

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Klonierung und funktionelle Charakterisierung
neuer Vertreter der Superfamilie
spannungsaktivierter Kationenkanäle**

Hartmut Cuny

aus

Darmstadt

2008

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Martin Biel betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 22.12.2008

Hartmut Cuny

Dissertation eingereicht am 12.01.2009

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Biel

2. Gutachter: Prof. Dr. C. Wahl-Schott

mündliche Prüfung am 03.03.2009

Abkürzungen	6
1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit	8
1.1 Die <i>Pore Loop</i> Kationenkanäle	8
1.2 Kationenkanäle mit sechs Transmembransegmenten	9
1.3 Zwei-Domänen- und Vier-Domänen-Kationenkanäle	11
1.3.1 <i>Voltage Gated Channel Like 1</i> (VGCNL1)	13
1.3.2 <i>Two Pore Loop Cation Channel 1</i> und 2 (TPCN1 und TPCN2)	15
1.4 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer	19
2.2 DNA-Methoden	19
2.2.1 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden	19
2.2.1.1 Verwendete Plasmide	19
2.2.1.2 Transformation und Kultivierung von <i>E. coli</i>	22
2.2.1.3 Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse (Miniprep)	22
2.2.1.4 Plasmid-Präparation im Großmaßstab (Maxiprep)	23
2.2.2 DNA-Auftrennung und -Aufreinigung	24
2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.2.2.3 Isolierung von DNA aus Gelen	25
2.2.2.4 DNA-Fällung	25
2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA	26
2.2.3.1 Restriktionsverdau	26
2.2.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	26
2.2.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.2.4 Herstellung eines Klonierungsvektors mit eigener MCS	27
2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion	27
2.2.6 Gewinnung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen	29
2.2.7 Southern Blot	29
2.3 RNA-Methoden	33
2.3.1 Isolation von RNA aus Mausgewebe	33
2.3.1.1 Isolation der mRNA im kleinen Maßstab mittels magnetischer Separation	34
2.3.1.2 Isolation der mRNA im größeren Maßstab in zwei Schritten	35
2.3.2 Synthese von cDNA aus mRNA	36
2.3.3 Northern Blot	36
2.4 Arbeiten mit Zellkulturen	38
2.4.1 Kultivierte Zelllinien	38
2.4.2 Transfektion und Vorbereitung der Zellen für die Mikroskopie	39
2.4.3 Immuncytochemie	39
2.4.4 Konfokalmikroskopie	40
2.4.5 Transfektion und Lyse der Zellen für die Proteingewinnung	41

2.5	Arbeiten mit Proteinen	42
2.5.1	Isolation von Membranproteinen aus Gewebe	42
2.5.2	Quantifizierung von Proteinen	43
2.5.3	Deglycosylierung von Proteinen	43
2.5.4	Herstellung spezifischer polyklonaler Antikörper	43
2.5.5	Co-Immunpräzipitation	45
2.5.6	SDS-PAGE und Western Blot	45
2.6	Histologische Methoden	47
2.6.1	Herstellung von Gewebeschnitten	47
2.6.2	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	48
2.6.3	<i>In situ</i> Hybridisierung	48
3	Ergebnisse	54
3.1	Gewebsspezifische Nachweise der Ionenkanäle VGCNL1, TPCN1 und TPCN2 mittels RT-PCR	54
3.2	Gewebsspezifische Nachweise der Kanäle mittels Northern Blot	55
3.3	Klonierung der Ionenkanäle VGCNL1, TPCN1 und TPCN2	58
3.3.1	Klonierung des murinen VGCNL1	58
3.3.2	Klonierung des murinen TPCN1	60
3.3.3	Klonierung des murinen TPCN2	61
3.4	Untersuchungen an TPCN-Proteinen	65
3.4.1	Herstellung und Test eines TPCN2-spezifischen Antikörpers	65
3.4.2	Untersuchung der Glycosylierung der TPCN-Proteine	68
3.4.3	Coimmunpräzipitation der TPCN-Proteine	71
3.5	Heterologe Expression in Pflanzenzellen und Konfokalmikroskopie	73
3.6	Heterologe Expression in HEK293-Zellen und Konfokalmikroskopie	75
3.7	Heterologe Expression in COS-7-Zellen und Immuncytochemie	76
3.7.1	Immuncytochemische Untersuchung des Wildtyp TPCN2-Kanals	76
3.7.2	Immuncytochemische Untersuchungen auf Anwesenheit des TPCN2-Kanals in der Plasmamembran	80
3.7.3	Immuncytochemische Untersuchung gezielt mutierter TPCN2-Kanäle	82
3.8	Nachweis der TPCN-Kanäle im Mausgewebe mittels <i>in situ</i> Hybridisierung	85
3.9	Ausarbeitung einer Gentergeting-Strategie zur Inaktivierung des TPCN2-Gens in der Maus	91
3.9.1	Detektion der genomischen Sequenz des TPCN2-Kanals	94
3.9.2	Klonierung der homologen Bereiche des Targetingvektors	95
3.9.3	Southern Blot-Strategie zum Nachweis des homologen Rekombinationsereignisses	96
3.9.4	Herstellung von Hilfsvektoren mit definierten Restriktionsschnittstellen	100
3.9.5	Klonierung des Targetingvektors	101

3.10	Herstellung der transgenen TPCN2-Mäuse	105
3.10.1	Stammzelltargeting	105
3.10.2	Southern Blots zum Nachweis der Rekombination	106
3.10.3	PCR-Analysen und Sequenzierungen von Stammzell-DNA	107
3.10.4	Blastocysten-Injektion eines positiven Stammzellklons	109
3.10.5	Verpaarungen zur Gewinnung heterozygoter TPCN2-Mäuse	109
3.10.6	Verpaarungen heterozygoter TPCN2-Mäuse mit Cre-Deleter-Mäusen	110
4	Diskussion	111
4.1	Gewebeverteilung des VGCNL1 und der TPCN-Kanäle	111
4.2	Klonierung und phylogenetische Betrachtung der TPCN-Kanäle	113
4.3	Zelluläre Funktion des TPCN2-Kanals	118
4.4	Bedeutung und Wichtigkeit der TPCN2-Knockout-Maus	122
5	Zusammenfassung	124
6	Anhang	126
6.1	Verwendete Primer	126
6.2	Peptidsequenzen für die Herstellung polyklonaler Antikörper	131
6.3	Verwendete Antikörper	131
6.4	Sequenzen der aus Maus-Gehirn-cDNA klonierten Ionenkanäle	132
6.4.1	Sequenz des VGCNL1	132
6.4.2	Sequenz des TPCN1	132
6.4.3	Sequenz des TPCN2	135
6.5	Vergleich der murinen TPCN-Kanal-Sequenzen mit der Sequenz des TPCN1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	137
6.6	Sequenz des TPCN2-Targetingvektors	139
7	Literatur	144
	Lebenslauf	151
	Danksagung	152

Abkürzungen

A	Adenin
AMCA	Aminomethylcoumarin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	Cytosin
cADPR	cyclische Adenosindiphosphat-Ribose
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
COS-7	CV-1-Affenzelllinie mit genetischem Material des SV40-Virus (CV-1 in origin, and carrying SV40 genetic material)
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
DTT	Dithiothreitol
ECFP	enhanced cyan fluorescent protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FBS	Fötales Rinderserum (fetal bovine serum)
FRT	Erkennungssequenz der Flp-Rekombinase (Flp recombinase target)
g	Gramm
G	Guanosin
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure (wässrige Lösung)
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie Klon 293 (human embryonic kidney)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
kb	Kilobasen, (1000 Basenpaare)
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LoxP	Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase (locus of crossover (x) of Phage P1)
M	mol pro Liter

mA	Milliampere
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mRNA	Boten-RNA (messenger-RNA)
NAADP	Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotidphosphat
NaCl	Natriumchlorid
nt	Nucleotid(e)
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAC	künstliches Chromosom aus dem Bakteriophagen P1 (P1-derived artificial chromosome)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Picomol
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur, reverse Transkriptase
RT-PCR	Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
T	Tyrosin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Borat-NaCl-Puffer
TEA	Triethanolamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TK	Thymidinkinase
TPCN	<i>Two Pore Cation Channel</i>
Tris	α,α,α-Tris-(hydroxymethyl) methylamin
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TRP-Kanal	Transienter Rezeptorpotential-Kanal (transient receptor potential)
U	Einheit der Enzymaktivität (unit)
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VGCNL1	<i>Voltage Gated Channel Like 1</i>

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

1.1 Die *Pore Loop* Kationenkanäle

Ionenkanäle sind spezialisierte Membranproteine, die verschließbare Poren in Membranen bilden. Im geöffneten Zustand lassen sie Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten passieren und vermitteln auf diese Weise elektrische Signale, die für die Steuerung zahlreicher physiologischer Prozesse, wie z. B. Nervenleitung, Muskelkontraktion, Sekretion, Sinneswahrnehmung und die Informationsverarbeitung im Hirn verantwortlich sind (Yu et al., 2005).

Eine Superfamilie der Ionenkanäle sind die sog. *Pore Loop* Kanäle, von denen es im Genom des Menschen über 140 verschiedene gibt. Damit sind sie die drittgrößte Gruppe signaltransduzierender Proteine nach den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und den Protein-Kinasen (Yu & Catterall, 2004). Die strukturell einfachsten Vertreter dieser Ionenkanal-Superfamilie sind die einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (K_{ir}) und die bakteriellen Kaliumkanäle. Bei ihnen ist das namensgebende Element, die für die Ionenselektivität verantwortliche Porenschleife (*Pore Loop*), flankiert von zwei transmembranären α -Helices, den sog. Transmembransegmenten (Abb. 1). Vier derartige Kanal-Monomere lagern sich *in vivo* in der Membran so zu einem Homotetramer zusammen, dass ein zentraler Permeationsweg für die Ionen entsteht, an dessen engster Stelle der Selektivitätsfilter sitzt (Abb. 1, roter Bereich) (Doyle et al., 1998).

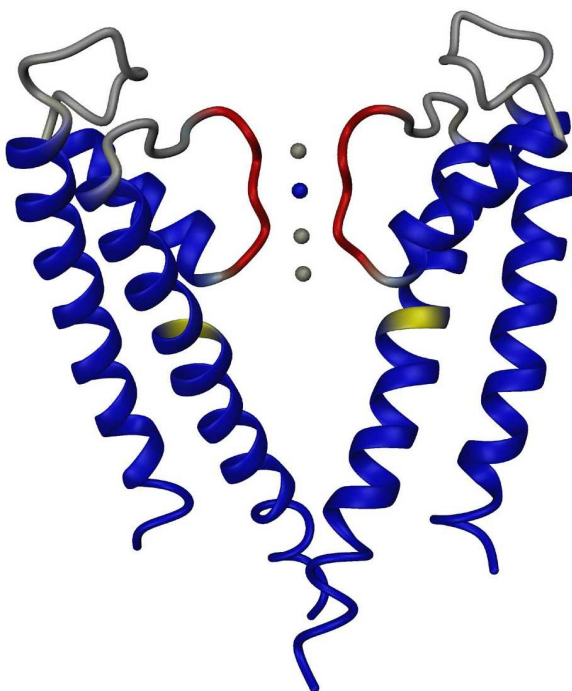


Abb. 1: Dreidimensionales Modell des bakteriellen Kaliumkanals KcsA. Für eine bessere Übersicht sind nur zwei der vier Untereinheiten gezeigt. Jede Untereinheit setzt sich aus zwei langen α -Helices (blau) und dem *Pore Loop* (grau und rot sowie der dazwischenliegenden kurzen Helix) zusammen. Die Selektivitätsfilter (rot) in den *Pore Loops* vermitteln die Selektivität für bestimmte Ionen (Kugeln). Das dargestellte Modell zeigt die geschlossene Konformation, bei der die helicalen Bereiche auf der cytosolischen Seite (bei der Abbildung unten) nah zusammenliegen und so die Permeation der Ionen verhindern. Ein konserviertes Glycin in den inneren α -Helices (gelb) funktioniert als Scharnier und ermöglicht das Öffnen und Schließen des Kanals.

Die Aminosäuren des Selektivitätsfilters sind für die Ionenselektivität der Kanäle verantwortlich und stellen ein zentrales Merkmal zur Charakterisierung dar. In den Kaliumkanälen ist das Motiv GYG (Glycin, Tyrosin, Glycin) vorherrschend (Minor, 2001). Über Konformationsänderungen der inneren α -Helices, bei denen bestimmte konservierte Glycine (Abb. 1, gelb) als Scharniere (*gating hinge*) funktionieren, öffnet und schließt sich der Kanal (Jiang et al., 2002).

In der Evolution fand offensichtlich eine Genduplikation eines *Pore Loop* Kanals statt, denn es existieren auch Kanäle bei denen zwei der Module – bestehend aus der Porenschleife und den zwei Transmembransegmenten – miteinander fusioniert sind. Diese Kanäle, K_{2P} genannt, bilden in der Membran Dimere und formen so Ionenkanäle, die strukturell den K_{ir} -Kanälen ähnlich sind (Lesage et al., 1996; Goldstein et al., 1996). Sie sind permanent geöffnet und erzeugen dadurch einen konstanten Kaliumionenstrom, sowohl in Neuronen als auch in nicht erregbaren Zellen (Yu & Catterall, 2004).

1.2 Kationenkanäle mit sechs Transmembransegmenten

Bei zahlreichen Vertretern der *Pore Loop* Kanäle ist die Grundstruktur aus einer Porenschleife und zwei flankierenden Transmembransegmenten (Abb. 1) um weitere vier Transmembransegmente erweitert. Diese Kanäle sind evolutionär durch eine Fusion zweier verschiedener Gene entstanden. So hat sich das Gen eines *Pore Loop* Kanals mit einem Gen verbunden, das ein Membranprotein mit vier Transmembransegmenten codiert. Letzteres Protein alleine formt einen spannungsgesteuerten Protonenkanal (Sasaki et al., 2006; Ramsey et al., 2006). In dem Produkt der Genfusion funktioniert der von dem Protonenkanal abgeleitete Teil als Spannungssensor, während der von dem *Pore Loop* Kanal abgeleitete Teil die Permeation von Kationen übernimmt (Swartz, 2008).

Derartige Sechs-Transmembransegment-Kanäle lagern sich immer symmetrisch als Tetramere zusammen (Abb. 2, oben), wobei, wie bei den einfacher gebauten bakteriellen Kationenkanälen und K_{ir} -Kanälen, die Porenschleife jedes Monomers ins Zentrum ragt und zu einem Viertel zu der gesamten Pore des Kanals beiträgt (Doyle et al., 1998; Yu et al., 2005; Sands et al., 2005 und 2006). Die vier Transmembransegmente des Spannungssensors werden bei diesen Kanälen als S1 bis S4 klassifiziert, während die beiden Segmente, die die Porenschleife flankieren, S5 und S6 genannt werden (Abb. 2, unten).

Das Segment S4 des Spannungssensors ist durch viele positiv geladene, basische Aminosäurereste gekennzeichnet. So ist z. B. bei den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen in der N-terminalen Hälfte dieses Segments jeder dritte Aminosäurerest positiv geladen. Änderungen der Transmembranspannung lösen Konformationsänderungen im Segment S4 aus, die sich auf die anderen Segmente übertragen und den Kanal öffnen oder schließen (Sands et al., 2006).

Interessanterweise hat sich das Spannungssensor-Modul in der Evolution nicht nur mit Ionenkanälen fusioniert, sondern es gibt auch eine Phosphatase mit einer derartigen Domäne. Dieses Enzym hat dadurch die Fähigkeit zur spannungsabhängigen Aktivierbarkeit bekommen (Swartz, 2008).

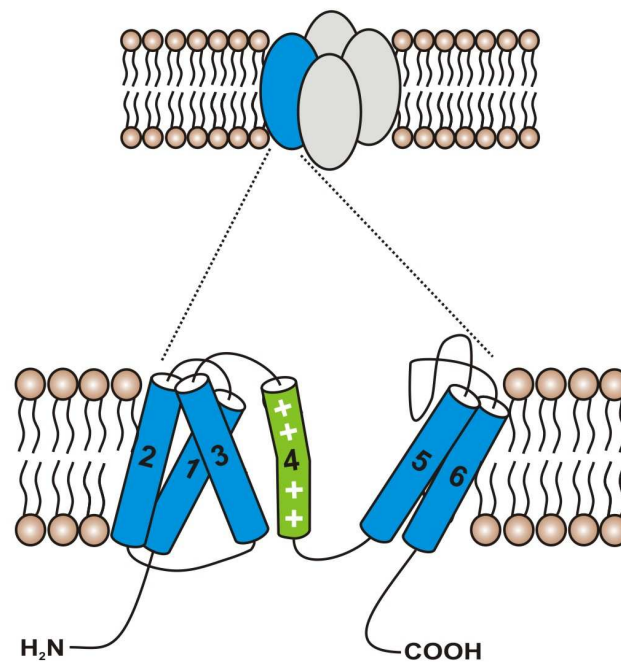


Abb. 2: Membrantopologie der Kationenkanäle mit sechs Transmembransegmenten. Bei diesen Kanälen ist der Grundbauplan der *Pore Loop* Kanäle – hier S5, Porenschleife und S6 genannt – um einen Spannungssensor, bestehend aus vier weiteren transmembranären α -Helices (S1 bis S4), erweitert. Das vierte Transmembransegment (grün) besitzt viele positiv geladene, basische Aminosäurereste. Vier Kanal-Monomere lagern sich symmetrisch zusammen, um einen funktionellen Kanal zu bilden.

Neben den spannungsabhängigen Kaliumkanälen (K_v) gehören auch die transienten Rezeptorpotential-Kanäle (TRP), die Calcium-aktivierten Kaliumkanäle (K_{Ca}), die Cyclonucleotid-gesteuerten Kanäle (CNG) sowie die Hyperpolarisations-aktivierten und Cyclonucleotid-gesteuerten Kanäle (HCN) zur Familie der Sechs-Transmembransegment-

Kanäle (Jan & Jan, 1997; Clapham et al., 2001; Montell et al., 2002; Zagotta & Siegelbaum, 1996; Biel et al., 2002; Robinson & Siegelbaum, 2003; Craven & Zagotta, 2006). Die K_{Ca} -, CNG- und HCN-Kanäle besitzen zusätzliche regulatorische Domänen, die Liganden binden und so die Kanäle aktivieren können.

Die über 50 Mitglieder der TRP-Kanäle der Vertebraten teilen sich in sieben Subfamilien auf, die eine Sequenzhomologie von etwa 20% zueinander haben (Clapham, 2003; Nilius & Voets, 2005). Ihre äußerst vielfältigen Funktionen reichen von der Sinnesphysiologie bis zur Vasorelaxation, sind aber im Detail meistens noch nicht hinreichend aufgeklärt (Montell et al., 2002, Ramsey et al., 2006). Ebenso vielfältig sind ihre Ionenselektivitäten und Steuerungsmechanismen. So gehören z. B. die Kanäle der TRPC-Subfamilie zum Phosphatidylinositol-Signalweg und werden über die Phospholipase C in ihrer Aktivität reguliert (Clapham et al., 2001; Montell et al., 2002). Sie stellen dort Kationenkanäle mit einer Selektivität für mehrere Ionenspezies in der Plasmamembran dar, deren Öffnung zum Einströmen von extrazellulären Kationen führt und das Membranpotential depolarisiert (Yu & Catterall, 2004). Andere TRP-Kanäle sind in Signalwege der Sinnesphysiologie, wie z. B. die Wahrnehmung von Wärme und Kälte, involviert und werden durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert (Montell et al., 2002; Ramsey et al., 2006; Talavera et al., 2008).

1.3 Zwei-Domänen- und Vier-Domänen-Kationenkanäle

Durch das Vergleichen der Porenregionen aller 143 Mitglieder der *Pore Loop* Kationenkanäle lässt sich ein phylogenetischer Stammbaum erstellen, der diese Ionenkanal-Superfamilie in mehrere Gruppen einteilt (Abb. 3A).

Dabei zeigt sich, dass es neben den bereits erwähnten K_{ir} -Kanälen, K_{2P} -Kanälen und Sechs-Transmembransegment-Kanälen noch weitere evolutionäre, strukturelle Weiterentwicklungen gibt, die offenbar durch Genduplikationen entstanden sind. So haben die Zwei-Porenschleifen-Kationenkanäle (*Two Pore Loop Cation Channels*, TPCN) insgesamt zwölf Transmembransegmente und sehen strukturell wie zwei miteinander fusionierte Kanaluntereinheiten der Sechs-Transmembransegment-Kanäle aus (Abb. 3B). Es wird angenommen, dass sich *in vivo* zwei Kanalmonomere der TPCN-Kanäle zusammenlagern, um einen funktionellen Ionenkanal zu bilden, der einem Tetramer der Sechs-

Transmembransegment-Kanäle sehr ähnlich ist (Ishibashi et al., 2000). Die TPCN-Kanäle sind sehr nahe mit den TRP-Kanälen verwandt (grüner Ast in Abb. 3A).

