ZHANG, Y., HOON, M. A., CHANDRASHEKAR, J., MUELLER, K. L., COOK, B., WU, D., ZUKER, C. S. & RYBA, N. J. (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, 112, 293-301.
- ZHU, X., JIANG, M., PEYTON, M., BOULAY, G., HURST, R., STEFANI, E. & BIRNBAUMER, L. (1996) trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell*, 85, 661-71.

- ZITT, C., OBUKHOV, A. G., STRUBING, C., ZOBEL, A., KALKBRENNER, F., LUCKHOFF, A. & SCHULTZ, G. (1997) Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *J Cell Biol*, 138, 1333-41.
- ZITT, C., ZOBEL, A., OBUKHOV, A. G., HARTENECK, C., KALKBRENNER, F., LUCKHOFF, A. & SCHULTZ, G. (1996) Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron*, 16, 1189-96.

9.3 DATENBANKEN

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (National Center for Biotechnology Information)
- <http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/biounit> (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources)
- <http://www.expasy.org/>

DANKSAGUNG

Denken und danken sind verwandte Wörter; wird danken dem Leben, in dem wir es bedenken.

Thomas Mann

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Veit Flockerzi für die interessante Themenstellung bedanken. Ohne seine kontinuierliche Ermutigung und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Marc Freichel, der mich auch in den schwierigsten Phasen dieser Doktorarbeit zum Weitermachen ermutigt hat und dem ich mein ganzes Können der Stammzellkultur verdanke. Außerdem möchte ich seinen Mitarbeitern Stefanie Buchholz für das Vermitteln der Molekularbiologischen Arbeitstechniken, Kerstin Fischer für die Übernahme der Tierzucht und Ulrich Kriebs für die Unterstützung bei der Genotypisierung danken. Tatkräftige Unterstützung erfuhr ich auch von unseren Auszubildenden Nadine, Annett, Marit, Jasmin, Christine, Saskia, Franziska, Steffi D., Steffi K. und Juliane (in chronologischer Reihenfolge).

Martin Simon-Thomas danke ich für die Konstruktion maßangefertigter Zellkulturböden und für die Hilfe beim Fotografieren und Filmen der ES-Zellen und der Arbeitsschritte in der Zellkultur. Außerdem für das unermüdliche Reparieren der unendlichen Menge an Computern, Pipetten, Schüttlern, Sequenziergeräten und Absaugflaschen, die meinem Arbeitseifer zum Opfer gefallen sind. Herrn Dr. Wollenberg bin ich dankbar für seine Unterstützung bei der Bildverarbeitung und der Umschlagsgestaltung; des weiteren für Hilfestellungen bei allen Fragen rund um den Computer, insbesondere bei Computerabstürzen.

Als ich im Dezember 2000 meine Doktorarbeit begann wurde ich warmherzig von Dr. Claudia Fecher-Trost und ihren Mitarbeiterinnen Dr. Daniela Hirnet und Christine Jung empfangen. Sie haben keine Mühen gescheut einem Laborneuling auf den ersten Schritten in der Proteinbiochemie zu begleiten. Bei Dr. Rudi Vennekens und Dr. Ulf Matti bedanke ich mich für die erfreuliche Zusammenarbeit in der ES-Zellkultur. Ich danke Anni, Isa, Conni und Juliane, meine engsten Freundinnen im Labor, für ihre Teilnahme an den Hochs und Tiefs des Doktorandenalltags. Mit Marcel, Carlo, Steffi Mannebach, Sabrina, Uli und Ilka habe ich viele unvergessliche 4-Uhr-Kaffees getrunken. Den ‚elektrophysiologischen‘ Doktoros Matthias Bödding, Brigitte Held und Johannes Oberwinkler bin ich für das Vermitteln elektrophysiologischer Prinzipien dankbar. Mit Dr. Uli Wissenbach habe ich zahlreiche anregende Diskussionen über den Sinn des Forschens geführt, außerdem war er mit eine große Hilfe beim Lösen von Klonierungsproblemen.

Beim Schreiben der Doktorarbeit waren mir Franz-Josef Eckert, Andreas und Lars bei der Suche nach den vielen Rechtschreibfehlern und sonstigen Verstößen gegen die deutsche Sprache hilfreich.

Ich bin dankbar für die Freundschaft so vieler großartiger Menschen: Steffi und Eva, meine langjährigen Freundinnen mit denen ich die letzten Jahre nicht so viel Zeit verbringen konnte wie ich es gern gewollt hätte. Meine Kommilitonen Peter, Ulrich, Iris und Katharina mit denen ich früher gemeinsam über den Büchern gebrütet und in den letzten fünf Jahren viele schöne Kneipenabende verbracht habe. Ganz besonders ans Herz gewachsen ist mir die Familie Hutschenreuter: Dr. Ulrich & Gudrun, Til & Nadine und Verena. Ihr seid mir eine zweite Familie geworden. Meinem Trainer Thorsten danke ich dafür dass er die Passion fürs Tanzen in mir geweckt hat und mich daran erinnert dass es neben Forschung auch noch andere Dinge im Leben gibt. I am grateful to my ‚hollandse‘-friends Ylva, Julia, Maytal, Helena and Bobby for keeping in touch with me despite the geographical distance. It was always comforting discussing Ph.D.-life with you.

I am thankful for the support I have received of my family: My grandparents Paulina & Sigurd Olausson and Karin & Axel Nilsson have given me unforgettable holiday memories and a place to come home to. I thank my mother Anita and my brother Philipp for their love and support. My heartfelt thanks goes to Dan & Ulla Nilsson and my cousins Linda, Jens, Lena and Kerstin for great Christmas partys and long discussions about the sense of life. And moreover, for comforting me in difficult times and pushing me to go on. Jonny Nilsson reminded me since my early schooldays of the importance of study and encouraged me to pursue a university career. I am grateful to my cousins Ann-Christin, Gisela and Cornelia and my aunt and uncle Erik & Gun Karlsson who always warmly welcomed me as a guest in their home.

To my father Tommy, I owe my determination and my love for science. There is nothing I would wish more than sharing the success of finishing this thesis with him. He had to leave us too early but his memory will live on in me forever.

Danke Lars, für Deine Unterstützung und Dein Verständnis.