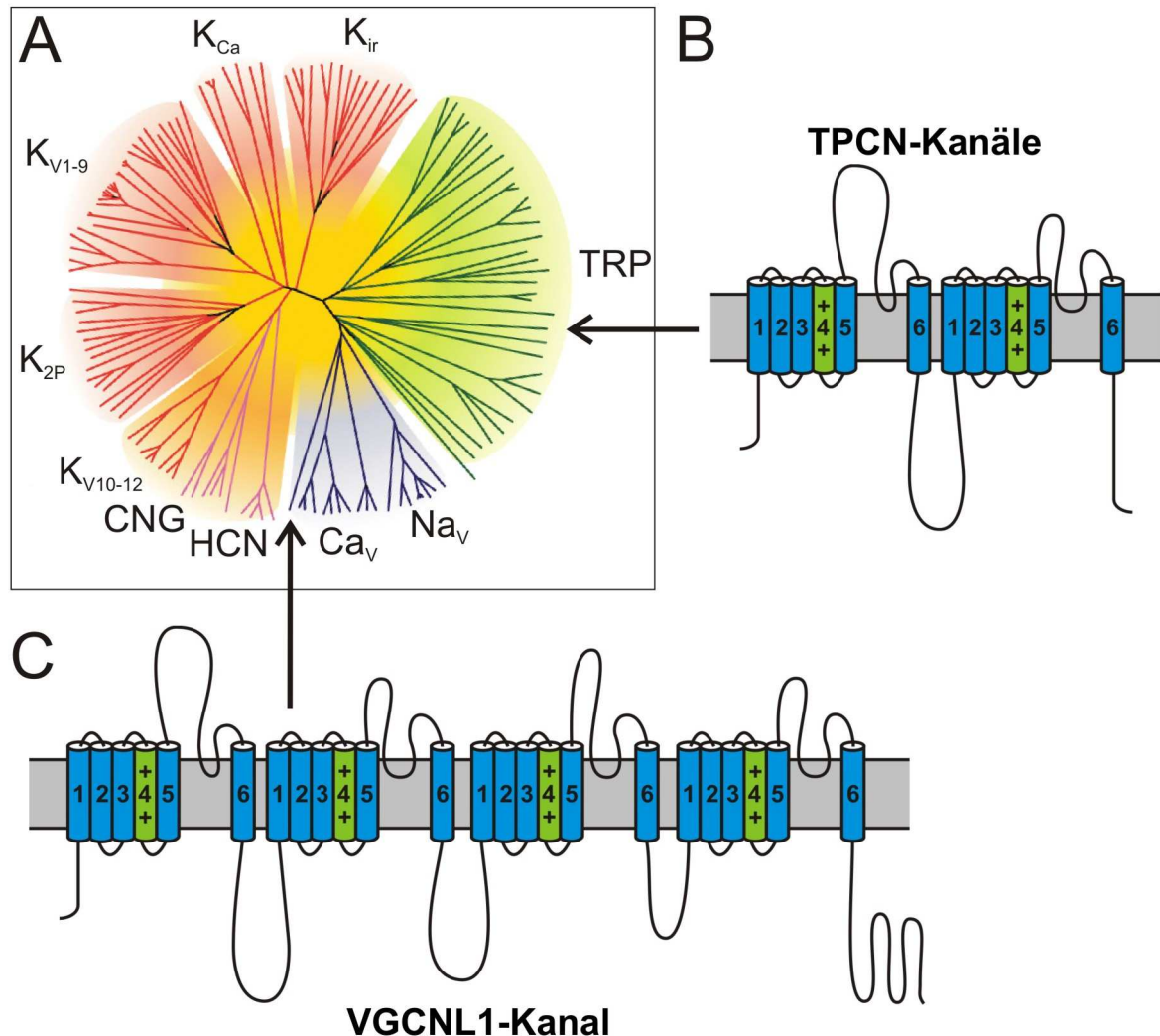


Abb. 3: Stammbaum der *Pore Loop* Kanäle, Membrantopologien der Zwei- und Vier-Domänen-Kanäle.
A: Phylogenetischer Stammbaum der *Pore Loop* Kationenkanäle. Der Stammbaum zeigt die Verwandtschaftsbeziehungen der 143 Mitglieder dieser Ionenkanal-Familie. Durch einen Vergleich der Porenregionen der Kanäle lassen sich vier große Gruppen unterscheiden, die als Zweige unterschiedlicher Farbe dargestellt sind. Die blauen Zweige repräsentieren die Vier-Domänen-Kanäle (Calcium- und Natriumkanäle), die roten Zweige stellen die zahlreichen Vertreter der Kaliumkanäle dar, die violetten Zweige sind die Cyclonucleotid-gesteuerten Kanäle und bei den grünen Zweigen handelt es sich um die Vertreter der transienten Rezeptorpotential-Kanäle (TRP-Kanäle). Die beiden Pfeile zeigen auf die Zweige der Ionenkanäle, die in dieser Arbeit untersucht wurden: VGCNL1, TPCN1 und TPCN2.
B: Membrantopologie der *Two Pore Loop Cation* Kanäle, die aus zwei fusionierten Grundbausteinen (Domänen) bestehen. Die helicalen Abschnitte (Transmembransegmente) sind als blaue bzw. grüne Zylinder dargestellt. Die Porenregion (Selektivitätsfilter) befindet sich jeweils zwischen den Transmembransegmenten fünf und sechs. Das vierte Transmembransegment (grün) enthält viele basische Aminosäurereste und bildet den Spannungssensor.
C: Membrantopologie des VGCNL1-Kanals, die der allgemeinen Struktur der porenbildenden α -Untereinheit der Vier-Domänen-Kanäle entspricht. (Abb. 3A, modifiziert nach Yu & Catterall, 2004)

Vermutlich hat sich im Laufe der Evolution das Gen eines TPCN-Kanals wiederum dupliziert, was zur Entstehung der Vier-Domänen-Kationenkanäle führte (blauer Ast in Abb. 3A). Bei diesen Kanälen ist die porenbildende α -Untereinheit ein einzelnes Protein, bestehend aus 24 Transmembransegmenten und vier Porenschleifen (Abb. 3C).

So kann ein derartiges Protein als Monomer einen kompletten spannungsaktivierten Ionenkanal bilden, der sehr große strukturelle Ähnlichkeit mit einem Tetramer der Sechs-Transmembransegment-Kanäle besitzt (Catterall, 2000; Goldin, 2002). Bekannte Vertreter der Vier-Domänen-Kationenkanäle sind die spannungsgesteuerten Natrium- und Calciumkanäle, Na_V und Ca_V .

Viele Mitglieder der Vier-Domänen-Kanäle wurden bereits intensiv beforscht (Hofmann et al., 1994.; Goldin, 2001; Yu et al., 2005; Wahl-Schott et al., 2006; Jarvis & Zamponi, 2007), wohingegen von anderen Mitgliedern dieser Familie weitaus weniger über die funktionellen Eigenschaften und die physiologische Relevanz bekannt ist (Lee et al., 1999). Die physiologische Bedeutung der TPCN-Kanäle der Vertebraten ist bisher völlig unbekannt (Ishibashi et al., 2000).

In dieser Arbeit wurden zwei der bisher noch unzureichend beschriebenen TPCN-Kanäle sowie ein ebenfalls wenig erforschter Vertreter der Vier-Domänen-Kanäle, der Kanal *Voltage Gated Channel Like 1* (VGCNL1), untersucht und charakterisiert.

1.3.1 Voltage Gated Channel Like 1 (VGCNL1)

Bei den bekannten Vertretern der Vier-Domänen-Kationenkanäle, den spannungsgesteuerten Natrium- und Calciumkanälen, ist für die Ionenselektivität in jedem der vier Porenschleifen eine Aminosäure des Selektivitätsfilters von ganz besonderer Wichtigkeit (Abb. 4, gelb hervorgehoben) (Heinemann et al., 1992, Sun et al., 1997). Diese vier Aminosäuren im Selektivitätsfilter stellen ein zentrales Merkmal zur Charakterisierung dieser Kanäle dar. Die selektivitätsbestimmende Aminosäure der Calciumkanäle ist jeweils Glutaminsäure (EEEE-Motiv) (Tang et al., 1993; Sather & McCleskey, 2003). Dagegen haben die Selektivitätsfilter der Natriumkanäle generell die Aminosäuren DEKA (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Alanin) an analoger Position (Heinemann et al., 1992; Sun et al., 1997). Das Zustandekommen der Ionenselektivität für Calcium- bzw. Natriumionen ist auf struktureller Ebene noch nicht geklärt.

Neben den relativ gut charakterisierten Calcium- und Natriumkanälen gibt es einen weiteren Vier-Domänen-Kanal, der weit weniger charakterisiert ist (Yu & Catterall, 2004) und aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften *Voltage Gated Channel Like 1* (VGCNL1) genannt wird. Beim Vergleich der vermuteten Selektivitätsfilter des VGCNL1 mit denen der Calcium- und Natriumkanäle werden folgende Unterschiede deutlich. Der VGCNL1 besitzt in den vorhergesagten Selektivitätsfiltern die Signatur EEKE (Glutaminsäure, Glutaminsäure, Lysin, Glutaminsäure) und erscheint somit wie eine Zwischenform zwischen Natrium- und Calciumkanal (Abb. 4).

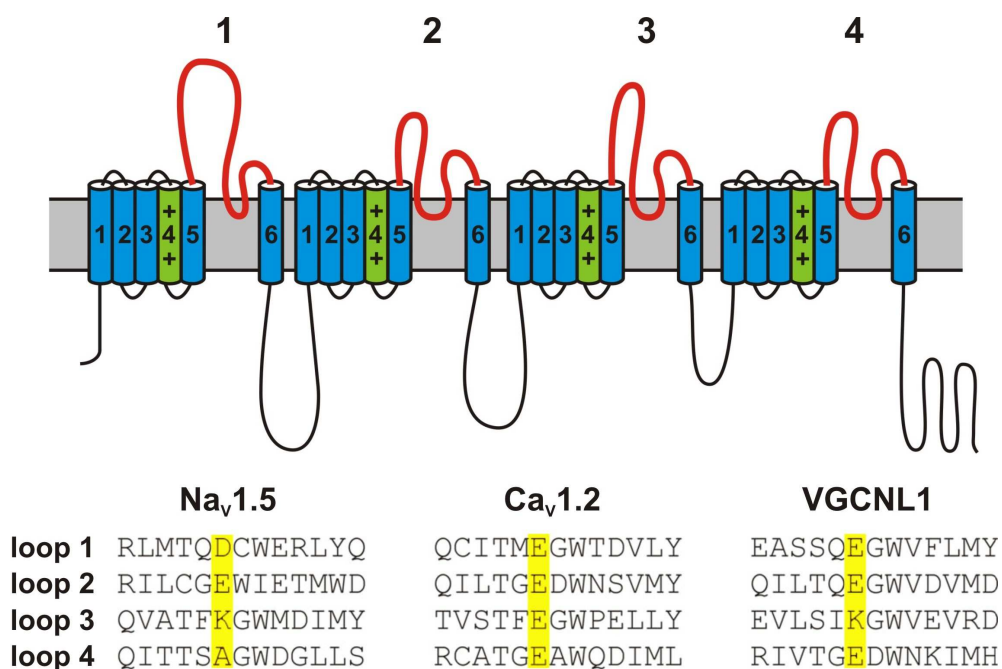


Abb. 4: Vergleich der Selektivitätsfilter in den Porenschleifen dreier Vier-Domänen-Kanäle. Oben ist die allgemeine Membrantopologie dargestellt. Die Porenschleifen sind rot hervorgehoben. Die Sequenzen der Selektivitätsfilter eines Natriumkanals (Na_v1.5), eines Calciumkanals (Ca_v1.2) und die des VGCNL1 sind unten aufgelistet. Die gelb hervorgehoben Aminosäuren bestimmen maßgeblich die Ionenselektivität und sind somit ein Bestimmungsmerkmal dieser Kanäle.

Der Ionenkanal VGCNL1 ist in der Evolution konserviert. So wurden im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* zwei homologe Gene (*nca-1* und *nca-2*) und in der Fliege *Drosophila melanogaster* ein homologes Gen (*narrow abdomen, na*) gefunden (Nash et al. 2002; Lu et al., 2007). Die Funktion dieser Gene konnte über Studien an Knockout-Tieren charakterisiert werden. So zeigten die Fliegen, denen das Gen *na* fehlte, eine veränderte Sensitivität gegenüber Anästhetika, Veränderungen in der Morphologie des Abdomens und

Einschränkungen in der Verarbeitung von Lichtreizen (Krishnan & Nash, 1990; Mir et al., 1997; Nash et al. 2002). Neuerdings wurde auch der Zusammenhang zwischen dem Gen *na* und der Kontrolle des circadianen Rhythmus in der Fliege bewiesen (Lear et al., 2005). Die homologen Gene des Wurms spielen eine Rolle bei der Weiterleitung neuronaler Aktivität von den Zellkörpern zu den Synapsen. Ein Verlust der Gene führt zu einer Reduktion der synaptischen Transmission und zu Einschränkungen in der Beweglichkeit der Würmer (Yeh et al., 2008).

Die VGCNL1-Kanäle von Mensch, Maus und Ratte sind zu 99% identisch (Abb. 5).

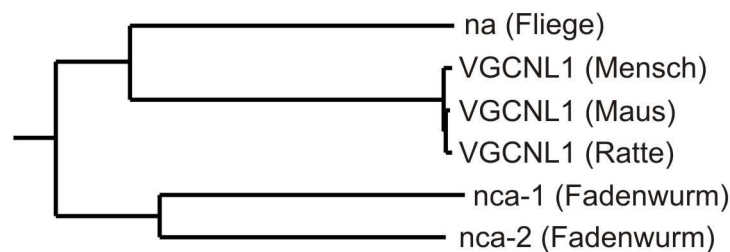


Abb. 5: Phylogenetischer Stammbaum des VGCNL1 dreier Vertebraten (Mensch, Maus und Ratte) sowie der homologen Gene zweier Invertebraten (Fliege und Fadenwurm). Die Länge der waagerechten Linien gibt den Grad der Verwandtschaft an. Je kürzer die Linien sind, desto geringer sind die Sequenzunterschiede zwischen den beiden miteinander verglichenen Sequenzen.

Der VGCNL1 der Ratte wurde bereits 1999 kloniert (Lee et al., 1999). Allerdings konnte der Kanal von Lee et al. nicht funktionell charakterisiert werden. Trotz vieler Versuche den Kanal in unterschiedlichen Expressionssystemen zur Expression zu bringen, gelang es nicht, die von ihm erzeugten Ionenströme mit Patch-Clamp-Messungen zu erfassen.

1.3.2 *Two Pore Loop Cation Channel 1 und 2 (TPCN1 und TPCN2)*

Bisher sind in Vertebraten zwei Vertreter der Zwei-Domänen-Kationenkanäle bekannt, die als TPCN1 und TPCN2 klassifiziert werden. Ein Vergleich der Porenregionen der TPCN-Kanäle mit denen anderer Kanäle zeigt, dass ihre nächsten Verwandten die TRP-Kanäle und CatSper-Kanäle sind (Yu & Catterall, 2004; Clapham & Garbers, 2005; Ramsey et al., 2006).

Die vier Vertreter der CatSper-Kanäle der Vertebraten besitzen sechs Transmembransegmente und leiten spannungsgesteuert Calciumionen. Sie konnten bisher ausschließlich

in Spermien gefunden werden und scheinen für deren Beweglichkeit und somit auch für die männliche Fertilität notwendig zu sein (Ren et al., 2001; Clapham & Garbers, 2005).

Im Genom des Fadenwurms (*C. elegans*) und in dem der Fliege (*D. melanogaster*) sind keine homologen TPCN-Kanäle vorhanden. Andere Invertebraten besitzen hingegen TPCN-Kanäle. So ist z. B. das Genom der Seeanemone (*Nematostella vectensis*) sehr komplex und besitzt ein Repertoire an Genen, das dem der Vertebraten ähnlicher ist als dem der Fliege (Putnam et al., 2007). Es lassen sich u. a. auch vorhergesagte Gene für die TPCN-Kanäle im Genom dieses Tieres, das einen bemerkenswert einfachen Körperbau hat, finden.

Strukturell verwandte Kanäle existieren auch in den Genomen diverser Pflanzen. So ist ein TPCN-Kanal in Moosen, in der Reispflanze (*Oryza sativa*) (Kurusu et al., 2004; Hashimoto et al., 2004), in der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*) (Kadota et al., 2004) und in der am besten genetisch untersuchten Pflanze, dem Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) gefunden worden (Furuichi et al., 2001). In dieser Pflanze konnte der Kanal eindeutig in der Vakuolenmembran fast aller Zelltypen nachgewiesen und auch relativ gut funktionell charakterisiert werden. Elektrophysiologische Messungen an isolierten Vakuolen zeigten, dass der TPCN-Kanal dort einen Ca^{2+} -aktivierten Ca^{2+} -Strom erzeugt, der eine starke Spannungsabhängigkeit zeigt (Abb. 6B), (Peiter et al. 2005; Ranf et al. 2008). Dieser Strom ist schon sehr lange bekannt (Pantoja et al., 1992) und wurde *SV current* (*slow vacuolar current*) genannt, da nur der Strom an sich, jedoch nicht die verantwortlichen Kanäle gefunden werden konnten (Pottosin & Schönknecht, 2007). Vermutlich beruht die elektrophysiologisch nachgewiesene Calcium-Abhängigkeit des SV-Stroms an der Vakuolenmembran auf der Wirkung der EF-Hand-Motive in der Verbindungsregion zwischen den beiden Domänen (Peiter et al., 2005) (Abb. 6A). Diese Sequenzmotive haben die Fähigkeit Ca^{2+} -Ionen zu binden und funktionieren sehr oft als Calcium-Sensoren (Burgoyne & Weiss, 2001).

Erste Einblicke in die physiologische Rolle des TPCN-Kanals in der Vakuole gelangen im Jahre 2004 als entdeckt wurde, dass er mit Wasserstoffperoxid aktiviert und mit Aluminiumionen blockiert werden kann (Kawano et al., 2004, Lin et al., 2005). Weitere Erkenntnisse über die physiologische Relevanz dieses Kanals in Pflanzen konnten gewonnen werden, nachdem das TPCN1-Gen in *Arabidopsis thaliana* ausgeschaltet wurde (Peiter et al., 2005). Studien an dieser Knockout-Pflanze zeigten, dass der TPCN1 zum

einen die Auskeimung von Pflanzensamen reguliert und zum anderen die Öffnung der Stomata beeinflusst. Der Kanal ist also eine Komponente zweier für Pflanzen sehr wichtigen physiologischen Prozesse: Der Reifung von Samen und des Gasaustauschs an den Blättern.

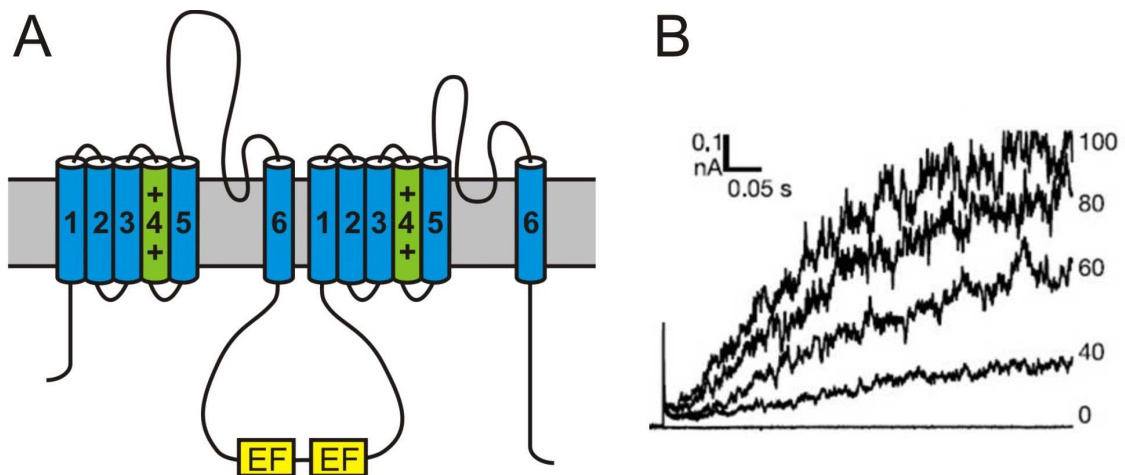


Abb. 6: TPCN-Kanäle erzeugen in den Vakuolen der Pflanzen langsame Vakuolenströme (SV Ströme). **A:** Schematische Darstellung der Membrantopologie des TPCN1-Kanals der Pflanze *Arabidopsis thaliana*. Wichtigster Unterschied zu den TPCN-Kanälen der Vertebraten sind die zwei EF-Hand-Strukturen im Verbindungsstück zwischen den Domänen (gelbe Rechtecke). **B:** Elektrophysiologische Messung des SV-Stroms durch Patch-Clamp-Technik an isolierten Vakuolen. Die Stromspuren zeigen, dass der SV-Kanal spannungsabhängig bei positiven Membranspannungen öffnet. Er ist außerdem abhängig von Calciumionen. SV-Kanäle leiten bevorzugt Kaliumionen, aber auch Calcium- und Natriumionen. (Abb. 6B aus Peiter et al., 2005).

Über die TPCN-Kanäle der Vertebraten ist wesentlich weniger bekannt als über die der Pflanzen. Ishibashi et al. klonierten den TPCN1 aus der Niere der Ratte und wiesen mit Northern Blots die Expression des Gens in diversen Organen nach. Sie zeigten weiterhin, dass der TPCN1 im inneren medullären Sammelrohr der Niere lokalisiert ist (Ishibashi et al., 2000).

Über den TPCN2, der eine Sequenzhomologie zu TPCN1 von etwa 20% hat, sind sogar noch weniger Informationen verfügbar. Eine erfolgreiche Klonierung des TPCN2 ist bis jetzt noch nicht publiziert worden, und so gibt es auch noch keine Informationen über seine Funktion. Lediglich eine Studie über genetische Determinanten der Hautpigmentierung von Europäern wies auf einen Zusammenhang zwischen dem Gen des TPCN2 und der Haarfarbe bzw. Hautpigmentierung hin (Sulem et al., 2008). In einer systematischen Untersuchung der Genome von Isländern wurden im TPCN2-Gen einzelne Basenaustausche (*single nucleotide polymorphisms*) gefunden, die signifikant mit einer

blonden Haarfarbe korrelierten, während Individuen ohne diesen Polymorphismus braune Haare hatten.

Über welchen molekularen Mechanismus der TPCN2 die Pigmentierung beeinflusst bzw. über die generelle physiologische Rolle der TPCN-Kanäle in den Vertebraten kann bisher nur spekuliert werden.

Weiterhin sind die Ergebnisse der Forschung an den TPCN-Kanälen der Pflanzen nur eingeschränkt auf die homologen Kanäle der Vertebraten übertragbar, da erstens tierische Zellen keine Vakuolen besitzen und zweitens bei den TPCN-Kanälen der Tiere keine kanonischen EF-Hand-Strukturen zur Ca^{2+} -Bindung vorhanden sind.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Als erstes Hauptziel sollen die drei Ionenkanäle VGCNL1, TPCN1 und TPCN2 aus der Maus kloniert und molekular charakterisiert werden. Dazu soll mit RT-PCR-Analysen, Northern Blots und *in situ* Hybridisierungen ein Überblick über die Expression der Ionenkanäle in Geweben und Gewebestrukturen gegeben werden.

Zweitens sollen die klonierten TPCN-Kanäle in Zellkulturen heterolog exprimiert und mittels Western Blots und Coimmunpräzipitationen auf Proteinebene analysiert werden. Weiterhin soll mit Expressionsstudien an Zellkulturen und Konfokalmikroskopie bzw. immunocytochemischen Nachweisen die subzelluläre Verteilung der Kanäle untersucht werden.

Ein zweites Hauptziel der Arbeit ist die Herstellung zweier transgener Mauslinien, bei denen das Gen für den TPCN2-Kanal ausgeschaltet ist. Die Gentergetingstrategie ist so geplant, dass beide Mauslinien mit einem einzelnen Targetingkonstrukt hergestellt werden können. Bei der ersten Mauslinie wird der TPCN2 in der Maus global deletiert (Total-Knockout). Die zweite Mauslinie soll einen konditionalen Knockout ermöglichen, bei dem das TPCN2-Gen gezielt zeitlich oder räumlich begrenzt ausgeschaltet werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Roth, Sigma-Aldrich und Biorad in den Qualitäten „pro analysi“ oder „für molekularbiologische Zwecke“ bezogen. Zur Herstellung sämtlicher Lösungen wurde hochreines entionisiertes Wasser (Reinstwassersystem Easypure UV/UF, Werner GmbH) verwendet. Lösungen für sehr sensitive Anwendungen (z. B. PCR, Zellkultur, RNA-Methoden) oder Lösungen, die über längere Zeit gelagert werden sollten, wurden autoklaviert.

2.2 DNA Methoden

Die in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen Arbeiten richten sich größtenteils nach den Vorschriften aus dem Laborhandbuch *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* von Sambrook und Russell (2001).

2.2.1 Amplifikation und Isolation von Plasmiden

Für die zahlreichen Klonierungen von DNA-Fragmenten sowie für die heterologe Expression von Proteinen in Zellkulturen, wurde eine Vielzahl aufgereinigter Plasmide benötigt. Plasmide sind zirkuläre und doppelsträngige DNA-Moleküle, die in Bakterien selbstreplizierend sind und extrachromosomal vererbt werden. In der Molekularbiologie werden in der Regel synthetische Plasmide, sogenannte Vektoren, eingesetzt. Sie bestehen aus einem Replikationsstart, einem Selektionsgen (meist ein Antibiotika-Resistenzgen) und einer Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS), die die Erkennungssequenzen zahlreicher Restriktionsenzyme enthält. Die MCS ermöglicht es, fremde DNA in das Plasmid zu klonieren.

2.2.1.1 Verwendete Plasmide

pBluescript II SK/KS (+) (Stratagene)

Der pBluescript II ist ein bakterieller Klonierungsvektor mit einem Ampicillin-Resistenzgen und einer MCS, die innerhalb der codierenden Sequenz des N-terminalen α -Fragments des β -Galactosidasegens (*lacZ*) liegt. Das *lacZ*-Gen ermöglicht eine

zusätzliche Positivselektion von transformierten Bakterienklonen mit einklonierter Fremd-DNA. Die Bezeichnung SK bzw. KS gibt die Anordnung der Restriktionsschnittstellen in der MCS an. Die Erkennungssequenzen für Sac I und Kpn I sind jeweils an erster bzw. letzter Position. Der pBluescript II Vektor wurde in dieser Arbeit zur Klonierung des Targetingvektors verwendet.

pcDNA3 (Invitrogen)

Dieser Vektor besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion transformierter Bakterienzellen, einen Cytomegalievirus-Promoter (CMV-Promoter) sowie eine Polyadenylierungssequenz. Der CMV-Promoter ermöglicht in eukaryotischen Zellen eine heterologe Expression von Proteinen, deren cDNA-Sequenz in die MCS kloniert wurde. Die Stabilität der transkribierten RNA in den Zellen wird durch ein vom Vektor codiertes Polyadenylierungssignal verbessert. Der pcDNA3 wurde in dieser Arbeit für die heterologe Expression der Ionenkanäle TPCN1, TPCN2 und VGCNL1 in Zellkulturen verwendet.

pEGFP-N1 (Clontech)

Dieser Vektor ist wie pcDNA3 ein eukaryotischer Expressionsvektor. Zusätzlich enthält er ein Kanamycin-Resistenzgen und die Gensequenz des EGFP, das eine synthetische Variante des grün fluoreszierenden Proteins aus der Qualle *Aequorea victoria* ist. Durch gezielte Aminosäure-Austausche erreicht das EGFP eine höhere Expression in Säugetierzellen und eine stärkere Fluoreszenz als das Wildtyp-GFP. Die MCS des Vektors pEGFP-N1 liegt zwischen dem CMV-Promoter und der EGFP-codierenden Sequenz. In die MCS klonierte Gene werden somit als Fusionen zum N-Terminus des EGFP exprimiert sofern kein Stopcodon dazwischen liegt. Dieser Vektor wurde in dieser Arbeit als PCR-Matrize für die Amplifikation der EGFP-Sequenz und die anschließende Herstellung von Ionenkanal-EGFP-Fusionsproteinen verwendet.

pECFP-Mem (Clontech)

Der Vektor pECFP-Mem enthält neben dem Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion noch die Sequenz eines Fusionproteins bestehend aus den N-terminalen 20 Aminosäuren des Neuromodulins und ECFP, einer cyan (blaugrün) fluoreszierenden Variante des EGFP. Das Neuromodulin-Fragment enthält ein Signal für die posttranslationale Palmitoylierung an Cystein-Resten. Über die durch die Palmitoylierung eingeführten hydrophoben Ketten ist das Fusionsprotein an zelluläre Membranen verankert. Die Expression des

Fusionskonstrukts in eukaryotischen Zellen wird über den CMV-Promoter angetrieben. Dieser Vektor wurde für konfokalmikroskopische Experimente eingesetzt.

pPAC4

Hierbei handelt es sich um ein künstliches Chromosom aus dem Bakteriophagen P1 (P1-derived artificial chromosome, PAC), das mit seiner Größe von 19,5 kb mehr als doppelt so groß wie reguläre Plasmide ist und als sog. *low copy plasmid* nur in geringer Kopienzahl in den Bakterienzellen vorliegt (Freggen et al., 2000). Der pPAC4 besitzt ein Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion transformierter Bakterien. pPAC4 Plasmide, die Teile des Mausgenoms enthalten (PAC-Klone), wurden von der Firma Geneservice Ltd. bezogen und als Hilfsmittel für die Erstellung des Targetingvektors benutzt.

pBTK_1

Dieser Vektor wurde von Prof. Dr. Marc Freichel, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, zur Verfügung gestellt. Er basiert auf dem pBluescript II Vektor und enthält in seiner MCS die Gensequenz für die Thymidinkinase (TK) aus dem *Herpes simplex* Virus. Die TK-Sequenz ist flankiert von Schnittstellen für das Restriktionsenzym Not I, über die die TK in andere Vektoren subkloniert werden kann. Die TK in diesem Vektor wurde für den Targetingvektor verwendet.

pm4-06

Dieser Vektor wurde ebenfalls von Prof. Dr. Marc Freichel, Universitätsklinikum des Saarlandes, zur Verfügung gestellt. Er basiert ebenfalls auf dem pBluescript II Vektor und enthält in seiner MCS die Gensequenz für das Neomycin-Resistenzgen, flankiert von zwei FRT-Sequenzen. Da die FRT-Sequenz eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Xba I enthält, kann das Neomycin-Resistenzgen über dieses Enzym in eine Zielsequenz mit einer FRT-Sequenz subkloniert werden. Die Insert-Sequenz kam im Targetingvektor zum Einsatz.

Des Weiteren wurden drei Modifikationen des pBluescript II Vektors selber hergestellt. Das Protokoll zur Herstellung von Klonierungsvektoren mit eigener MCS (Hilfsvektoren) ist in Kapitel 2.2.4 beschrieben.

2.2.1.2 Transformation und Kultivierung von *E. coli*

Die Transformation, d. h. das Einbringen der Plasmid-DNA in die Bakterienzellen, erfolgte mittels Hitzeschock nach dem Protokoll von Sambrook und Russel (2001). Eingesetzt wurden transformationskompetente *E. coli*-Bakterien des Stamms XL1 Blue MRF (Stratagene). Pro Transformationsansatz wurde ein 100 µl Aliquot der kompetenten *E. coli* in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 15 µl eines Ligationsansatzes bzw. 10 ng Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben, vorsichtig vermischt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen erhielten dann einen Hitzeschock, indem sie zunächst exakt 45 sec in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt und dann weitere 2 min auf Eis inkubiert wurden. Dann erfolgte eine Zugabe von 900 µl autoklaviertem Luria-Bertani-Medium mit Glucose (LB+ Medium) und eine Inkubation für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator bei 225 rpm. Schließlich wurden die Bakterien auf Agarplatten mit dem geeigneten Antibiotikum ausgestrichen (Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 30 µg/ml). Die Platten wurden 16-20 h bei 37°C inkubiert und dann bei 4°C gelagert.

Nährmedien für *E. coli*:

<u>LB+ Medium</u>		<u>LB+ Agar</u>	
Pepton	10 g	Agar	15 g
Hefeextrakt	5 g	LB+ Medium	ad 1000 ml
NaCl	5 g		
Glucose	1 g		
H ₂ O	ad 1000 ml		
pH	7,2-7,5		

2.2.1.3 Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse (Miniprep)

Mit einer Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab (Miniprep) können die nach der Transformation gewachsenen Bakterienkolonien überprüft werden. Hierzu wurden einzelne Kolonien in 7 ml LB+ Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin im Schüttelinkubator bei 37°C und 225 rpm für 14-16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (2000 g, 10 min) und eine Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Die

erhaltene Plasmid-DNA wurde anschließend einer Restriktionsanalyse unterzogen, um die Bakterien-Klone, die das korrekte Plasmid enthalten, zu identifizieren.

2.2.1.4 Plasmid-Präparation im Großmaßstab (Maxiprep)

Standardprotokoll:

Um Plasmid-DNA mit einer größeren Ausbeute und Reinheit zu isolieren, wurde ein Bakterienklon in 200 ml LB+ Medium mit dem geeigneten Antibiotikum unter den oben angegebenen Bedingungen (2.2.1.3) inkubiert. Für die Plasmid-Isolation wurde das PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega) nach den Vorschriften des Herstellers eingesetzt. Die Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Sambrook und Russell (2001) in Kombination mit einer Aufreinigung durch Silikat-Membran Säulen. Mittels Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung (durchgeführt von der Firma MWG-Biotech) wurden die präparierten Plasmide überprüft.

Spezialprotokoll für PAC-Klon DNA:

Für die Isolation von PAC-Klon-DNA kam ein alternatives Protokoll zum Einsatz, da mit kommerziell erhältlichen Kits keine zufriedenstellende Ausbeute dieser großen und nur in geringer Kopienzahl in den Bakterien vorliegenden Plasmide erreicht werden konnte. Das Protokoll, das zum Erfolg führte, basiert auf dem Miniprep Protokoll (2.2.1.3), das von Osoegawa et al. (2001) speziell für die Isolation von PAC-Klon-DNA entwickelt und in dieser Arbeit noch leicht modifiziert wurde. Hierzu wurden 25 ml einer Übernachtskultur in einem 50 ml Plastik-Schraubgefäß abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde mit je 4 ml der drei Lösungen für die alkalische Lyse (Sambrook, Russell, 2001) versetzt, wobei zwischen jedem Schritt gut gemischt und für 5 min inkubiert wurde. Anschließend wurde mit 9500 rpm (16.800 g) für 15 min bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Schraubgefäß überführt und es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter den gleichen Bedingungen. Auf diese Weise konnte ein klares Zell-Lysat erhalten werden, aus dem die DNA mit Isopropanol präzipitiert werden konnte. Hierfür wurde der Zentrifugations-Überstand mit 8,4 ml Isopropanol versetzt, gemischt und für 1 h bei -20°C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 10.000 rpm (18.600 g) für 20 min bei RT. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Sediment vorsichtig in 1 ml 70 % Ethanol gelöst in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei maximaler Umdrehungszahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt, das DNA-

Sediment an der Luft getrocknet und vorsichtig, ohne die DNA starken Scherkräften auszusetzen, in 200 µl Wasser gelöst.

Konzentrationsbestimmung:

Die Konzentration gewonnener Plasmide wurde photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf) bei einer Absorption von 260 nm bestimmt, wobei eine optische Dichte (OD_{260}) von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Menge von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA entspricht.

2.2.2 DNA-Auftrennung und –Aufreinigung

Ein entscheidender Aspekt für das Gelingen molekularbiologischer Arbeiten mit DNA ist die Reinheit der Proben. Daher kamen mehrere, jeweils an die Eigenschaften der Probe angepasste, Auftrennungs- und Aufreinigungsprotokolle zum Einsatz.

2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden in der Regel Agarosegele in einer Konzentration von 0,7% bis 2,0% Agarose in TBE eingesetzt (Sambrook, Russell, 2001). Die Auftrennung erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern bei 100-135 V, als Laufpuffer diente TBE. Der verwendete Gel-Ladepuffer (6x Dye) enthält die beiden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, die auch im Gel migrieren, sodass der Verlauf der Elektrophorese verfolgt werden kann. Mit Ethidiumbromid, einem DNA-Interkalator, der nach dem Aufkochen der Agarose in der Konzentration 800 ng/ml zugegeben wurde (Stammlösung 10 mg/ml), konnte die DNA unter UV-Licht (Gel Doc 2000, Biorad) sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich wurde ein DNA-Standard aufgetragen (1 kb DNA Ladder, Invitrogen).

Lösungen:

<u>10x TBE</u>		<u>Gel-Ladepuffer (6x Dye)</u>	
Tris HCl	0,9 M	10x TBE	60%
Borsäure	0,9 M	Ficoll Typ 400	18%
EDTA pH 8,0	20 mM	EDTA pH 8,0	0,12 mM
		Bromphenolblau	0,15%
		Xylencyanol FF	0,15%

2.2.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

DNA-Fragmente kleiner 400 bp wurden meist mittels 5% PAGE-Gelen aufgetrennt, da diese Gele bei kleinen DNA-Fragmenten eine besonders gute Auftrennung erzielen. Es wurden Gele der Dicke 0,75 mm (analytisch) bzw. 1,5 mm (präparativ) mit jeweils 15 cm Laufstrecke verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern für 10 min bei 100 V, dann 30-50 min bei 260 V. Als Laufpuffer diente TBE. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 10 min in 800 ng/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend durch einen Waschschrift mit Wasser überschüssiges Ethidiumbromid abgewaschen.

5% PAGE-Gel

Rotiphorese Gel 40 (Roth)	3,75 ml
(Acrylamid/N,N'-Bisacrylamid = 29:1, 40% wässrige Lösung)	
10x TBE	3 ml
H ₂ O	ad 30 ml
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	20 µl
20% APS (Ammoniumperoxodisulfat)	70 µl

2.2.2.3 Isolierung von DNA aus Gelen

Um DNA aus Agarosegelen zu isolieren wurde ein Kit (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Zur Isolation von DNA aus einem präparativen PAGE-Gel wurde die DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten, mit 300 µl 1x TBE luftblasenfrei in einen Dialyseschlauch (Sigma) eingebracht und die Enden des Schlauchs mit Klammern verschlossen. Unter Kühlung wurde die DNA 2 bis 3 h bei 145 mA in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit 1x TBE aus dem Gel in den Puffer des Schlauchs eluiert, im Anschluss aus dem Schlauch in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Ethanolfällung präzipitiert.

2.2.2.4 DNA-Fällung

Um DNA aus wässrigen Lösungen zu fällen und so eine Aufreinigung bzw. Aufkonzentrierung zu erreichen, wurde die DNA-Lösung mit dem 0,1fachen Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und dem 2,5fachen Volumen 100% Ethanol gemischt. Nach 10 min Inkubation bei -80°C wurde 10 min mit 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge bei

4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierte DNA zum Waschen in 100 µl 70% Ethanol resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min mit 13.000 rpm) und erneutem Verwerfen des Überstands wurde die DNA in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Heraeus) getrocknet und im gewünschten Volumen Wasser gelöst.

2.2.3 Enzymatische Modifikation von Plasmiden

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in die Vektoren, mussten diese zuvor enzymatisch behandelt werden.

2.2.3.1 Restriktionsverdau

Eingesetzt wurden ausschließlich Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs. Enzymmenge, Pufferbedingungen, Temperatur und Inkubationszeit richteten sich nach den Angaben des Herstellers.

2.2.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei einer Ligation (s. u.) zu verhindern, dass sich die beiden Enden eines aufgeschnittenen Vektors wieder verbinden, wurden nach dem Restriktionsverdau die 5'-Phosphatgruppen durch einstündige Inkubation bei 37°C mit einer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP: calf intestinal phosphatase, New England Biolabs) abgespalten. Da die verwendete Ligase 5'-Phosphatgruppen benötigt, können diese nach der Behandlung mit CIP nur noch vom Insert, das in den Vektor ligiert werden soll, zur Verfügung gestellt werden.

2.2.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die eingesetzte T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) ist ein Enzym, das unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxylgruppe katalysiert. Sie ermöglicht somit eine Verknüpfung von linearisierten DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden. Auf diese Weise konnten DNA-Fragmente in aufgeschnittene Vektoren eingebaut werden, sodass modifizierte zyklische Plasmide entstehen. Für die Ligationsreaktion wurden die beiden zuvor mit Restriktionsenzymen behandelten DNA-Fragmente in einem 15µl-Ansatz zusammenpipettiert, wobei immer ein zwei- bis mehrfacher Überschuss an Insert-DNA

gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt wurde. Die weiteren Bestandteile der Reaktion (ATP-haltiger Ligase-Puffer, T4 Ligase) wurden gemäß den Vorgaben des Herstellers zugegeben. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C oder 2-3 h bei 25°C im Wasserbad.

2.2.4 Herstellung eines Klonierungsvektors mit eigener MCS

Für komplexe Klonierungsexperimente wie die Herstellung eines Targetingvektors wurden Vektoren mit einer genau festgelegten Reihenfolge von Restriktionsschnittstellen in der MCS benötigt und mit dem folgenden Protokoll selber hergestellt. Als Ausgangsmaterial diente der Vektor pBluescript II. Über die zwei Restriktionsschnittstellen für das Enzym BssHII wurde die gesamte MCS aus dem Vektor ausgeschnitten. Zur Erstellung alternativer MCS-Sequenzen wurden von den Firmen MWG und Biomers.net Oligodesoxynucleotide mit 5'-Phosphatresten synthetisiert. Bei der Planung dieser Sequenzen war folgendes zu beachten: Erstens wurden pro MCS zwei Oligodesoxynucleotide benötigt, eines mit der Sequenz in Vorwärts-Richtung, eines mit der rückwärts-komplementären Sequenz, sodass sie sich zu einem Doppelstrang zusammenlagern konnten. Zweitens mussten an den Enden Überhänge vorhanden sein, die nach der Zusammenlagerung der Nucleotide eine Ligation in den mit BssHII geschnittenen Vektor ermöglichen. Dies war jeweils am 5'-Ende die Sequenz CGCGC und am 3'-Ende ein einzelnes G.

Vor Gebrauch wurden die Oligodesoxynucleotide auf 1 pmol/µl verdünnt und dann je 50 µl der zueinander komplementären Oligodesoxynucleotide in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Ansatz wurde zunächst 5 min bei 75°C denaturiert und im Anschluss in einem 50 ml Becherglas, gefüllt mit 75°C warmem Wasser, langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch diese langsame, gleichmäßige Abkühlungsphase konnten sich die komplementären DNA-Stränge zusammenlagern. Diese wurden in einem Standard Ligationsansatz mit T4-DNA-Ligase (siehe 2.2.3.3) in den BssH II geschnittenen pBluescript II ligiert.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Die PCR-Primer ermöglichen außerdem das Anfügen von kurzen Sequenzabschnitte sowohl an das 5'- als auch an das 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Stücks. Auf diese Weise

konnten z. B. gezielt zusätzliche Restriktionsschnittstellen für Klonierungen angefügt werden. Standardmäßig eingesetzt wurde die Phusion-Polymerase (Finnzymes) mit den mitgelieferten Reaktionspuffern (HF-Puffer für Standard-PCR, GC-Puffer für GC-reiche Templates). Bei dieser Polymerase handelt es sich um eine synthetische Modifikation der Pfu-Polymerase aus dem extremophilen Organismus *Pyrococcus furiosus*. Diese Polymerase zeichnet sich einerseits durch eine Exonukleaseaktivität aus, kann also Synthesefehler korrigieren, und hat außerdem eine deutlich höhere Synthesegeschwindigkeit als die ursprüngliche Pfu-Polymerase. Die PCR-Reaktionen wurden nach der Vorschrift des Herstellers angesetzt. Die Synthese der PCR-Primer wurde von der Firma MWG-Biotech durchgeführt. Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Thermocycler T1 (Biometra).

Reaktionsbedingungen der PCR:

Initiale Denaturierung	98°C	5 min	
Denaturierung	98°C	1 min	↓ 20 – 40 Zyklen
Primeranlagerung	52-60°C	30 sec	
Elongation	72°C	variiert	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Folgende Parameter müssen bei einer PCR-Reaktion individuell angepasst werden: Die Primeranlagerungstemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der beiden eingesetzten Primer. Die Phusion-Polymerase hat eine Synthesegeschwindigkeit von 30 bis 60 Basen pro Sekunde, daher ist die Elongationszeit abhängig von der Länge des Amplifikationsprodukts. Die Zahl der Zyklen richtet sich nach der gewünschten Menge an synthetisierter DNA.

Eine spezielle Form der PCR stellte die Mutagenese-PCR mit dem Quikchange[®] II site-directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene dar. Damit konnten durch den Einsatz entsprechender Primer Mutationen und Deletionen an Plasmid-DNA vorgenommen werden. Die ursprüngliche Template-DNA wurde im Anschluss an die PCR abgebaut, sodass nur die mutierten Produkte übrig blieben. Die Quikchange-PCR-Reaktionen wurden nach der Herstellervorschrift angesetzt und weiterverarbeitet. Für die Transformation wurden kompetente *E. coli* des Stamms XL1 Blue MRF (Stratagene) nach der unter 2.2.1.2 beschriebenen Vorschrift eingesetzt.

2.2.6 Gewinnung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen

Die Kultivierung embryonaler Stammzellen und die anschließende Isolation der genomischen DNA für Southern Blots wurde nach dem Protokoll von Howlett (1999) durchgeführt. Hierbei wurden Stammzellklone, die nach einem Gen-Targeting resistent gegenüber G-418 waren, einzeln in 24-Well-Platten kultiviert. Von jedem Klon wurde ein Teil weggefroren, der Rest weiter kultiviert für die Isolation genomischer DNA. Wenn sich das Medium gelb verfärbte, war eine hinreichende Zelldichte erreicht. Dann wurde das Medium durch ES-Zell-Lysepuffer ersetzt und mindestens weitere 8 h bei 37°C inkubiert. Wenn nicht alle Klone auf einer 24-Well-Platte die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit aufwiesen, wurden die ersten Klone so lange im Lysepuffer gelassen, bis die letzten auch eine hinreichende Wuchsdichte erreicht hatten. Die längere Inkubation mit dem Puffer führt zu keinerlei Einbußen an Menge oder Qualität der gewonnenen DNA. Wenn alle Klone lysiert waren, wurden pro Well 0,5 ml Isopropanol dazugegeben und es wurde über Nacht bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Dann konnte die mit bloßem Auge als weißes Netzwerk von Fäden sichtbare DNA mit einer Pipettenspitze aufgewickelt und in ein Röhrchen mit 200 µl H₂O überführt werden.

2.2.7 Southern Blot

Der Southern Blot ist eine Technik, die es erlaubt, definierte DNA-Fragmente in einem Fragmentgemisch nachzuweisen. Hierzu wird zunächst DNA (meist genomische DNA) mit Restriktionsenzymen gespalten, die erhaltenen Bruchstücke mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt, mit einer Salzsäurelösung depuriniert und unter alkalischen Bedingungen zu Einzelsträngen dissoziiert. Anschließend wird die DNA durch Diffusion vom Gel auf eine Membran transferiert, wodurch auf der Membran ein Abdruck des DNA-Bandenmusters im Gel entsteht (sog. Blotting). Die auf die Membran übertragenen DNA-Fragmente werden mit radioaktiv markierten DNA-Sonden inkubiert. Dabei hybridisiert die Sonde spezifisch mit DNA-Fragmenten, deren Sequenz komplementär zur Sonde ist. Nach dem Abwaschen von unspezifisch gebundenen Sondenmolekülen und Autoradiographie können definierte DNA-Fragmente detektiert werden. So kann mit dem Southern Blot gezielt die Präsenz und das Spaltungsmuster einer bestimmten DNA-Sequenz untersucht werden.

Lösungen:

20x SSC		Church-Puffer	
NaCl	350,6 g	BSA	5 g
Na ₃ Citrat-dihydrat	176,4 g	H ₂ O	50 ml
H ₂ O	ad 2 l	1 M Na ₂ HPO ₄	193,5 ml
		1 M NaH ₂ PO ₄	56,5 ml
		20% SDS	175 ml
ssDNA 10 mg/ml		0,5 M EDTA pH 8	1 ml
Salmon Sperm DNA	500 mg	ssDNA (vor Gebrauch	5 ml
(Invitrogen)		5 min 100 °C)	
H ₂ O	ad 50 ml	H ₂ O	ad 500 ml

Gelelektrophorese:

PAC-Klon-DNA oder genomische DNA aus ES-Zellen wurde über Nacht mit Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend auf einem 0,6% Agarosegel aufgetrennt. Als Größenstandard diente der 1 kb DNA-Ladder (Invitrogen). Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht mit einem zusätzlichen Lineal fotografiert, um später die Länge der detektierten DNA-Fragmente ermitteln zu können. Anschließend wurde das Gel für 10 min in 0,2 M HCl in einer Metallwanne geschwenkt. Dies führt zu partieller Depurinierung und dadurch zu Strangbrüchen, was den Transfer großer Fragmente auf die Membran erleichtert. Zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge wurde das Gel für 30 min in 0,5 M Natronlauge und 1,5 M Natriumchlorid geschwenkt und anschließend 30 min in 0,5 M Tris pH 8 und 3 M NaCl neutralisiert.

Blottingverfahren:

Nach der Elektrophorese und der Nachbehandlung des Gels erfolgte der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Genescreen Plus, Perkin Elmer, Kat. Nr. NEF988) für ca. 16 h über Nacht. Dazu wurde die Membran auf das Gel aufgelegt und durch einen mit 10x SSC getränkten Schwamm unter dem Gel und einen Stapel Saugpapier auf dem Gel Kapillarkräfte erzeugt, die die DNA auf die Membran übertragen. Der detaillierte Aufbau ist in Abb. 7 dargestellt.

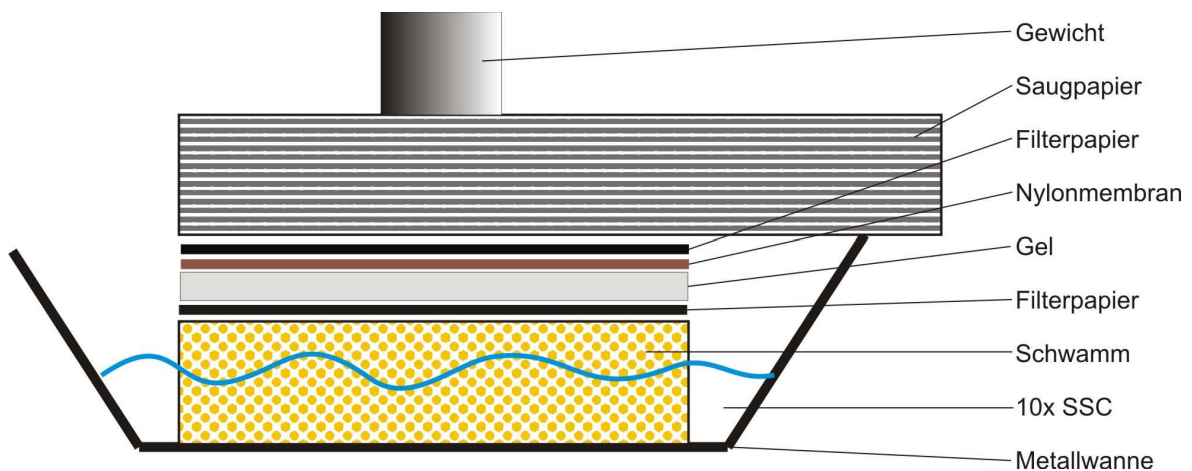


Abb. 7: Schematische Darstellung eines Kapillarblots zum Transfer der DNA vom Gel auf die Nylonmembran.

Am folgenden Tag wurde die Membran zur kovalenten Bindung der DNA 2 min mit UV-Licht bestrahlt (CI-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP, Strahlungsenergie 120 mJ/cm^2) und anschließend 2 h bei 80°C in einem Trockenschrank getrocknet (Vacutherm VT 6025, Heraeus).

Herstellung einer ^{32}P -markierten Gensonde:

Die Matrizen für die Sonden wurden mittels PCR (2.2.5) gewonnen. Die Sondenherstellung erfolgte mit dem „Random Primed Labeling Kit“ von Roche (Kat. Nr. 1004760) nach leicht abgewandelten Angaben des Herstellers. Hierbei wurde ein Gemisch aus Hexanucleotiden zur denaturierten Matrizen-DNA gegeben. Komplementäre Hexanucleotide hybridisierten mit der Matrize und bildeten auf diese Weise einen Primer von dem ausgehend der komplementäre Strang unter Einbau von $\alpha^{32}\text{P}$ -markiertem dCTP durch das Klenow-Enzym synthetisiert wurde. Das radioaktive $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP wurde von GE Healthcare bzw. Hartmann Analytic bezogen.

Reaktionsansatz:

Vorbereitung der Matrizen-DNA

DNA	ca. 200 ng
H ₂ O	ad 14 μl
10 min Denaturierung bei 97°C	

Reaktionsansatz für die Sondensynthese

dATP, dGTP, dTTP-Mix (je 0,5 mM)	6 μ l
Reaktions-Mix (Hexanucleotide + Puffer)	4 μ l
α^{32} P-dCTP (800 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	14 μ l
Klenow-Enzym	2 μ l
45-60 min Inkubation bei 37°C	

Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz über eine Säule (Nick-Column, GE Healthcare) aufgereinigt. Dabei werden die synthetisierten Sondenmoleküle über das Prinzip der Größenausschluss-Chromatographie von den ungebundenen Nucleotiden getrennt. Hierzu wurde der radioaktive Ansatz auf eine zuvor mit TE-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Sofort danach wurden 360 μ l TE-Puffer auf die Säule gegeben und der Durchlauf in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Dieser Schritt wurde einmal mit 400 ml und weitere viermal mit 250 μ l TE-Puffer wiederholt und alle Fraktionen einzeln aufgefangen sowie im Szintillationszähler (LS 6500, Beckman) vermessen. Aufgrund ihres Molekulargewichts lag die radioaktive Sonde in der Regel in der zweiten Fraktion vor. Diese wurde bis zur Verwendung im Bleitiegel bei -20°C gelagert, um eine radioaktivitätsbedingte Hydrolyse der DNA zu verhindern.

Prähybridisierung und Hybridisierung:

Die folgenden Inkubationsschritte wurden in verschließbaren Glasröhren und einem beheizbaren Hybridisierungsöfen (Compact Line OV4, Biometra), der eine Vorrichtung zum Befestigen und gleichmäßigen Rotieren der Glasröhren enthielt, durchgeführt. Die Membran wurde zunächst für 2 bis 4 h in 15 ml Church-Puffer bei 60°C prähybridisiert, um mögliche freie Bindungsstellen für die Sonde abzusättigen und störende radioaktive Signale im Hintergrund zu minimieren. Die radioaktive Sonde mit einer Aktivität von ca. 1×10^7 cpm wurde für 10 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend erfolgte die Hybridisierung der Membran mit der Sonde in 10 ml Church-Puffer bei 60°C über Nacht. Überschüssige und unspezifisch gebundene Sondenmoleküle wurden durch folgende Waschschrte von der Membran gewaschen:

30 min	2x SSC / 0,1 % SDS	62°C ,
30 min	0,4x SSC / 0,1 % SDS	68°C ,
30 min	0,4x SSC / 0,1 % SDS	70°C .

Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingepackt und in einer Filmkassette auf eine Phospho-Imager-Platte (BAS-MP 2040S, Fujifilm) aufgelegt. Diese wurde nach einigen Stunden bis mehreren Tagen mit einem Lesegerät (BAS-1500, Fujifilm) gescannt und die Signale mittels zugehöriger Software ausgelesen. Als Alternative zur Phospho-Imager-Platte wurde bei einigen Experimenten ein radioaktivitäts-sensitiver Film (Hyperfilm MP, Amersham) aufgelegt und nach mehreren Tagen mit einer Entwicklerrmaschine (Curix 60, Agfa) und Fixier- und Entwicklungs-Lösungen (T-Matic, Adefo) entwickelt.

2.3 RNA Methoden

Bei der Arbeit mit RNA wurde immer darauf geachtet, Kontaminationen mit RNasen zu verhindern. RNasen sind fast überall vorkommende extrem stabile RNA-abbauende Enzyme, die sogar durch Autoklavieren bei 121°C nicht völlig zerstört werden.

Wasser wurde durch die Zugabe von 0,01% DEPC und ca. 16 h Einwirkzeit RNase-frei gemacht. Zweimaliges Autoklavieren im Anschluss zersetzte das DEPC. Um Glaswaren von RNasen zu befreien, wurden diese für 2 h bei 200°C gebacken. Die Arbeitsfläche und sonstige Geräte wurden mit RNaseAWAY (M&P Molecular Bio Products) behandelt.

2.3.1 Isolation von mRNA aus Mausgewebe

Für die Isolation von mRNA aus Gewebestücken der Maus kamen zwei unterschiedliche Protokolle zum Einsatz. Für die direkte Gewinnung von mRNA aus kleinen Gewebestücken in geringerer Ausbeute, die z. B. für RT-PCR ausreichend ist, wurde das Dynabeads[®] Oligo(dT)₂₅ System (Invitrogen) eingesetzt. Dabei handelt es sich um kleine magnetische Kügelchen mit einer Oligo-dT-Sequenz (mehrere Tyrosin-Desoxynucleotide in Folge), an die die mRNA mit ihrem Poly-A-Schwanz bindet. Mit einem Magnet können die Kügelchen samt mRNA an die Gefäßwand gezogen und aufgereinigt werden. Dieses System ermöglicht die Isolation von mRNA mit relativ geringem Zeitaufwand. Wurden größere Mengen an mRNA benötigt, z. B. für Northern Blots, dann wurde zunächst die Gesamt-RNA aus dem Gewebe isoliert und diese im Anschluss über eine Säule weiter aufgereinigt. Die Säule bindet die mRNA spezifisch über eine Säulenmatrix aus Cellulose mit oligo-dT-Sequenzen.

2.3.1.1 Isolation der mRNA im kleinen Maßstab mittels magnetischer Separation

Die entnommenen Gewebestücke wurden nach der Präparation sofort in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigen Stickstoff gegeben. Pro Reaktionsansatz wurden Gewebestücke bis zu einem Gewicht von 50 mg und 50 µl der Dynabeads-Suspension eingesetzt. Vor der Verwendung wurden die Dynabeads einmal gewaschen, um die ethanolhaltige Lösung, in der sie gelagert sind, zu entfernen. Hierzu wurden die 50 µl der Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und dieses in ein magnetisches Gestell (Magnetic Particle Concentrator Dynal MPC-S, Invitrogen) gestellt. Der Magnet zog die magnetischen Kügelchen an die Gefäßwand, erkennbar am Klarwerden der Suspension, sodass die Flüssigkeit komplett abpipettiert werden konnte, während die Dynabeads im Gefäß blieben. Anschließend wurden die Dynabeads in 200 µl Lyse/Bindepuffer resuspendiert.

Zum eingefrorenen Gewebestück wurde 1 ml Lyse/Bindepuffer gegeben und das Gewebe mit einem Stab-Dispergiergerät (Ultra-Turrax, IKA-Werke GmbH) gründlich zerkleinert. Anschließend wurde das homogenisierte Gewebe 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und währenddessen das Gefäß mit den gewaschenen Dynabeads wieder in den Magnet-Ständer gestellt. So konnte nach der Zentrifugation der Überstand der Dynabeads verworfen und stattdessen der Zentrifugationsüberstand in das Gefäß mit den Dynabeads überführt werden. Dann wurde 3-5 min bei RT gemischt, das Gefäß für 2 min in den Magnet-Ständer gestellt und der Überstand verworfen. Es schlossen sich zwei Waschschriffe mit 500 µl Waschpuffer und zwei weitere Waschschriffe mit 500 µl DEPC-Wasser an. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Dynabeads in 20 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

Das Gefäß kam anschließend zum Ablösen der mRNA für 2 min in einen 80°C Heizblock, wurde kurz zentrifugiert und dann sofort in den Magnet-Ständer gestellt um eine erneute Bindung der gelösten mRNA an die Kügelchen zu unterbinden. Der Überstand mit der mRNA wurde in ein neues Gefäß überführt. Die Dynabeads konnten in 200 µl Lyse/Bindepuffer resuspendiert und so bei 4°C gelagert werden. Sie konnten bis zu viermal wiederverwendet werden, wobei sie aber immer nur für den gleichen Gewebetyp eingesetzt wurden, um Kreuzkontaminationen von mRNA zu vermeiden.

Lösungen:

<u>Lyse/Bindepuffer</u>		<u>Waschpuffer</u>	
Tris HCl, pH 7,5	0,1 M	Tris HCl, pH 7,5	10 mM
LiCl	0,5 M	LiCl	0,15 M
EDTA pH 8,0	10 mM	EDTA pH 8,0	1 mM

2.3.1.2 Isolation der mRNA im größeren Maßstab in zwei Schritten

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus größeren Gewebestücken wurde ein mittelgroßer Mörser auf Trockeneis gelegt und zur weiteren Abkühlung mit flüssigem Stickstoff befüllt. Das isolierte Gewebe wurde im Mörser unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben und zusammen mit dem Stickstoff in ein vorgekühltes, vorher abgewogenes 15 ml Röhrchen gegossen. Nachdem der Stickstoff komplett verdampft war, wurde das Röhrchen erneut gewogen und 1 ml peqGOLD TriFast (Peqlab) pro 100 mg Gewebe zugegeben. Bei TriFast handelt es sich um eine Lösung zur RNA-Extraktion, die u. a. Phenol für die Nucleinsäure-Extraktion und das chaotrope Salz Guanidinisothiocyanat zur Inaktivierung von RNasen enthält. Das zerriebene Gewebe in der TriFast-Lösung wurde 1 min lang mit einem Stab-Dispergiergerät homogenisiert, für 2 min mit einem Vortex-Mixer weiter vermischt und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Ein nachfolgender Inkubationsschritt für 5 min bei RT diente dem Auflösen von Nucleoproteinkomplexen. Um die Proteine von den Nucleinsäuren zu trennen wurde das Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion angewendet, indem 200 µl Chloroform pro 1 ml TriFast zugegeben und das Ganze gründlich mit dem Vortexer vermischt wurde. Nach 2 bis 3 min Inkubation bei RT wurde 15 min mit 11.200 g bei 4°C zentrifugiert. Hierbei bildete sich im Röhrchen unten eine rötliche Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase, in der sich die Proteine befanden und oben eine farblose wässrige Phase, die die RNA enthielt. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Fällung der RNA mit Isopropanol, bei der 0,6 ml Isopropanol pro ml des ursprünglich eingesetzten Volumens an TriFast zugegeben, gemischt und 10 min bei RT inkubiert wurden. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt mit 13.000 rpm für 10 min bei 4°C in der Tischzentrifuge an, der nach Entfernen des Überstandes und Zugabe von 1 ml 70% Ethanol wiederholt wurde. Die sedimentierte RNA wurde 5 bis 10 min an der Luft stehen gelassen, damit Ethanolreste verdampfen konnten und im gewünschten Volumen DEPC-

Wasser resuspendiert, bevor das Sediment komplett austrocknete. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde die Absorption bei 260 nm photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf) gemessen.

Zur Gewinnung der mRNA wurde Oligo(dT)-Cellulose (New England Biolabs, Kat. Nr. S1401S) nach der Herstellervorschrift eingesetzt. Die Säulen zur Aufnahme der Oligo(dT)-Cellulose stammten von Biorad (Poly-Prep[®] Chromatography Columns, Kat. Nr. 731-1550). Nach der Elution von der Säule wurde die mRNA mit 3 M Natriumacetat pH 5,2 und Ethanol gefällt (siehe 2.2.2.4) und im gewünschten Volumen Wasser resuspendiert.

2.3.2 Synthese von cDNA aus mRNA

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem SuperScript[™] III-One-Step RT-PCR System (Invitrogen, Kat. Nr. 12574-035) nach der Vorschrift des Herstellers. Bei diesem System werden die Reverse Transkriptase und die DNA-Polymerase zusammen zugegeben. Die cDNA-Synthese und anschließende Amplifikation der cDNA laufen nacheinander ab, ohne dass weitere Reagenzien zugegeben werden müssen. Die Polymerase ist anfangs durch Antikörper blockiert, die nach der cDNA-Synthese durch Erhitzen denaturiert werden, so dass die Polymerase aktiv werden kann. Eingesetzt wurden immer genspezifische Primer, die sich an verschiedenen Exons anlagerten, um eine Amplifikation genomischer DNA auszuschließen. Der cDNA-Synthese-Schritt bestand aus einer 30-minütigen Inkubation bei 50°C. Die Primeranlagerungstemperatur und Synthesezeit richteten sich nach den eingesetzten Primern bzw. der Länge des Produkts.

2.3.3 Northern Blot

Mit der Methode des Northern Blottings können wie bei der RT-PCR Gen-Transkripte in Gewebeproben detektiert werden. Sie ermöglicht darüberhinaus eine bessere Quantifizierung der mRNA im Gewebe und eine Kontrolle der mRNA-Länge. Der spezifische Nachweis einer bestimmten mRNA aus Gewebeextrakten erfolgte hier wie beim Southern Blot mit radioaktiv-markierten Sonden.

Elektrophorese:

Die RNA wurde in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, wobei für Gel und Kammer Phosphat-Puffer statt dem für DNA-Gele üblichen TBE-Puffer verwendet wurde. Die RNA wurde vor der Gelauftragung denaturiert, indem zur RNA-Probe das dreifache Volumen an

Denaturierungslösung gegeben und das Ganze 1 h bei 50°C inkubiert wurde. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 50-80 V angelegt und der Puffer in der Gelkammer öfter gemischt, um einen durch die Spannung erzeugten pH-Gradienten zu unterbinden. Als Größenstandard diente der 1 kb RNA-Ladder (Invitrogen). Das Gel konnte anschließend, im Gegensatz zum Southern Blot, ohne weitere Vorbehandlung direkt gebロットet werden.

Blottingverfahren:

Die Übertragung der Nucleinsäuren vom Gel auf die Membran sowie die Nachbehandlung der Membran geschahen nach dem gleichen Prinzip wie beim Southern Blot (siehe Abb. 7, Blotaufbau), mit dem einzigen Unterschied, dass sich 20x SSC statt 10x SSC in der Wanne befand.

Prähybridisierung und Hybridisierung:

Die Membran wurde mit 10 ml Prähybridisierungslösung für eine Stunde bei 65°C und anschließend mit frischer Lösung eine weitere Stunde bei 42°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Hybridisierung mit der radioaktiven Sonde in der Hybridisierungslösung über Nacht. Die Herstellung der Sonde wurde in analoger Weise zur Sondenherstellung für Southern Blots durchgeführt (siehe 2.2.7).

Am nächsten Tag schlossen sich die folgenden Waschschrirte an:

2x 5 min	2x SSC / 0,1 % SDS	RT,
2x 5 min	1x SSC / 0,1 % SDS	RT,
2x 15 min	0,1x SSC / 0,1 % SDS	42°C.

Die weitere Vorgehensweise zur Detektion der hybridisierten Sonde unterschied sich nicht von der des Southern Blots (siehe 2.2.7).

Lösungen:

siehe auch: Lösungen für Southern Blot, 2.2.7

1x Phosphatpuffer		Denaturierungslösung	
1 M NaH ₂ PO ₄	3,9 ml	40% Glyoxal	100 µl
1 M Na ₂ HPO ₄	6,1 ml	100 % DMSO	400 µl
H ₂ O	ad 1000 ml	1x Phosphatpuffer	10 µl

5X PE-Lösung		Prähybridisierungslösung	
Na ₄ P ₂ O ₇ x 10 H ₂ O	0,5 g	5x PE	2 ml
Polyvinylpyrrolidon (MG 4x10 ⁴)	1 g	20x SSC	2,5 ml
Ficoll (MG 4x10 ⁵)	1 g	100% Formamid	5 ml
SDS	5 g	ssDNA (10 mg/ml)	150 µl
1 M Tris-HCl, pH 7,5	25 ml	H ₂ O	350 ml
0,5 M EDTA	5 ml		
H ₂ O	ad 75 ml	Hybridisierungslösung	
65°C Wasserbad zum lösen		5x PE	0,8 ml
5% BSA in H ₂ O	20 ml	20x SSC	1 ml
schwenken, lösen		100% Formamid	2 ml
H ₂ O	ad 100 ml	ssDNA (10 mg/ml)	60 µl
65°C für 15 min, abkühlen lassen, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C		Sonde	5x10 ⁶ cpm/ml

2.4 Arbeiten mit Zellkulturen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Sicherheitswerkbank (HERAsafe HS18, Heraeus) durchgeführt, um Kontaminationen der Zellkulturen mit Fremdkeimen zu unterbinden. Innerhalb der Sicherheitswerkbank wurde auf steriles Arbeiten geachtet und Handschuhe, Pipetten, Flaschen etc. vor dem Einbringen in die Werkbank mit 80% Ethanol behandelt. Die verwendeten Medien und Lösungen wurden vor der Verwendung auf 37°C erwärmt.

2.4.1 Kultivierte Zelllinien

Zur heterologen Expression von Ionenkanälen kamen in dieser Arbeit zwei Zelllinien zum Einsatz: Erstens die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 (ATTC Nr. CRL-1573). Diese Zelllinie wurde durch die Transfektion mit dem humanen Adenovirus Typ 5 immortalisiert (Graham et al. 1977). Zweitens die Fibroblasten-Zelllinie COS-7 (ATTC Nr. CRL-1651), die 1981 aus Nierengewebe von Grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen und stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transformiert wurde (Gluzman, 1981). Die Kultur beider Zelllinien erfolgte in 75 cm²-Kulturflaschen im Inkubator bei 37°C und 10% CO₂ in DMEM-Medium (Dulbecco's modifiziertes Eagle

Medium, Gibco), das 1000 mg/l D-Glucose enthielt und dem noch 10% FBS (Biochrom) sowie 100 Units/ml Penicillin G (Biochrom) und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom) zugesetzt wurden. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert, wenn sie etwa 80% Konfluenz erreicht hatten.

2.4.2 Transfektion und Vorbereitung der Zellen für die Mikroskopie

Am ersten Tag wurde eine 24-Loch-Zellkulturplatte (Sarstedt) mit Polylysin-beschichteten Deckgläsern bestückt, nachmittags pro Loch der Platte ca. 20.000 Zellen in 1 ml Medium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen nachmittags mit Fugene 6 (Roche) nach der Vorschrift des Herstellers mit 0,2 bis 0,6 µg Plasmid-DNA pro Loch transfiziert. Das Reagenz formt Komplexe aus Liposomen und Plasmid-DNA, die mit der Zellmembran verschmelzen und über Endocytose in die Zelle gelangen (Lipofektion, Felgner et al. 1987). Nach weiteren 1 bis 2 Tagen wurden die Zellen für die Mikroskopie fixiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann 10 min mit 100 µl 4% PFA pro Loch bei RT inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS, dann wurden die Deckgläser mit den Zellen auf einen Objektträger gelegt und mit Permafluor (Sigma) versiegelt.

Lösungen:

10x PBS		4% PFA in PBS	
NaCl	80 g	Paraformaldehyd	6 g
KCl	2 g	H ₂ O	ca. 130 ml
Na ₂ HPO ₄	6,2 g	5 M NaOH	2 Tropfen
KH ₂ PO ₄	2 g	bei 60°C lösen	
H ₂ O	ad 1000 ml	10x PBS	15 ml
pH 7,4 einstellen		H ₂ O	ad 150 ml
		bei 4°C oder -20°C lagern	

2.4.3 Immuncytochemie

Die Immuncytochemie dient der Detektion von Proteinen in fixierten Zellen. Hierbei binden spezifische Antikörper in der Zelle an ihr Zielprotein und werden wiederum von Sekundärantikörpern detektiert, an die fluoreszierende Substanzen gebunden sind.

Die Zellen wurden vorbereitet und transfiziert, wie unter 2.4.2 beschrieben. Die folgenden Inkubationsschritte wurden alle in der 24-Loch-Platte mit 300 µl Volumen durchgeführt, die Waschschrte mit je 1000 µl. Zuerst wurde das Medium von den Zellen abgezogen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 4% PFA in PBS fixiert.

Sollten die Membranen der Zellen angefärbt werden, dann wurde vor der Fixierung noch ein 10minütiger Inkubationsschritt mit TRITC-WGA (Sigma) in einer 1:100-Verdünnung in PBS durchgeführt, gefolgt von zwei Waschschrten mit PBS. Nach der Fixierung wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen.

Danach konnten alle Schritte auf einem Schütteltisch unter leichtem Schwenken durchgeführt werden. Die Zellen wurden zum Permeabilisieren 20 min mit 0,3 % Triton X-100 in PBS inkubiert und dann dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Blockierung mit 10% Ziegenserum (Normal Goat Serum, NGS) in PBS für 30 min. Danach konnten die Zellen mit dem Primärantikörper in 5% NGS für 3 h inkubiert werden (zur eingesetzten Konzentration der Antikörper siehe 6.3 im Anhang). Die überschüssigen, ungebundenen Antikörper wurden durch viermaliges Waschen mit PBS für je 5 min entfernt, bevor die Zweitantikörper in 2% NGS für 1 h dazugegeben wurden. Mit drei fünfminütigen Waschschrten mit PBS wurden überschüssige Antikörper gewegewaschen.

Sollten die Zellkerne gefärbt werden, folgte eine Färbung mit 0,4 µg/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes) für 5 min und zwei weitere Waschschrte mit PBS. Zum Schluss wurden die Zellen mit Permafluor versiegelt wie unter 2.4.2 beschrieben.

Färbung der Mitochondrien:

Für die Färbung der Mitochondrien wurde der rot fluoreszierende Farbstoff MitoTracker[®] Red CMX-Ros der Firma Invitrogen eingesetzt. Er wurde in einer Verdünnung von 1:1500 direkt ins Medium zu den Zellen gegeben und diese dann 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend konnten die Zellen fixiert werden und sogar Immuncytochemie durchgeführt werden, ohne dass der Farbstoff ausgewaschen wurde.

2.4.4 Konfokalmikroskopie

Konfokalmikroskopische Aufnahmen transfizierter und fixierter Zellen wurden mit dem Laser-Konfokalmikroskop LSM 510 Meta (Zeiss) erstellt. Vier verschiedene Laser kamen zum Einsatz (Tab. 1).

Fluorophor	Laser	Wellenlänge
Hoechst 33342, AMCA	Argon UV	351 nm
ECFP	Argon 2	458 nm
EGFP, Cy2	Argon 2	488 nm
Cy3, TRITC, CMX-Ros	He/Ne 1	543 nm
Cy5	He/Ne 2	633 nm

Tab. 1: Verwendete Laser und Wellenlängen zur Fluoreszenzanregung am LSM 510 Meta Konfokal-mikroskop

2.4.5 Transfektion und Lyse der Zellen für die Proteingewinnung

Sollten größere Mengen an rekombinanten Proteinen, z. B. für Western Blot Analysen, gewonnen werden, kam die Calciumphosphat-Transfektions-Methode zum Einsatz. (Graham et al., 1973, Ishiura et al., 1982) Bei dieser transienten Transfektionsmethode bildet sich ein Calciumphosphat-DNA-Präzipitat, das die Zellen durch Endocytose aufnehmen.

Transfektion:

Die Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen mit 10 ml DMEM-Medium bis zum Erreichen von etwa 70% Konfluenz kultiviert. Für die Transfektion wurden bis zu 30 µg DNA mit Wasser auf 400 µl verdünnt, zunächst 100 µl 2,5 M CaCl₂ und dann 500 µl 2x BBS tropfenweise zugegeben. Dieser Ansatz wurde zweimal invertiert und 12 min bei RT stehengelassen, bevor er tropfenweise, gleichmäßig über die Platte verteilt, auf die Zellen pipettiert wurde. Die Zellen kamen für ca. 16 h in einen Inkubator mit 37°C und Begasung mit 3% CO₂, dann wurde das Medium erneuert und die Zellen unter normalen Bedingungen 2 bis 3 Tage bis zur Synthese der rekombinanten Proteine weiterkultiviert.

2x BBS (BES-buffered solution)

BES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure)	0,533 g
NaCl	0,818 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,013 g
H ₂ O	ad 50 ml
pH 6,95 mit NaOH einstellen	

Lyse:

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde pro 10 cm Schale 1 ml Zell-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (Complete[®] EDTA-free, Roche) zugegeben und die Schale 15 min bei 4°C geschüttelt. Dann konnten die abgelösten Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren weiter lysiert werden. Durch einen 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C wurden die Zelltrümmer sedimentiert, sodass der Überstand mit den gelösten Proteine in ein neues Gefäß überführt werden konnte.

<u>Zell-Lysepuffer</u>	
Tris-HCl pH7,4	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	50 mM

2.5 Arbeiten mit Proteinen

Der Umgang mit Proteinen fand – wenn möglich – unter gekühlten Bedingungen (4°C) statt, um Denaturierungen und Degradation der Proteine zu vermeiden.

2.5.1 Isolation von Membranproteinen aus Gewebe

Frisch präpariertes Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert. Anschließend wurde es auf Eis mit 2 ml Gewebe-Lysepuffer in einem Glas/Teflonhomogenisierer (Potter S, B. Braun Biotech International) durch 10 Hübe bei 900 rpm homogenisiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 5000 g und 4°C wurde der Überstand abgenommen, mit Lysepuffer auf 6,8 ml aufgefüllt, austariert und in einer Ultrazentrifuge (Optima LE-80K, Beckman Coulter, Rotor 45-Ti) für 45 min bei 30.000 rpm zentrifugiert. Die sedimentierten Mikrosomen mit den Membranproteinen wurden in 300 µl Lysepuffer resuspendiert.

<u>Gewebe-Lysepuffer</u>	
MOPS	3,15 g
Saccharose	77 g
0,5 M EDTA, pH 7,4	6 ml
H ₂ O	ad 250 ml

2.5.2 Quantifizierung von Proteinen

Die Proteinmenge im Lysat wurde über die Bradford-Methode mit Coomassie-Farbstoff bestimmt. Durch die Bindung des Farbstoffs an Proteine in saurer Lösung verschiebt sich dessen Absorption von 465 nm zu 595 nm. Die Stärke der Absorption eines Coomassie-Protein-Gemischs bei 595 nm ist daher proportional zur vermessenen Proteinmenge.

Je 5 µl einer Proteinlösung wurden mit 95 µl 0,15 M NaCl gemischt und nach Zugabe von 1 ml Coomassie-Lösung und zwei Minuten Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm vermessen (Eppendorf BioPhotometer). Das Photometer gleicht die Proteinproben mit einer Standardreihe ab, die mit 1 bis 30 µg Protein (BSA) in je 100 µl 0,15 M NaCl erstellt worden war.

Coomassie-Lösung

Coomassie brilliant blue G250	50 mg
Ethanol 95%	25 ml
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄) 85%	50 ml
H ₂ O	ad 500 ml

2.5.3 Deglycosylierung von Proteinen

Glycosylierungen an Asparagin-Resten von Proteinen wurde mit den Enzymen Endoglycosidase H und N-Glycosidase F (PNGase F) (beide New England Biolabs) nach der Vorschrift des Herstellers entfernt. Es wurden pro Reaktion 10 µg Gesamtprotein eingesetzt. Als optimal hatte sich eine Denaturierung der Proteine für 10 min bei 45°C und eine Inkubation mit den Enzymen bei 37°C für 1 h herausgestellt.

2.5.4 Herstellung spezifischer polyklonaler Antikörper

Es wurden polyklonale Antikörper gegen TPCN1 und TPCN2 hergestellt. Als Antigen diente jeweils ein Peptid bestehend aus 17-20 Aminosäuren des C-Terminus der Proteine (Sequenzen siehe Anhang). Zusätzlich wurde N-terminal ein Cystein für die spätere Aufreinigung der Antikörper angehängt. Die Peptide wurden von der Firma NMI-Peptides (Reutlingen) synthetisiert. Die Immunisierung zweier Kaninchen mit den Peptiden und Gewinnung der Antiseren wurde von der Firma Gramsch (Schwabhausen) durchgeführt.

Zur Aufreinigung der Antikörper aus dem Serum wurden die gleichen Peptide wie bei der Immunisierung eingesetzt. Sie wurden an eine Gelmatrix gekoppelt, sodass das Serum über

eine entsprechend präparierte Säule aufgereinigt werden konnte. Die Säule (Econo-Column Chromatography Column, BioRad) wurde mit 2 ml Gel-Suspension (SulfoLink Coupling Gel, Pierce) befüllt, was etwa 1 ml Gelbettvolumen entsprach. Anschließend wurde das Gel mit dem vierfachen Gelbettvolumen Kopplungspuffer gewaschen und die Säule kurz vor dem Trockenlaufen unten verschlossen. Von dem Peptidpulver wurden 1 bis 1,2 mg in 1 ml Kopplungspuffer gelöst und zusammen mit einem weiteren ml Kopplungspuffer auf die Säule gegeben. Nachdem das Totvolumen (1 ml) durchgetropft war, wurde die Säule verschlossen und zur Bindung des Peptids an die Gelmatrix 15 min rotiert. Danach wurde die Säule 30 min aufrecht stehengelassen, damit sich das Gel wieder gleichmäßig absetzen konnte. Nach dem Durchtropfen der überschüssigen Flüssigkeit wurde die Säule mit dem vierfachen Gelbettvolumen Kopplungspuffer gewaschen, indem sie über einen Schlauch an eine Peristaltikpumpe angeschlossen und der Puffer mit 10 Tropfen pro Minute durchgepumpt wurde. Die freien Bindungsstellen der Gelmatrix wurden durch Zugabe des vierfachen Gelbettvolumens Kopplungspuffer mit 50 mM Cystein und Rotation für 15 min abgesättigt. Nach weiteren 30 min zum Absetzen des Gels wurde die Säule erst mit dem fünffachen Volumen Kopplungspuffer, dann mit fünffachem Volumen 1 M NaCl gespült. Sollte die Säule gelagert werden, wurde sie mit PBS mit 0,1% NaN₃ gewaschen und verschlossen bei 4°C aufgehoben.

Zur Aufreinigung des Serums wurde die Säule zunächst mit dem fünffachen Volumen Ladepuffer gewaschen. Dann wurden 10 ml Serum in 40 ml Ladepuffer verdünnt und mit einer Durchtropfgeschwindigkeit von 10 Tropfen pro Minute einmal über die Säule laufen gelassen. Danach wurde mit 15 ml Ladepuffer gespült. In 10 Reaktionsgefäßen wurde 1 M Tris-Base zur Neutralisation vorgelegt, wobei das benötigte Volumen an Tris-Base zum Erreichen von pH 8 nach der Zugabe von Elutionspuffer ad 1 ml ausgetestet werden musste. Anschließend wurden die gebundenen Antikörper mit Elutionspuffer eluiert und in 800 µl Fraktionen in den Reaktionsgefäßen aufgefangen. Der Gehalt an eluiertem Immunglobulin G (IgG) wurde photometrisch über die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Hierbei gilt die Regel, dass eine Extinktion von 1,35 etwa 1 mg IgG entspricht. Die Fraktionen mit einer IgG-Konzentration > 0,1 mg/ml wurden zusammengefügt, erneut photometrisch vermessen und in Aliquots bei -80°C weggefroren.

2.5.5 Co-Immunpräzipitation

Protein-Protein-Bindungen wurden mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen. Bei dieser Methode wird ein bestimmtes Protein mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert, aufgereinigt und über Western Blot auf eine Membran transferiert. Wenn sich dann auf dem Blot ein anderes Protein nachweisen lässt, da es mit dem ersten Protein zusammen präzipitiert ist, ist das ein *in vitro* Nachweis einer Interaktion beider Proteine.

Für einen Ansatz wurden 40 µl einer 1:1-Suspension aus Protein-A-Sepharose (Amersham) und Zell-Lysepuffer (2.4.5) zu 1000 µg Zell-Lysat (2.4.5) in einem PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Des Weiteren kam ein spezifisch gegen ein Protein im Lysat gerichteter Antikörper dazu, es wurde mit Zell-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (Complete EDTA-free, Roche) auf 500 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Protein-Antikörper-Sepharose-Präzipitate durch einen dreiminütigen Zentrifugationsschritt bei 2600 g sedimentiert. Der Überstand mit den nicht präzipitierten Proteinen wurde abgenommen und verworfen. Es schlossen sich drei Waschschrte an, bei denen das Sediment jeweils in Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 20% (v/v) Glycerin) resuspendiert, wieder sedimentiert und der Überstand entfernt wurde. Die nötige Stringenz der Waschschrte musste empirisch bestimmt werden und wurde durch Zugabe variabler Konzentrationen an Kaliumchlorid in den Waschpuffer eingestellt. Um die Effizienz der Waschschrte bestimmen zu können, wurden immer parallel Kontrollreaktionen mit dem zu testenden Lysat und einem anderen Antikörper, der gegen ein anderes Protein gerichtet war, angesetzt. Außerdem wurde immer eine Kontrollreaktion mit Lysat untransfizierter Zellen angesetzt.

2.5.6 SDS-PAGE und Western Blot

SDS-Polyacrylamid-Gele ermöglichen die Auftrennung denaturierter Proteingemische nach deren Größe und unabhängig von der Ladung. Während der Elektrophorese umgeben die Sulfatgruppen der SDS-Moleküle mit ihrer negativen Ladung die denaturierten Proteine, überkompensieren so die Eigenladung der Proteine und bewirken eine Wanderung der Proteine im elektrischen Feld. Die Denaturierung erfolgte durch eine fünfminütige Inkubation bei 97°C mit Lämmli Puffer mit DTT. Die Proteine wurde in einer Elektrophoreseapparatur (Protean 3, Biorad) bei 100 V aufgetrennt, wobei der Verlauf

der Elektrophorese mit einem vorgefärbten Proteinstandard (Kaleidoscope Protein Ladder, Biorad) kontrolliert wurde. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Proteine mit einem Tank-Blot-System (Mini Trans Blot, Biorad) elektrophoretisch vom Gel auf eine mit Methanol äquilibrierte PVDF-Membran (Immobilon, Porengröße 0,45 μm , Millipore) übertragen. Der Transferpuffer im Tank-Blot bestand aus einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer mit 20% Methanol. Beim Transfer wurde ein Strom von 300 mA für eine Zeit, die abhängig von der Proteingröße war, angelegt. Mittlere Proteine (70-100 kDa) wurden für 1,25 h geblottet, kleinere Proteine entsprechend kürzer. Die Membran wurde anschließend für 1 h bei 37°C getrocknet, danach kurz in Methanol äquilibriert und für 1 h bei RT in Blockierungslösung, bestehend aus 5% Milchpulver in TBST (TBS + 0,1% (v/v) Tween-20), geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in Blockierungslösung inkubiert. Die optimale Verdünnung eines Antikörpers muss immer empirisch ermittelt werden. Im Falle des aufgereinigten TPCN2-spezifischen Antikörpers hat sich eine 1:1000-Verdünnung als optimal erwiesen. Nach zwei fünfminütigen Waschschritten mit TBST wurde die Membran mit dem entsprechenden peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit TBST für je 5 min konnte das nachzuweisende Protein durch den spezifischen Primärantikörper, an dem der Sekundärantikörper gebunden war, mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham) durch Chemilumineszenz detektiert werden. Die Filme zur Detektion der Chemilumineszenz (Hyperfilm ECL, Amersham) wurden mit einer Filmentwicklermaschine (Curix 60, Agfa) entwickelt.

Lösungen:

4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8

Tris-Base	18,2 g
SDS	0,4 g
H ₂ O	ad 100 ml
pH 8,8 mit HCl einstellen	

4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8

Tris-Base	3,02 g
SDS	0,2 g
H ₂ O	ad 50 ml
pH 6,8 mit HCl einstellen	

6x Lämmli-Probenpuffer + DTT

4xTris-Cl/SDS, pH 6,8	7 ml
Glycerol	3 ml
SDS	1 g
DTT	0,93 g
Bromphenolblau	1,2 mg
H ₂ O	ad 10 ml

aliquotieren und bei -20°C lagern

10x Elektrophoresepuffer

Tris-Base	30,2 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O	ad 1000 ml

7% Trenngel

Rotiphorese Gel 30 (Roth)	3,5 ml
4xTris-Cl/SDS, pH 8,8	3,75 ml
H ₂ O	7,75 ml
TEMED	10 µl
APS 20%	30 µl

Sammelgel

Rotiphorese Gel 30 (Roth)	0,65 ml
4xTris-Cl/SDS, pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	3,05 ml
TEMED	5 µl
APS 20%	25 µl

10x TBS, pH 8

Tris-Base	12,1 g
NaCl	80,23 g
H ₂ O	ad 1000 ml

TBST

Tris-Base	30,2 g
Glycin	144 g

2.6 Histologische Methoden

Die in dieser Arbeit durchgeführten histologischen Methoden dienen dem Ziel, die mRNA untersuchter Gene mittels *in situ* Hybridisierung in Gewebeschnitten nachzuweisen.

2.6.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Um Gefrierschnitte für histologische Färbungen und *in situ* Hybridisierungen herzustellen, mussten frisch präparierte Gewebe vorbehandelt werden, indem sie für 2 Minuten in -20°C kaltes 2-Methylbutan getaucht und dann 5 weitere Minuten auf Trockeneis gelegt wurden, damit das 2-Methylbutan verdampfen kann. Durch diese Behandlung wurden Gewebeschäden beim Einfrieren minimiert. Die 16 µm dünnen Gewebeschnitte wurden an einem Kryotom der Firma Microm (HM500) bei -20°C angefertigt und auf Superfrost Plus Objektträger (Thermo Scientific) aufgeschmolzen.

2.6.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Gewebeschnitte wurden zum einen mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt, um die Schnittqualität (Erhaltung der Gewebestruktur) beurteilen zu können. Zum anderen wurden Schnitte nach der *in situ* Hybridisierung und Behandlung mit der Filmemulsion (s.u.) gefärbt, um die Hybridisierungssignale den Gewebestrukturen zuordnen zu können. Hämatoxylin färbt die Zellkerne blau, Eosin färbt das Bindegewebe rosa.

Die Schnitte wurden mit Wasser befeuchtet und dann 5-30 Sekunden in Hämatoxylinlösung (Merck) getaucht. Zum Abwaschen von überschüssigem Farbstoff wurden die Schnitte 10 min unter fließendem Wasser gespült. Es folgte die Inkubation in der Eosin-Lösung für 10 min, danach wurde für 3 min mit Wasser gespült. Dann wurden die Schnitte schrittweise mit Ethanol dehydriert, indem sie zuerst 3 min in 70%, dann 3 min in 95% und dann 5 min in 100% Ethanol getauscht wurden. Zum Schluss wurden sie noch zweimal für je 10 min mit Xylol behandelt und mit DPX (Fluka) und einem Deckglas luftdicht versiegelt.

2.6.3 *In situ* Hybridisierung

Da mit der *in situ* Hybridisierung mRNA im Gewebe detektiert werden soll, ist bis zum Hybridisierungsschritt auf RNase-freies Arbeiten zu achten. In den Schritten nach der Hybridisierung ist kein RNase-freies Arbeiten mehr nötig, da die bei der Hybridisierung entstehenden RNA-Doppelstränge resistent gegenüber RNasen sind. Es wird sogar gezielt eine RNase eingesetzt, um die nicht hybridisierte RNA zu entfernen.

***In vitro* Transkription:**

In vitro Transkriptionen wurden zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden für die *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Als Template diente eine cDNA-Sequenz im pBluescript II SK-Vektor. Dieser Vektor besitzt die Promotersequenzen für die T7- und T3-Polymerase. Die Vektorkonstrukte wurden vor der *in vitro* Transkription linearisiert, sodass die RNA-Synthese nur über den Bereich des Inserts und nicht über die Vektorsequenz abläuft.

Reaktionsansatz:**In vitro Transkription**

linearisiertes DNA Template	1 µg
10x Transkriptionspuffer (Roche)	1,5 µl
RNase-Inhibitor (Roche)	0,75 µl
0,75 M DTT	0,25 µl
ATP, GTP, CTP-Mix (je 5mM)	1,5 µl
H ₂ O	ad 7 µl
³⁵ S-UTP (1250 Ci/ml)	7 µl
T7- oder T3-Polymerase (Roche)	1 µl
mischen, 1 h Inkubation bei 37°C	

Abbau des DNA-Templates, RNA-Isolation

DNase I (Roche)	0,5 µl
mischen, 10 min Inkubation bei 37°C	4 µl
TE-Puffer	35 µl
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	50 µl
Vortexen, 30 sec Zentrifugation mit max. rpm	
Obere Phase in frisches Röhrchen	

Zum Abtrennen der nicht eingebauten radioaktiven Nucleotide wurde eine Gelchromatographie mit einer Säule (Nick-Column, GE Healthcare) – wie unter 2.2.7 beschrieben – eingesetzt. 2 µl jeder Fraktion wurden in ein Szintillationsröhrchen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint, Roth) gegeben und im Messgerät vermessen. Die zweite Fraktion enthielt die Sonde, die nach folgender Formel in Hybridisierungspuffer verdünnt wurde:

$$\frac{\text{Gemessene cpm}/\mu\text{l} \times 400 \text{ ml} \times 1,4 \text{ (Korrekturfaktor)}}{10 \times 10^6 \text{ cpm}/\mu\text{l}} = \text{ml } 1,25 \times \text{Hybridisierungspuffer}$$

Weiterhin wurde tRNA in 0,5 mg/ml Endkonzentration zugegeben und soviel TE-Puffer, dass eine einfache Konzentration des Hybridisierungspuffers erreicht wurde. Die so verdünnte Sonde wurde aliquotiert und bei –20°C gelagert.

Vorbehandlung der Schnitte:

Bei allen Schritten bis zur Prähybridisierung wurden die Objektträger mit Gewebeschnitten in Glasgestellen gelagert. Für die Inkubationsschritte wurde ein Gestell in eine Glaswanne getaucht, die mit 150 ml der entsprechenden Lösung gefüllt war.

Nachdem die Schnitte angefertigt waren, wurden sie 20 min unter Vakuum getrocknet und dann für 20 min in einer wässrigen 4% PFA-Lösung fixiert. Zur Entfernung des PFA schlossen sich zwei fünfminütigen Waschschrte mit 0,5x SSC an. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Proteinase K-Lösung behandelt. Die Konzentration des Enzyms und die Inkubationszeit richteten sich nach dem Gewebe und wurden empirisch ermittelt. Standardmäßig wurden 7µg/ml Proteinase K für 15 min eingesetzt, bei sehr empfindlichen Geweben mit filigraner Struktur weniger (z.B. 3,5 µg/ml für 5 min). Ein zehminütiger Waschschrte mit 0,5x SSC entfernte die Proteinase K. Dann fand eine Acetylierung des Gewebes statt, um den Hintergrund bei der *in situ* Hybridisierung zu minimieren. Hierfür wurde zunächst drei Minuten in TEA-Lösung inkubiert, dann zehn Minuten in frischer TEA-Lösung, die 0,25% Essigsäureanhydrid enthält. Durch zwei Waschschrte mit 2xSSC zu je 2 min wurde überschüssiges Essigsäureanhydrid abgewaschen. Dann wurden die Schnitte schrittweise in einer Ethanolreihe dehydriert. Begonnen wurde mit 50% Ethanol, dann folgten 70%, 95% und 100% Ethanol für jeweils 5 min. Schließlich wurden die Schnitte 5 min luftgetrocknet und 30 min unter Vakuum getrocknet. In diesem Stadium konnten die Schnitte bei -80°C in Präparatekästen mit Silicagel als Trocknungsmittel gelagert werden.

Prähybridisierung, Hybridisierung:

Die Inkubation mit den radioaktiven Sonden fand in einer luftdichten Plexiglas-Inkubationskammer statt. Zunächst wurde die Kammer mit Papiertüchern ausgelegt und mit Boxpuffer getränkt. Die Objektträger mit den dehydrierten Schnitten wurden auf einem Gestell in der Kammer ausgebreitet und 70 µl Prähybridisierungslösung direkt auf jeden Schnitt gegeben. So wurden die Schnitte 1-3 h bei 42°C im Hybridisierungsöfen prähybridisiert. Anschließend wurde die verdünnte Sonde 10 min bei 65°C im Wasserbad erwärmt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Dann kam DTT in einer Endkonzentration von 75 mM dazu. Von der Sonde kamen dann 70 µl auf jeden Schnitt zu den bereits vorhandenen 70 µl der Prähybridisierung (bei älteren Sonden mit weniger

Aktivität nach Bedarf mehr Volumen). Die Hybridisierung fand über Nacht bei 55°C im Hybridisierungssofen statt.

Die Waschschritte nach der Hybridisierung wurden wieder mit den Glasgestellen und den Glaswannen durchgeführt. Ab diesem Punkt musste nicht mehr RNase-frei gearbeitet werden. Zunächst wurde einmal kurz und dann zweimal für je 10 min mit 2xSSC+DTT+EDTA gewaschen. Dann wurde nicht-hybridisierte RNA durch Inkubation mit 20 µg/ml RNaseA für 30 min abgebaut. Es folgten zwei zehnmütige Waschschritte mit 2xSSC+DTT+EDTA und zwei einstündige Inkubationsschritte mit 0,1xSSC+DTT+EDTA bei 70°C im Wasserbad. Bei empfindlichem Gewebe musste die Inkubationszeit reduziert werden (bis zu 2x 10 min). Anschließend wurde dreimal 10 min mit 0,5x SSC gewaschen. Es folgte die Ethanol-Dehydrierungsreihe in gleicher Weise wie am Vortag, mit dem einzigen Unterschied, dass den ersten drei Lösungen 3,5 g Ammoniumacetat pro 150 ml zugesetzt wurden. Nach Vakuumtrocknung konnte ein Film (Kodak Bio max) aufgelegt und nach ca. 7 Tagen entwickelt werden.

Lösungen:

5x Protease-Puffer

1 M Tris, pH 8,0	250 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	25 ml
H ₂ O	ad 225 ml

Proteinase K-Lösung (7 µg/ml)

Prot. K (20mg/ml)(Roche)	53 µl
5x Protease-Puffer	30 ml
H ₂ O	ad 120 ml
kurz vor Gebrauch herstellen	

0,1 M TEA, pH 8,0

TEA-HCl	5,6 g
5 M NaOH	3,1 ml
H ₂ O	ad 300 ml
pH mit Streifen kontrollieren	

0,25% Essigsäureanhydrid-Lösung

Essigsäureanhydrid	375 µl
0,1 M TEA, pH 8,0	150 ml
sofort mit Rührfisch gut mischen, direkt auf die Objektträger geben	

50x Denhardt

Ficoll (MG 4×10^5)	1 g
Polyvinylpyrrolidon (MG 4×10^4)	1 g
BSA	1 g
H ₂ O	ad 100 ml
sterilfiltrieren	
Aliquots bei -20°C lagern	

50% Dextran

Dextransulfat (MG 5×10^5)	12,5 g
4xTris-Cl/SDS, pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	ca. 12 ml
3 h bei 65°C lösen	
H ₂ O	ad 25 μl
bei -20°C lagern	

1,25x Hybridisierungspuffer

1 M Tris, pH 8,0	625 μl
5 M NaCl	3,75 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	125 μl
50x Denhardt	1,25 ml
50% Dextran	12,5 ml
Formamid (deion.)	31,25 ml
H ₂ O	500 μl
Aliquots zu 10 ml bei -20°C lagern	

TE-Puffer, pH 8,0

1 M Tris, pH 8,0	5 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	1 ml
H ₂ O	ad 500 ml

Formamid (deionisiert)

AG 501-X8 Resin (BioRad)	5 g
Formamid	45 ml
bei 4°C lagern	

Prähybridisierungslösung

1,25x Hybridisierungspuffer	8 Teile
1 M DTT	1 Teil
H ₂ O	1 Teil

5x RNase-Puffer

5 M NaCl	200 ml
1 M Tris, pH 8,0	20 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	4 ml
H ₂ O	ad 400 ml

Behandlung hybridisierter Schnitte mit Filmemulsion:

Alle Arbeiten mit der Filmemulsion wurden in einer Dunkelkammer bei absoluter Dunkelheit durchgeführt. Zuerst wurde eine Flasche Filmemulsion (HypercoatTM LM-1, GE Healthcare, Art. Nr. RPN40) 15 min bei 50°C im Wasserbad aufgewärmt. Dann konnte die verflüssigte Emulsion in ein schmales Tauchgefäß für Objektträger geschüttet werden. Das Tauchgefäß blieb die ganze Zeit über im Wasserbad, um ein Abkühlen und Verfestigen der Emulsion zu verhindern. Die Objektträger wurden einzeln für ca. 2 min in

die Emulsion getaucht, dann zum Vortrocknen auf eine mit Eis gekühlte Metallplatte gelegt und schließlich zum kompletten Austrocknen in Glasträger einsortiert und über Nacht in einem Exsiccator, dessen Boden mit Kieselgel ausgelegt war, gelagert.

Anschließend kamen die Objektträger in einen Präparatekasten mit Kieselgel als Trocknungsmittel. Der Kasten wurde gut mit Alufolie umwickelt und in einen lichtundurchlässigen Beutel gesteckt, um eine Entwicklung der Emulsion durch Lichteinfall auszuschließen. So wurden die Schnitte bei 4°C gelagert. Die benötigte Zeit für die radioaktivitätsbedingte Entwicklung der Emulsion kann grob ermittelt werden wenn zuvor ein Film auf die Schnitte aufgelegt wurde: Ein Tag Filmentwicklung entspricht demnach einer Woche Emulsionsentwicklung.

Nach Ablauf dieser Zeit, bzw. höchstens nach vier Wochen, wurden die Objektträger 1 h auf Raumtemperatur gebracht, die Entwicklerlösung frisch hergestellt (Entwicklerpulver Kodak D19, nach Herstellervorschrift gelöst) und alle benötigten Lösungen (Entwickler, Stopplösung, Fixierer) auf ca. 14°C abgekühlt. In der Dunkelkammer wurden die Objektträger in Glasträger einsortiert. Die Träger wurden anschließend erst 2 min in eine Wanne mit Entwicklerlösung, dann 30 Sekunden in die Stopplösung, dann 5 min in den Fixierer getaucht und schließlich gründlich mit destilliertem Wasser abgespült. Die entwickelten und fixierten Schnitte blieben in destilliertem Wasser bis zur HE Färbung (siehe 2.6.2).

Lösungen:

Stopplösung

Glycerin	1% (v/v)
Essigsäure	1% (v/v)
H ₂ O	ad 500 ml

Fixierer

Natriumthiosulfat	30% (w/v)
H ₂ O	ad 500 ml

3 Ergebnisse

3.1 Gewebsspezifische Nachweise der Ionenkanäle VGCNL1, TPCN1 und TPCN2 mittels RT-PCR

Die Gewebeverteilung der drei Ionenkanäle VGCNL1, TPCN1 und TPCN2 wurde zunächst mittels RT-PCR-Reaktionen mit mRNA aus unterschiedlichen Geweben analysiert. Hierfür wurden jeweils mehrere hundert Basenpaare lange Abschnitte der mRNA amplifiziert. Von besonderem Interesse war die Fragestellung in welchen Regionen des Herzens die Kanal-Gene exprimiert werden. Weiterhin wurde die Genexpression in Hirn und Niere der Maus untersucht, da die homologen TPCN1- und VGCNL1-Kanäle aus der Niere bzw. dem Hirn der Ratte kloniert wurden (Lee et al., 1999, Ishibashi et al., 2000). Die Amplifikationsprodukte wurden mittels PAGE-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid und UV-Licht sichtbar gemacht.

Die mRNA des VGCNL1 war im gesamten Herzen sowie im Hirn und in geringer Intensität auch in der Niere nachweisbar (Abb. 8). Die mRNA des TPCN1 konnte hingegen im Herzen ausschließlich im Sinusknoten nachgewiesen werden. Sie war ebenfalls im Hirn und in der Niere vorhanden (Abb. 9). Bei der Untersuchung des TPCN2 zeigte sich, dass das Transkript des Kanals im gesamten Herzen mit Ausnahme des Vorhofs sowie im Hirn und in der Niere vorkam (Abb. 9).

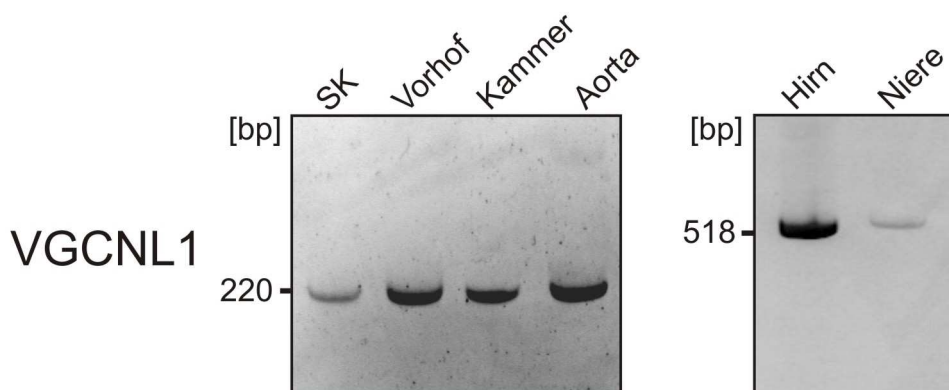


Abb. 8: RT-PCR-Experimente zum Nachweis der mRNA des VGCNL1. Die mRNA stammte aus unterschiedlichen Regionen des Herzens (SK: Sinusknoten) sowie aus Hirn und Niere der Maus. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass sie mehrere Exons umspannen, um eine Amplifikation genomischer DNA auszuschließen. Die cDNA wurde mit 40 Zyklen und optimal an die Primerpaare angepasste Bedingungen amplifiziert. Parallel durchgeführte Kontroll-Reaktionen mit Wasser statt cDNA führten zu keinerlei Amplifikation (nicht gezeigt). Je 5% der RT-PCR wurden auf das Gel aufgetragen.

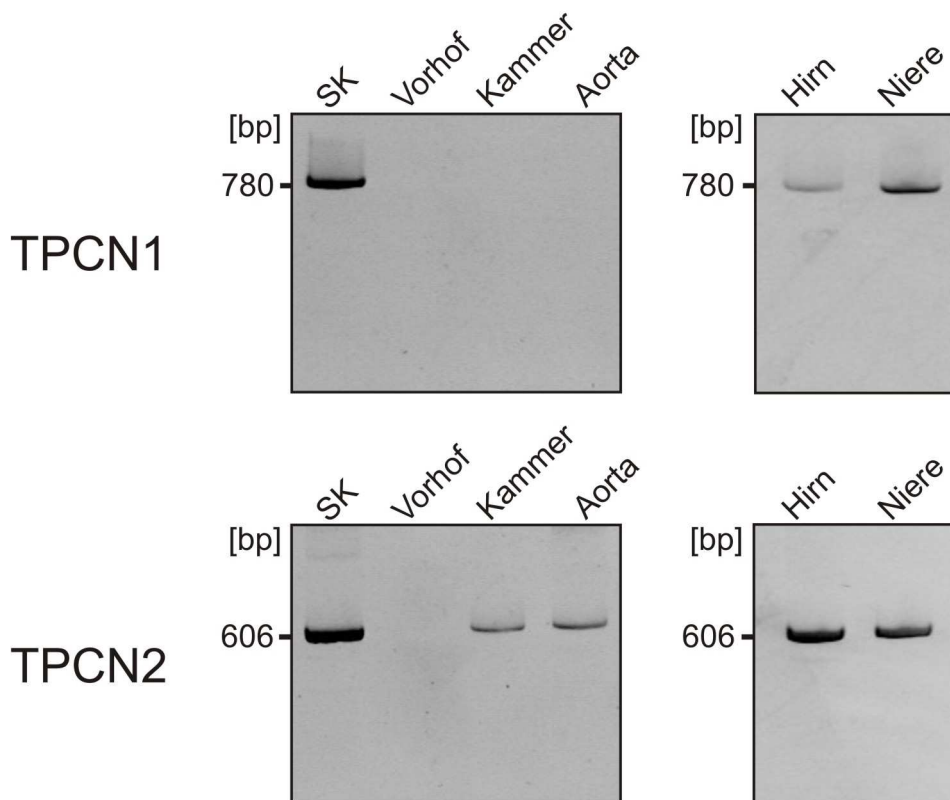


Abb. 9: RT-PCR-Experimente zum Nachweis der mRNA der Ionenkanäle TPCN1 und TPCN2. Die mRNA stammte aus unterschiedlichen Regionen des Herzens (SK: Sinusknoten) sowie aus Hirn und Niere der Maus. Die Experimente wurden analog zu den in Abb. 8 beschriebenen durchgeführt.

3.2 Gewebsspezifische Nachweise der Kanäle mittels Northern Blot

Um die Ergebnisse der RT-PCR-Experimente zu bestätigen, wurden Nachweise der mRNA mittels Northern Blot durchgeführt, denn diese Methode bietet den Vorteil, dass die Menge an Transkript im Gewebe besser quantifiziert werden kann. Außerdem zeigt sie die Länge der Transkripte auf.

Northern Blots zum Nachweis des VGCNL1-Transkripts:

Die Northern Blots wurden zunächst mit Gesamt-RNA aus Hirn und Herz durchgeführt. Auf diese Weise konnte das VGCNL1-Transkript mit einer Länge von 7,1 kb im Hirn eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 10, rechte Spur). Ein Nachweis des Transkripts aus totaler RNA des Herzens war nicht möglich, da offenbar der Anteil der VGCNL1-spezifischen mRNA im Verhältnis zur Gesamt-RNA zu gering war. In den folgenden Northern Blots für den VGCNL1-Nachweis im Herzen wurde die mRNA von der restlichen RNA abgetrennt und somit aufkonzentriert. So gelang auch der Nachweis des

VGCNL1-Transkripts im Herzen, mit einer Länge von ebenfalls 7,1 kb (Abb. 10, linke Spur). Es war aber auch eine zweite niedrigere Bande zu sehen, bei der es sich vermutlich um eine unspezifische Bindung der Sonde handelt. Derartige Nebenbanden wurden auch bei Northern Blots des VGCNL1 der Ratte beobachtet und als unspezifische Banden deklariert (Lee et al., 1999).

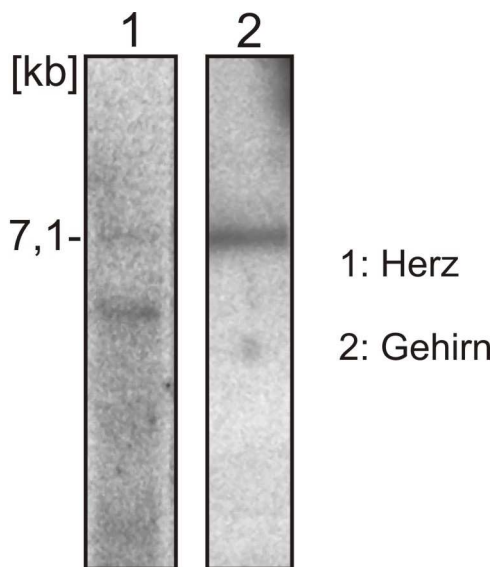


Abb. 10: Northern Blots zum Nachweis des VGCNL1-Transkripts. In Spur 1 wurde Herz-mRNA, in Spur 2 Hirn-Gesamt-RNA geblottet und jeweils mit einer VGCNL1-spezifischen radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Die radioaktiven Signale wurden mit einem Phosphoimager ausgelesen.

Für einen umfassenderen Überblick über die Gewebeverteilung wurde ein *multiple tissue* Northern Blot untersucht, auf dem mRNA aus zehn verschiedenen Geweben (Herz, Gehirn, Leber, Milz, Niere, Lunge, Thymus, Hoden, Ovar, Embryo) aufgetragen war. Er zeigte bei einer Hybridisierung mit der VGCNL1-spezifischen Sonde ein sehr starkes Signal im Hirn, ein sehr schwaches im Herzen und ein ebenfalls schwaches Signal im Embryo (Abb. 11A).

Northern Blots zum Nachweis der Transkripte des TPCN1 und des TPCN2:

Eine nachfolgende Hybridisierung des Blots mit einer Sonde gegen die TPCN1-mRNA zeigte eine deutliche Bande bei allen zehn untersuchten Geweben (Abb. 11B). Die ermittelte Größe der Banden beträgt 4,9 kb. Dieser Wert stimmt gut mit der vorausgesagten Sequenz (Accession Number: NM_145853) der Länge von 4666 Basen überein.

Bei einer Hybridisierung des Blots mit einer TPCN2-spezifischen Sonde zeigten sich deutliche Banden in allen Gewebeproben, wobei das Signal bei der mRNA aus Gehirn sehr schwach war (Abb. 11C). Die stärkste Expression scheint in Leber, Lunge und Thymus

vorzuliegen. Die mit dem Blot ermittelte Größe der Transkripte beträgt 2,8 kb. Dieser Wert stimmt gut mit der vorhergesagten Größe überein (siehe 3.3.3, Klonierung des murinen TPCN2). Für eine noch genauere Charakterisierung der Verteilung des TPCN2-Kanals wurde mRNA aus weiteren Geweben isoliert und mittels Northern Blot untersucht. Diese Experimente wiesen das TPCN2-Transkript sowohl im Darm als auch in der Haut nach (Abb. 11D).

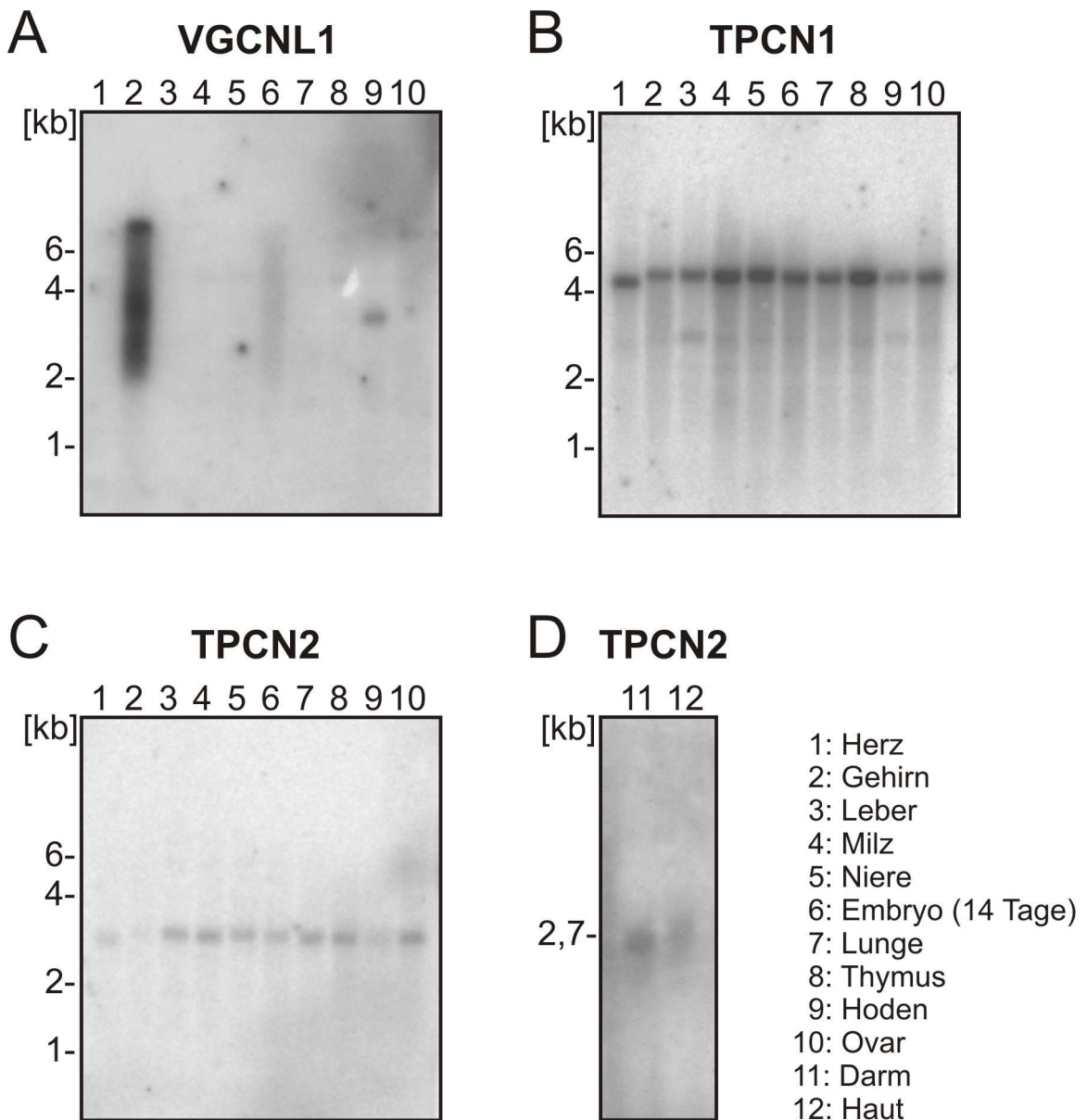


Abb. 11: Northern Blots zum Nachweis der Ionenkanal Transkripte in diversen Mausgeweben. **A, B, C:** Northern Blot Membran (Fa. Ambion) mit 2 µg mRNA pro Spur nach der Hybridisierung mit Sonden gegen die mRNA der angegebenen Gene. **D:** Northern Blot mit mRNA aus Darm und aus Haut. Die Blots wurden mit spezifisch im codierenden Bereich der Gene bindenden radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die Strahlung wurde auf radioaktivitätsempfindlichen Filmen detektiert.

3.3 Klonierung der Ionenkanäle VGCNL1, TPCN1 und TPCN2

Um die drei Kanäle VGCNL1, TPCN1 und TPCN2 weiter charakterisieren zu können, wurden die cDNA-Sequenzen über RT-PCR-Reaktionen amplifiziert und in eukaryotische Expressionsvektoren kloniert. So konnten erstens die genauen Sequenzen der noch weitgehend unerforschten Kanäle bestimmt werden und zweitens eröffnete sich die Möglichkeit, die Kanalproteine in Zellkulturen zur Expression zu bringen.

3.3.1 Klonierung des murinen VGCNL1

Bevor die Primer für die PCR-Klonierung designt und die Klonierungsstrategie entwickelt werden konnte, mussten Informationen über die Struktur der Gene im Genom gesammelt werden. Aus *ENSEMBL* (www.ensembl.org) und UniProt (www.uniprot.org) konnten folgende relevante Daten zum VGCNL1 gewonnen werden (Abb. 12).

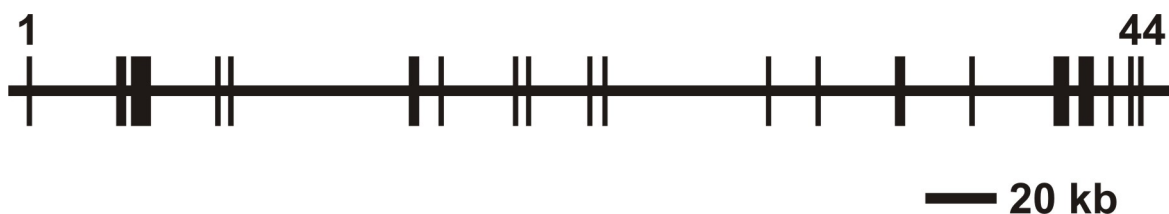


Abb. 12: Intron-Exon-Struktur des VGCNL1-Genlocus der Maus. Die 44 Exons sind als senkrechte Balken dargestellt. Der gesamte Genlocus erstreckt sich über 317 kb.

Der *open reading frame* (ORF) der mRNA des VGCNL1 der Maus besteht aus 5217 Basen und codiert somit ein Protein mit einer Länge von 1739 Aminosäuren. Das ist eine Aminosäure mehr als beim VGCNL1 des Menschen und dem der Ratte (Tab. 2).

Kanal	Chromosom	Genomische Sequenzlänge [kb]	Anzahl Exons	Anzahl Aminosäuren
VGCNL1 Mensch	13	363	44	1738
VGCNL1 Maus	14	317	44	1739
VGCNL1 Ratte	15	243	44	1738

Tab. 2: Vergleich der Gendaten des VGCNL1-Kanals verschiedener Spezies.

Mit den Gendaten als Grundlage wurde folgende Klonierungsstrategie entwickelt. Die eingesetzten spezifischen Primer – die Primersequenzen aller eingesetzten Primer sind im Anhang zu finden – wurden so ausgewählt, dass drei überlappende PCR-Fragmente amplifiziert werden konnten, die die gesamte codierende Sequenz des Gens abdeckten. Die drei Fragmente wurden zunächst mittels RT-PCR aus Mäusehirn-mRNA amplifiziert, in Klonierungsvektoren subkloniert und anschließend über die in Abb. 13 angegebenen Restriktionsschnittstellen zur Gesamtsequenz im pBluescript II SK-Vektor zusammengesetzt. Anschließend wurde die Sequenz in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 umkloniert. Da dieser Vektor keine Erkennungsequenz für SacI in der MCS besitzt, wurde unmittelbar vor der SacI-Schnittstellen eine HindIII-Schnittstelle mittels PCR an das Fragment 1 angefügt. Dann konnte das Fragment 1 über HindIII und EcoRI und die Fragmente 2 und 3 über EcoRI und XhoI im pcDNA3-Vektor assembliert werden.

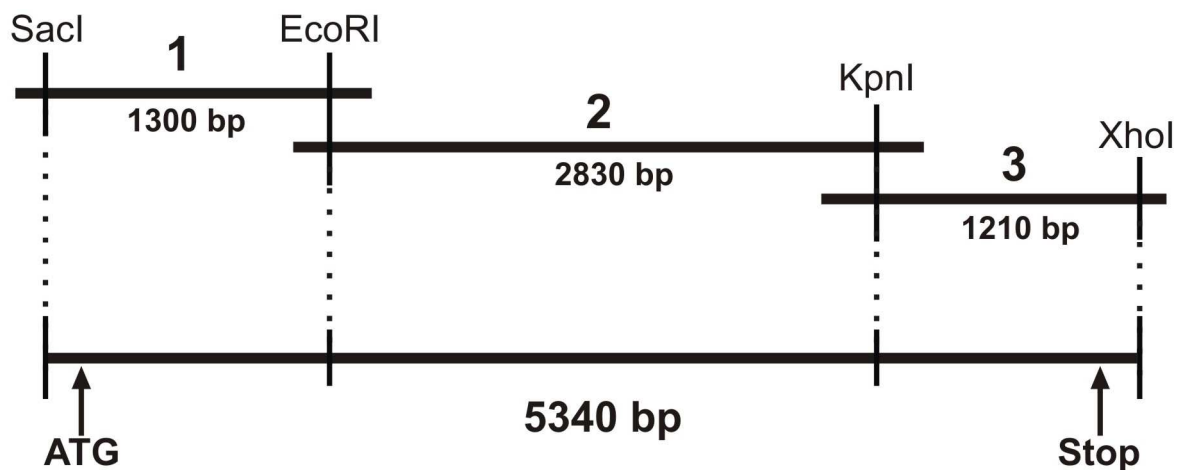


Abb. 13: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für den VGCNL1-Kanal der Maus. Drei überlappende PCR-Fragmente wurden aus Mäusehirn-mRNA amplifiziert (waagerechte Linien oben). Die angegebenen Restriktionsschnittstellen wurden verwendet, um die drei Fragmente einzeln in Vektoren zu klonieren und anschließend zur gesamten Sequenz (waagerechte Linie unten) zu verbinden.

3.3.2 Klonierung des murinen TPCN1

Die Gen-Datenbank *ENSEMBL* sagte folgende Genstruktur zum TPCN1-Kanal der Maus voraus (Abb. 14).

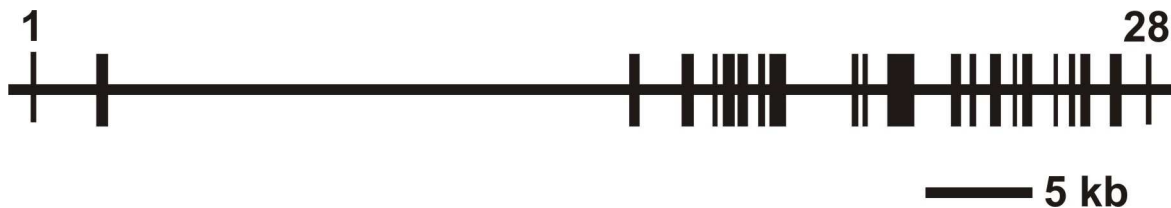


Abb. 14: Intron-Exon-Struktur des TPCN1-Genlocus der Maus. Die 28 Exons sind als senkrechte Balken dargestellt. Der gesamte Genlocus erstreckt sich über 54 kb auf Chromosom 5.

Das gesamte TPCN1-Transkript hat eine vorhergesagte Länge von 4705 Basen, der ORF umfasst 2451 Basen und codiert somit ein Protein bestehend aus 817 Aminosäuren. Dies sind genauso viele wie beim TPCN1 der Ratte und eine Aminosäure mehr als beim TPCN1 des Menschen (Tab. 3). Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der drei Spezies zeigte eine große Homologie von 95,1%. Aufgrund dieser Befunde konnte davon ausgegangen werden, dass die von *ENSEMBL* für den murinen TPCN1 vorhergesagten Exons tatsächlich das komplette Gen abdecken. Die daraus abgeleitete mRNA-Sequenz wurde daher als Grundlage für die Klonierungsexperimente genommen.

Kanal	Chromosom	Genomische Sequenzlänge [kb]	Anzahl Exons	Anzahl Aminosäuren
TPCN1 Mensch	12	77	28	816
TPCN1 Maus	5	54	28	817
TPCN1 Ratte	12	87	28	817

Tab. 3: Vergleich der Gendaten des TPCN1-Kanals verschiedener Spezies.

Um die mRNA des TPCN1 aus Mäusehirn mittels RT-PCR zu amplifizieren und in einen Vektor zu klonieren, wurden zwei Teile der Sequenz unabhängig voneinander mit RT-PCR amplifiziert und über die in Abb. 15 angegebenen Schnittstellen in den Vektor pcDNA3 kloniert. Dann wurden die beiden Fragmente über die im Gen relativ zentral gelegene EcoRI-Schnittstelle zur gesamten Gensequenz des TPCN1-Kanals assembliert (Abb. 15).

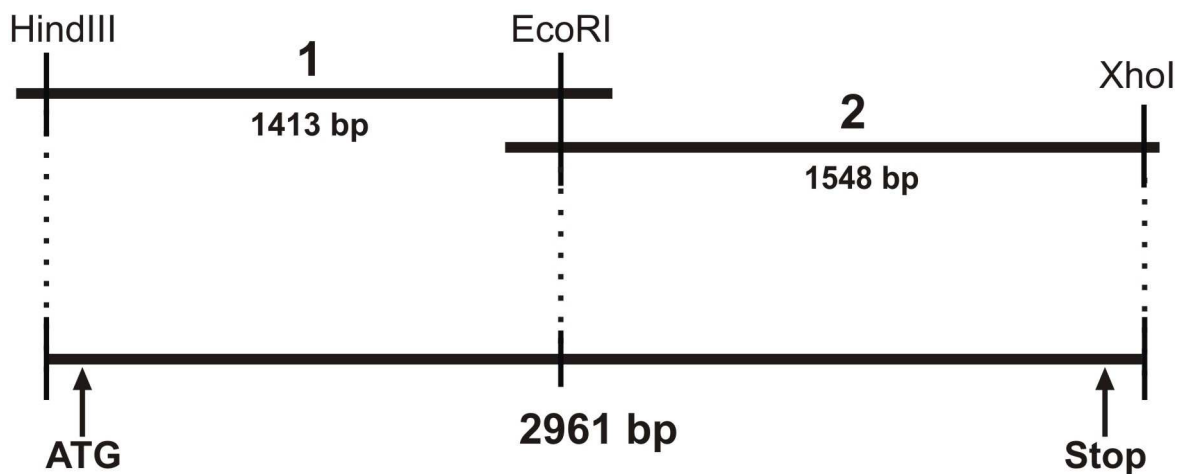


Abb. 15: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für den TPCN1-Kanal der Maus. Zwei überlappende PCR-Fragmente wurden aus Mäusehirn-mRNA amplifiziert (waagerechte Linien oben). Die angegebenen Restriktionsschnittstellen wurden verwendet, um die beiden Fragmente zur gesamten Sequenz (waagerechte Linie unten) zu verbinden und in den Vektor pcDNA3 zu klonieren.

Beide DNA-Stränge des klonierten Gens wurden komplett sequenziert und mit der TPCN1-Sequenz in der Datenbank *ENSEMBL* mit dem Ergebnis verglichen, dass beide Sequenzen exakt übereinstimmen.

3.3.3 Klonierung des murinen TPCN2

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit war noch keine Klonierung des TPCN2-Kanals aus irgendeiner Spezies publiziert. Er existierte ausschließlich als vorhergesagtes Gen in den Gen-Datenbanken. Somit lag – im Gegensatz zum verwandten TPCN1-Kanal – keine verlässliche Vergleichssequenz vor, an der eine Orientierung möglich gewesen wäre und es musste zunächst mit bioinformatischen Methoden die Struktur des TPCN2-Gens ermittelt werden. In der Datenbank *ENSEMBL* war eine vorhergesagte Genstruktur vom murinen TPCN2 abgelegt, die aus 25 Exons auf Chromosom 7 bestand (Abb. 16).

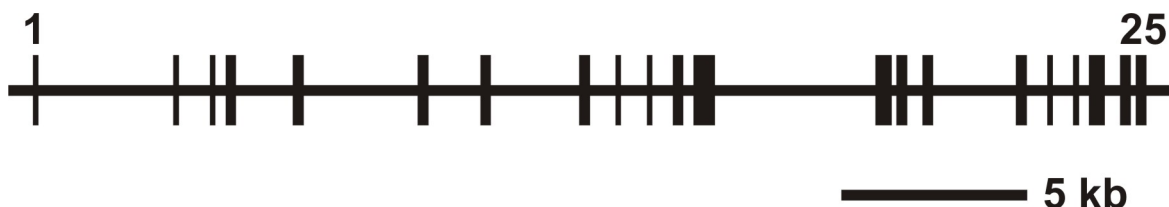


Abb. 16: Intron-Exon-Struktur des TPCN2-Genlocus der Maus. Die 25 Exons sind als senkrechte Balken dargestellt. Der gesamte Genlocus erstreckt sich über 30 kb.

Diese 25 Exons bilden eine mRNA von 2909 bp Länge und ein zugehöriges Protein bestehend aus 731 Aminosäuren. In Tab. 4 sind die *ENSEMBL*-Gendaten von Mensch und Maus vergleichend aufgelistet.

Kanal	Chromosom	Genomische Sequenzlänge [kb]	Anzahl Exons	Anzahl Aminosäuren
TPCN2 Mensch	11	40	25	752
TPCN2 Maus	7	30	25	731

Tab. 4: Vergleich der Gendaten der TPCN2-Kanäle von Mensch und Maus.

Mit den für TPCN2 vorhergesagten 731 bp wurde ein Hydrophobizitäts-Profil erstellt, um die potentiellen Transmembransegmente zu ermitteln. Hierzu wurden die Programme DNAMAN, TMHMM v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) sowie TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) eingesetzt. Die Hydrophobizitätsprofile deuteten wie beim TPCN1 der Ratte (Ishibashi et al., 2000) auf eine komplette Struktur eines *Two Pore* Kanals mit zwei Domänen mit je sechs hydrophoben Transmembransegmenten und je einer Porenschleife hin (Abb. 17).

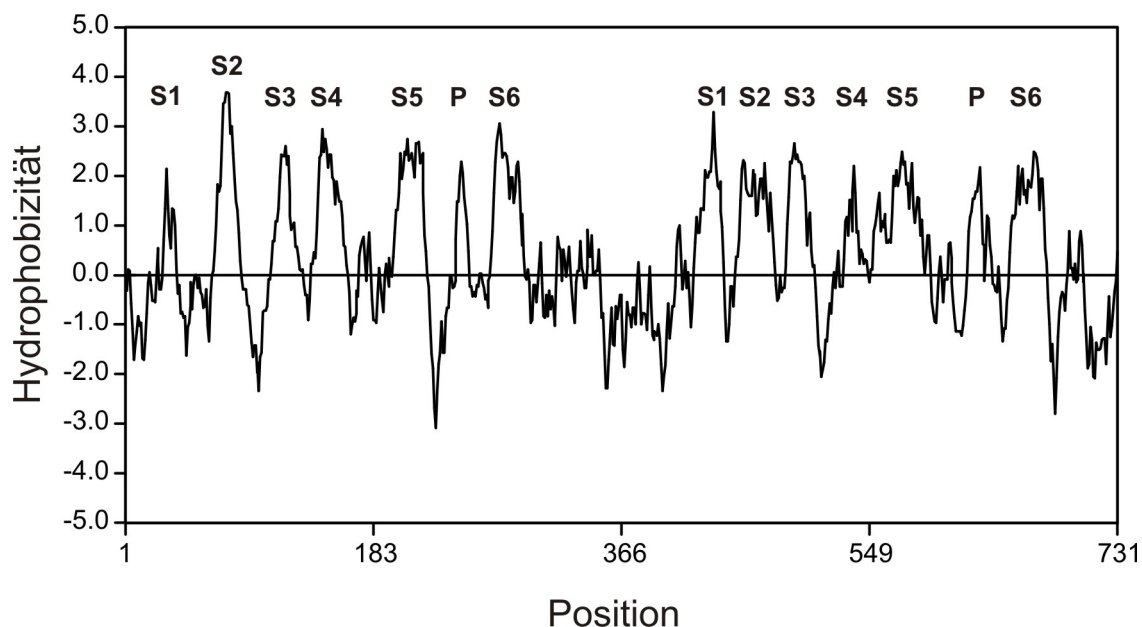


Abb. 17: Hydrophobizitätsprofil des murinen TPCN2. Die hydrophoben Transmembransegmente (S1-S6) und die vermutliche Porenschleife (P) in beiden Domänen sind eingezeichnet. Das Profil wurde mit dem Programm DNAMAN erstellt.

Eine präzisere Bestimmung der zwölf Transmembransegmente und der zwei vermutlichen Porenregionen gelang durch ein *multiple alignment*, d. h. einem Vergleich vieler TPCN1- und TPCN2-Sequenzen unterschiedlicher Spezies miteinander. So konnten die Grenzen der Strukturbausteine des Kanals ermittelt werden. Sie stimmten weitgehend mit denen der Hydrophobizitätsanalysen überein.

Die Start- und Endpunkte der vorhergesagten Gensequenz wurden bioinformatisch überprüft. Das 3'-Ende ist durch das Polyadenylierungssignal, das meist die Sequenz AATAAA hat, definiert. Während dieses beim TPCN1 mittels Textsuche einfach zu finden war (1138 bp hinter dem Stopcodon), war beim TPCN2 kein AATAAA zu finden. Mit Hilfe der Internet-Datenbank *PolyA_DB2* (Tab. 5) konnte das seltene alternative Polyadenylierungssignal TATAAA 660 bp hinter dem Stop-Codon identifiziert werden. Dieses Signal kommt in etwa 4% der bekannten Mausgene vor (Paran et al., 2000; Tian et al. 2005). Zwischen dem Stopcodon und dem Polyadenylierungssignal gibt es keine Intron-Exon-Grenzen. Dies ist eine Voraussetzung für die Funktionalität der Polyadenylierungssequenz.

Als nächstes musste überprüft werden, ob der Anfang des Gens, d. h. das vorhergesagte Start-Codon, korrekt ist. Das vermutete Start-Codon der TPCN2-mRNA liegt in Exon 1. Ein Stop-Codon befindet sich 58 Basentriplets in 5'-Richtung vor dem vermuteten Start-Codon. Unmittelbar vor dem Start-Codon gibt es zwar keine klassische Kozak-Sequenz, jedoch sind die zur Verstärkung der Translationsrate wichtigsten Basen (Kozak, 1991) vorhanden: Ein Purin drei Basen vor dem A des Start-Codons und ein G vier Basen dahinter.

Zum Auffinden des ersten Exons und des Start-Codons eines unbekanntes Gens sind viele Software-Tools verfügbar (Zhang, 2002), von denen mehrere eingesetzt wurden (Tab. 5). Um ein mögliches, zusätzliches Exon mit Start-Codon weit vor dem vermuteten Startpunkt aufzuspüren, wurde ein weiter Bereich (20 kb) der Region vor dem von *ENSEMBL* vorhergesagten Start-Codon mit den Programmen analysiert. Diese 20 kb decken den gesamten Bereich bis zum nächsten bekannten Gen ab, das etwa 17 kb vor dem TPCN2-Gen liegt. Drei der Programme bestätigten das Start-Codon (*FirstEF*, *GrailEXP*, *GeneMark.hmm*), während ein viertes Programm ein zusätzliches Exon in der 5'-UTR voraussagte (*FGENESH*). Die daran angeschlossene Untersuchung der Intron-Exon-

Grenzen zeigte, dass das Zusatzexon theoretisch möglich wäre und nicht zu einer Verschiebung des Leserasters führen würde.

Name	WWW-Adresse	Referenz
PolyA_DB 2	http://polya.umdj.edu/polyadb/	Lee et al., 2007
FirstEF	http://rulai.cshl.org/tools/FirstEF/	Davuluri et al. 2001
GraileXP	http://compbio.ornl.gov/grailexp/	Xu et al., 1997
GeneMark.hmm	http://exon.gatech.edu/GeneMark/eukhmm.cgi	Lomsadze et al., 2005
FGENESH	http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind	Salamov et al., 2000

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Programme zur Analyse der TPCN2-Gensequenz. PolyA_DB 2 ermöglicht die Identifikation von Polyadenylierungssignalen in genomischen Sequenzen. Mit den anderen vier Programmen können Gene, insbesondere Genstartpunkte, im Genom gefunden werden.

Die Existenz dieses hypothetischen Exons wurde mittels RT-PCR-Reaktionen getestet. Hierzu wurde mRNA aus Maushirn isoliert und daraus cDNA generiert. Mit einem Vorwärts-Primer, dessen komplementäre Sequenz in dem hypothetischen Exon lag, und weiter in 3'-Richtung bindenden Rückwärts-Primern wurde versucht Produkte zu amplifizieren. Wäre das hypothetische Exon ein Teil der cDNA, entstünden Produkte der Länge von ca. 1 kb. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 18). Parallel durchgeführte Kontrollreaktionen führten hingegen zu Produkten. Diese PCR-Experimente widerlegten das Resultat des Programms *FGENESH* und bestätigten den Genstartpunkt der Datenbank *ENSEMBL* und die Vorhersagen der anderen drei Programme.

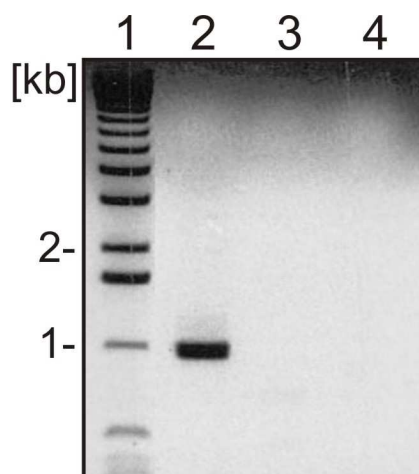


Abb. 18: RT-PCR-Experimente zum Test auf die Existenz eines hypothetischen, zusätzlichen Exons in der 5'-UTR des TPCN2-Gens. Eine Sequenz vom hinteren codierenden Bereich in die 3'-UTR konnte amplifiziert werden (Spur 2, Primer: TPCN2-7f/TPCN2-4r). RT-PCR-Reaktionen, bei denen der Vorwärts-Primer an eine Sequenz des hypothetischen Exons in der 5'-UTR bindet, führten hingegen zu keinem Produkt (Spur 3, Primer: TPCN2-5utr-test/TPCN2-11r und Spur 4, Primer: TPCN2-5utr-test/TPCN2-19r). Würde das hypothetische Exon zur mRNA gehören, entstünden bei diesen PCR-Reaktionen jeweils Amplifikationsprodukte der Länge von ca. 1 kb. Alle PCRs wurde mit 30 Zyklen und optimal an die Primer angepassten Bedingungen durchgeführt. Spur 1: kb-Ladder.

Mit den gewonnenen Erkenntnissen konnten Primer für die RT-PCR zur Klonierung der TPCN2-cDNA entwickelt werden. Der eine Primer war komplementär zur Sequenz direkt vor dem Start-ATG, der zweite zu einer Sequenz unweit hinter dem Stop-Codon. Beide enthielten jeweils eine Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme, um eine Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor pcDNA3 zu ermöglichen (Abb. 19). Auf diese Weise gelang die Amplifikation des gesamten ORF, was wiederum bestätigt, dass es sich bei der vorhergesagten Genstruktur tatsächlich um ein zusammenhängendes Gen handelt. Die Sequenz der TPCN2-cDNA ist im Anhang zu finden.

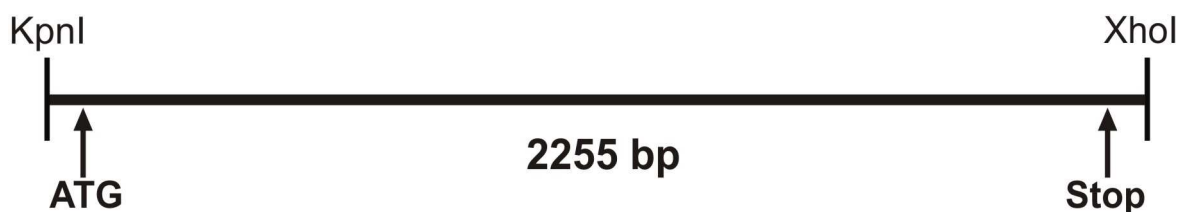


Abb. 19: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für den TPCN2-Kanal der Maus. Der gesamte ORF des Gens wurde in einem Stück aus Mäusehirn-mRNA amplifiziert. Die eingesetzten Primer enthielten die angegebenen Restriktionsschnittstellen, mit denen das PCR-Produkt in den Vektor pcDNA3 kloniert werden konnte.

3.4 Untersuchungen an TPCN Proteinen

Die cDNA-Sequenzen der Ionenkanäle wurde in die eukaryotischen Expressionsvektoren kloniert, um die zugehörigen Proteine charakterisieren zu können. Der Schwerpunkt lag hierbei auf dem TPCN2, während der TPCN1 an einigen Stellen zu Vergleichszwecken hinzugezogen wurde, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den beiden Ionenkanälen zu verdeutlichen.

3.4.1 Herstellung und Test eines TPCN2-spezifischen Antikörpers

Um das TPCN2-Protein mittels Western Blot nachweisen zu können, wurde ein spezifischer Antikörper benötigt. Kommerziell erhältlich waren nur Antikörper für das humane TPCN2-Protein, aber keiner für das murine Protein, sodass es erforderlich war, selbst einen derartigen Antikörper herzustellen. Als Peptid-Antigen für die Immunisierung von Kaninchen diente ein Oligopeptid bestehend aus 19 Aminosäuren des C-Terminus des Maus-TPCN2-Proteins (Sequenz siehe Anhang). Anschließend immunisierte die Firma Gramsch zwei Kaninchen mit dem Peptid insgesamt fünf Mal in einem vierwöchigen

Abstand und entnahm jeweils etwa 20 ml Serum. Bei der finalen Blutabnahme nach der letzten Immunisierung konnten pro Kaninchen 80-90 ml Serum gewonnen werden

Die Seren wurden mittels Western Blot-Experimenten mit Lysaten von HEK293-Zellen, die zuvor mit der klonierten TPCN2-cDNA-Sequenz im pcDNA3-Vektor transient transfiziert worden waren, auf die Anwesenheit des spezifischen Antikörpers getestet. Für den Nachweis des TPCN2-Proteins im Western Blot wurde zunächst unaufgereinigtes Serum als Primärantikörper-Lösung eingesetzt. Jedoch war die Spezifität dieser Antikörperlösung für den Western Blot nicht ausreichend, sodass eine Aufreinigung der Seren und damit Aufkonzentrierung des spezifischen TPCN2-Antikörpers über eine Affinitäts-Säule mit gekoppeltem Peptid-Antigen erforderlich war. Derart aufgereinigte Antikörper wurden dann mit geblotteten HEK293-Zell-Lysaten auf ihre Eignung im Western Blot getestet.

Um die Spezifität des eigenen Antikörpers mit der eines kommerziell erhältlichen vergleichen zu können, wurden nicht nur Wildtyp-TPCN2-Proteine im Western Blot untersucht, sondern auch Fusionen des TPCN2 mit dem EGFP. Zur Herstellung dieses EGFP-TPCN2-Fusionsproteins wurde die Sequenz des EGFP im gleichen Leseraster wie die Ionenkanal-cDNA direkt vor das Start-Codon kloniert, indem zuerst in zwei separaten PCR-Reaktionen zwei Produkte amplifiziert wurden: Erstens die EGFP-Sequenz und zweitens den ersten Teil der TPCN2-cDNA von der KpnI-Schnittstelle vor dem Start-ATG bis hinter die EcoRI-Schnittstelle (Sequenzen der Primer und gesamte Sequenz des TPCN2 siehe Anhang). In einem weiteren PCR-Schritt, einer sog. Overlap-PCR, wurden dann die beiden ersten PCR-Produkte als Template eingesetzt und mit Hilfe von Overlap-Primern eine fusionierte Sequenz amplifiziert, bei der sich die EGFP-Sequenz ohne Stop-Codon im gleichen Leseraster direkt vor dem Start-ATG der TPCN2-Sequenz befand. Das PCR Produkt konnte dann über die Schnittstellen KpnI und EcoRI in das TPCN2-pcDNA3-Konstrukt ligiert werden.

Nach dem gleichen Prinzip wurde auch ein EGFP-TPCN1-Fusionskonstrukt hergestellt, das aber erst später zum Einsatz kam. Der Bereich vom Start-Codon bis zu einer geeigneten Restriktionsschnittstelle – hier BstEII – wurde ausgeschnitten und durch eine mit Overlap-PCR generierte Fusions-Sequenz aus EGFP und TPCN1 ersetzt (Sequenzen siehe Anhang).

Mit dem Wildtyp-TPCN2 sowie mit dem EGFP-TPCN2-Fusionskonstrukt wurden HEK293-Zellen transfiziert und die Lysate sowohl mit dem anti-TPCN2- als auch mit einem kommerziell erhältlichen anti-GFP-Antikörper (Fa. Clontech) im Western Blot getestet.

Es zeigte sich bei den Lysaten mit dem Wildtyp-TPCN2 immer eine Doppelbande (Abb. 20A, Spur 1), die im Lysat der untransfizierten Zellen nicht vorkam. Die untere Bande war mit etwa 75 kDa etwas niedriger als für das rechnerisch 83 kDa schwere Protein zu erwarten wäre. Das EGFP-TPCN2-Protein konnte mit beiden Antikörpern mit gleicher Spezifität nachgewiesen werden. Es zeigten sich die gleichen Doppelbanden wie beim Wildtyp, die jedoch jeweils weniger weit im Gel liefen (Abb. 20A, Spur 2). Die Differenz der Laufgeschwindigkeit entsprach in etwa dem Anteil des EGFP, das ein Molekulargewicht von 27 kDa hat. Da der anti-GFP-Antikörper am N-Terminus des Fusionsproteins bindet und der anti-TPCN2-Antikörper am C-Terminus (Abb 20B), ist es unwahrscheinlich, dass die unteren Banden partiell degradiertes TPCN2-Protein oder unspezifische Signale beider Antikörper darstellen.

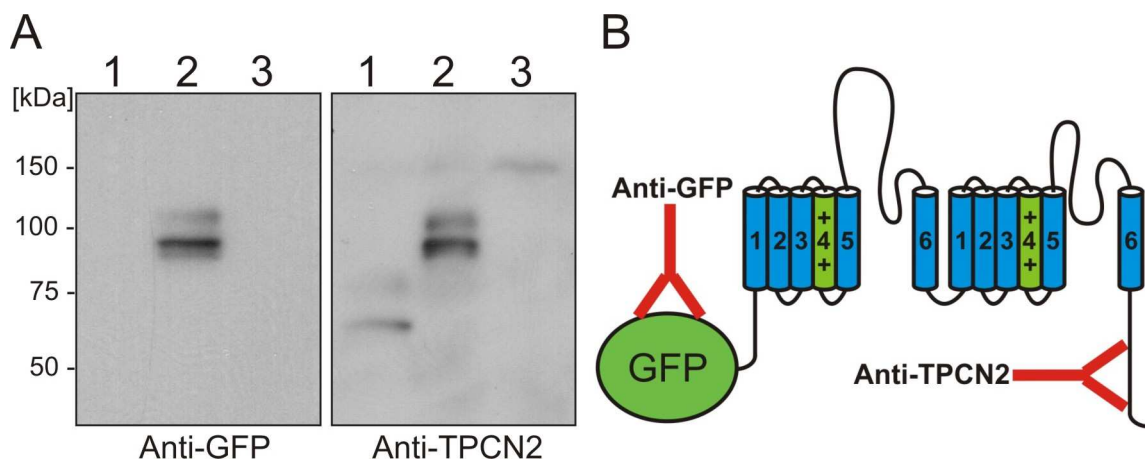


Abb. 20: Western Blots zum Test des anti-TPCN2-Antikörpers. **A:** Zwei Western Blots mit je 20 μ g Gesamtprotein aus HEK293-Zell-Lysaten. Spur 1: Lysat aus Zellen transfiziert mit TPCN2 in pcDNA3, Spur 2: Lysat aus Zellen transfiziert mit EGFP-TPCN2 in pcDNA3, Spur 3: Lysat aus untransfizierten HEK293-Zellen. **B:** Schematische Darstellung des EGFP-TPCN2-Fusionsproteins. Die symbolisch dargestellten Antikörper (rot) kennzeichnen die jeweiligen Epitope des Proteins, an die sie binden.

Nach dem erfolgreichen Nachweis des TPCN2-Proteins in transfizierten Zellen, war der nächste Schritt die Detektion nativer TPCN2-Proteinen in Mausgewebe. Hierfür wurden Gewebe eingesetzt, in denen das TPCN2-Transkript mittels Northern Blot gefunden

werden konnte, wie z. B. Niere und Hirn. Jedoch zeigten sich viele unspezifische Signale im Western Blot und eine vergleichbare TPCN2-spezifische Bande wie in den HEK293-Lysaten konnte nicht gefunden werden (nicht gezeigt). Das Problem der Unspezifität des Antikörpers konnte auch nicht umgangen werden, wenn ausschließlich Membranfraktionen der Gewebelysate eingesetzt wurden. Die Spezifität des TPCN2-Antikörpers ist somit zwar gut geeignet für die Detektion heterolog überexprimierter Proteine, jedoch nicht ausreichend für einen Nachweis nativer Proteine im Gewebe der Maus.

Weiterhin wurde mit der gleichen Vorgehensweise ein Antikörper gegen den murinen TPCN1-Kanal hergestellt. Auch in diesem Fall wurden zwei Kaninchen immunisiert. Aus den Seren beider Kaninchen konnte kein hinreichend spezifischer Antikörper erhalten werden. Auch nach der Aufreinigung der Seren war der Gehalt an spezifischem Antikörper zu gering, um das TPCN1-Protein aus Gesamtzelllysaten transfizierter HEK293-Zellen spezifisch zu detektieren.

3.4.2 Untersuchung der Glycosylierung der TPCN-Proteine

In der TPCN2-Proteinsequenz fielen zwei potentielle Signale für N-Glycosylierung im vorhergesagten Extrazellulärbereich zwischen dem fünften Transmembransegment und der Porenregion der zweiten Domäne des TPCN2-Proteins auf. Um zu überprüfen, ob tatsächlich Glycosylierungen an diesen Positionen vorliegen, wurden Lysate aus transfizierten HEK293-Zellen vor dem Western Blot entweder mit Endoglycosidase H (Endo H) oder mit N-Glycosidase F (PNGase F) behandelt. Während PNGase F alle N-glycosidischen Bindungen an den Asparaginresten des Proteins spaltet, ist die Endo H nur in der Lage den mannosereichen Typ und einige Formen des Hybrid-Typs der N-Glycosylierungen abzuspalten, jedoch nicht den komplexen Typ.

Nach der Behandlung des Lysats mit PNGase F war ausschließlich die untere Bande des TPCN2-Proteins detektierbar. Sie nahm außerdem an Intensität gegenüber der des unbehandelten Lysats zu (Abb. 21, zweite Spur). Dies ist ein Indiz dafür, dass die in den vorherigen Western Blots (Abb. 20A) beobachtete untere Bande die unglycosylierte Form des TPCN2 darstellt.

Bei einer Behandlung des Lysats mit Endo H blieb die obere Bande erhalten, aber die anderen Zusatzbanden verschwanden und die unterste Bande nahm nur wenig an Intensität

zu (Abb. 21, dritte Spur). Diese Resultate zeigen sehr deutlich, dass die Glycosylierungen des TPCN2-Kanals teilweise auch dem komplexen Typ mit vielen Verzweigungen und unterschiedlichen Zuckermonomeren angehören, die resistent gegenüber der Behandlung mit Endo H sind. Die oberste Bande des unbehandelten Lysats (Abb. 21, erste Spur) entsteht somit durch die TPCN2-Proteine mit komplexen Zuckergerüsten, die das Protein im Gel verlangsamen.

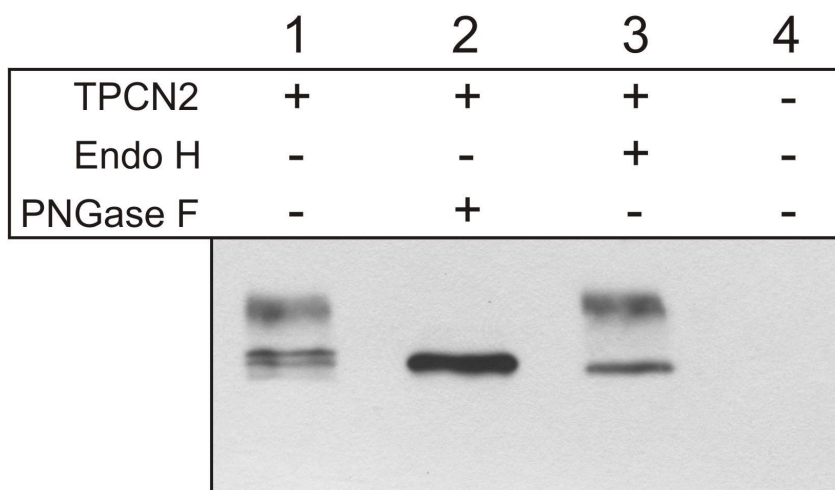


Abb. 21: Entglycosylierung des TPCN2-Proteins. Pro Spur wurden 10 µg Lysat TPCN2-transfizierter HEK293-Zellen (Spuren 1 bis 3) bzw. untransfizierter Zellen (Spur 4) eingesetzt. Die Kontrollansätze ohne Enzym wurden in gleicher Weise behandelt wie diejenigen mit Enzym (Inkubation mit Puffer etc.). Nach der Behandlung wurden die Lysate im Western Blot verarbeitet und die TPCN2-Proteine mit dem anti-TPCN2-Antikörper detektiert.

In weiteren Experimenten wurden zwei TPCN2-Mutanten hergestellt, bei denen jeweils eine der beiden Glycosylierungsstellen – der Asparaginrest an Position 594 bzw. der an Position 601 – zu Glutamin mutiert war (Mutante N594Q bzw. N601Q). Western Blots mit diesen Mutanten konnten die Ergebnisse der enzymatischen Entglycosylierung noch unterstreichen. Beide Positionen scheinen glycosyliert zu werden, da es bei beiden Mutanten im Western Blot ohne enzymatische Entglycosylierung ein reduziertes, aber nicht völlig fehlendes Glycosylierungsmuster gab. Eine Mutante, bei der beide Glycosylierungsstellen mutiert waren, bestätigte diese Befunde ebenfalls. Bei ihr konnte ausschließlich die untere Bande detektiert werden (Abb. 22, Spuren 7 und 8), wie bei dem Wildtyp-Protein nach der Behandlung mit PNGase F (Abb. 21, Spur 2) oder den Mutanten mit nur einer Mutationsstelle nach entsprechender Behandlung (Abb. 22, Spuren 3 und 6).

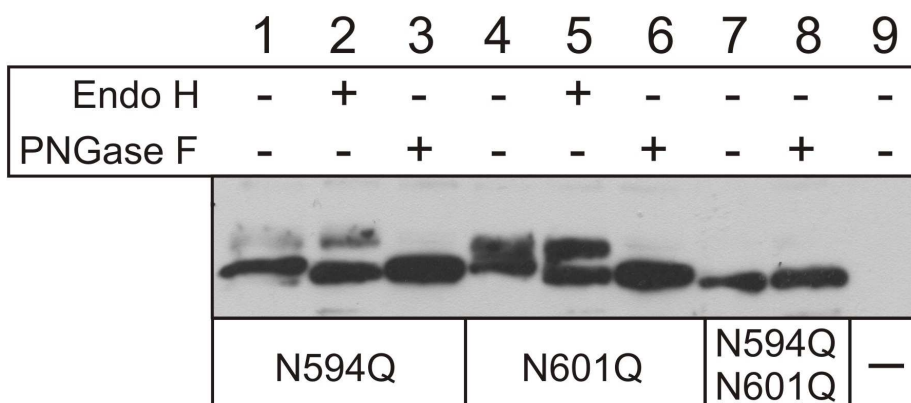


Abb. 22: Entglycosylierung und Western Blot von TPCN2-Proteinen mit mutierten Glycosylierungsstellen. Pro Spur wurden 10 µg Lysat transfizierter HEK293-Zellen (Spuren 1 bis 8) bzw. untransfizierter Zellen (Spur 9) eingesetzt. Die Ansätze ohne enzymatische Behandlung wurden in gleicher Weise behandelt wie diejenigen mit Enzym (Inkubation mit Puffer etc.). Nach der Behandlung wurden die Lysate im Western Blot verarbeitet und die TPCN2-Proteine mit dem anti-TPCN2-Antikörper detektiert. Die Mutationsstellen in der TPCN2-Aminosäuresequenz sind unter dem Blot angegeben.

Gewebelysate wurden ebenfalls mit dem Enzym PNGase F behandelt. Es wurde geprüft, ob es sich bei den in den vorhergegangenen Western Blots mit dem TPCN2-Antikörper beobachteten Banden um andere Glycosylierungsformen des TPCN2-Proteins als bei den HEK293-Zellysaten handelt. Jedoch zeigten die Entglycosylierungsversuche keine Veränderung der Banden im Western Blot gegenüber unbehandelten Gewebelysaten (nicht gezeigt). Daher muss davon ausgegangen werden, dass diese Banden nur auf unspezifische Bindungen des Antikörpers beruhen.

In der Sequenz des verwandten TPCN1-Kanals gibt es ebenfalls Glycosylierungsstellen. Die erste ist an analoger Position wie die eine beim TPCN2, zwei andere befinden sich wenige Basenpaare davon entfernt in der gleichen extrazellulären Schleife (siehe 6.5, *Alignment* zwischen TPCN1 und TPCN2). Um die Glycosylierung dieser Stellen zu prüfen, wurde das EGFP-TPCN1-Fusionskonstrukt eingesetzt, dessen resultierendes Protein ein errechnetes Molekulargewicht von 121 kDa hat. Ein Western Blot mit Lysat derart transfizierter HEK293-Zellen zeigte wie beim TPCN2 eine Doppelbande (Abb. 23, erste Spur).

Nach der Behandlung mit PNGase F war wie beim TPCN2 nur noch eine einzelne scharfe Bande zu sehen, sie verlief niedriger als beide Banden des unbehandelten Lysats (Abb. 23, zweite Spur). Auch das EGFP-TPCN1 Protein war teilweise resistent gegenüber der

Behandlung mit Endo H, da nach entsprechender Behandlung nur die untere Bande ihre Größe veränderte, während die obere, die offensichtlich das glycosylierte Protein mit den komplexen Zuckerresten darstellte, unverändert blieb (Abb. 23, dritte Spur).

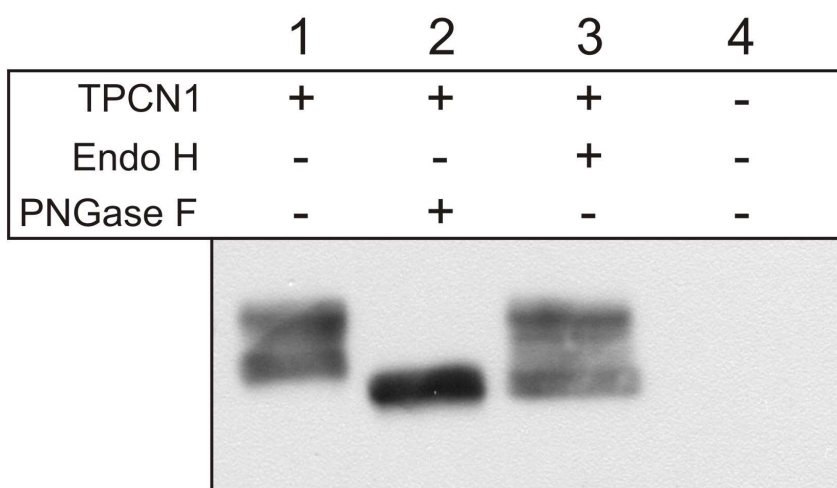


Abb. 23: Entglycosylierung des EGFP-TPCN1-Proteins. Pro Spur wurden 10 µg Lysat EGFP-TPCN1-transfizierter HEK293-Zellen (Spuren 1 bis 3) bzw. untransfizierter Zellen (Spur 4) eingesetzt. Die Kontrollansätze ohne Enzym wurden in gleicher Weise behandelt wie diejenigen mit Enzym (Inkubation mit Puffer etc.). Nach der Behandlung wurden die Lysate im Western Blot verarbeitet und die EGFP-TPCN1-Proteine mit einem Anti-GFP-Antikörper (Clontech) detektiert.

3.4.3 Coimmunpräzipitation der TPCN-Proteine

Um *in vitro* nachzuweisen, dass die TPCN-Kanäle Dimere bilden, die dann strukturelle Ähnlichkeit mit den spannungsgesteuerten Natrium- und Calciumkanälen hätten (Ishibashi et al. 2000), wurden Coimmunpräzipitations-Experimente mit den heterolog exprimierten Kanälen durchgeführt. Für die Detektion von TPCN2-Homodimeren sowie auch von TPCN1-TPCN2-Heterodimeren, wurden neue Ionenkanal-Konstrukte generiert. So wurden mittels PCR-Klonierung an das 5'-Ende der cDNA-Sequenzen der Kanäle die Sequenz des Myc-Epitops (EQKLISEEDL), eines etablierten Epitops für Proteinnachweise (Jarvik & Telmer, 1998), angehängt. Für die Immunpräzipitation konnte dann ein kommerziell erhältlicher anti-Myc-Antikörper eingesetzt werden. HEK293-Zellen wurden entweder mit den EGFP-TPCN2- und Myc-TPCN2- oder mit den EGFP-TPCN2- und Myc-TPCN1-Konstrukten cotransfiziert, die resultierenden Proteinlysate mit dem anti-Myc-Antikörper und Protein-A-Sepharose präzipitiert und per Western Blot mit dem anti-EGFP-Antikörper detektiert. Als Kontrollexperimente dienten Lysate, bei denen mit einem anti-Glutathion-S-

Transferase Antikörper versucht wurde zu präzipitieren und zweitens wurden Parallelansätze mit untransfizierten Zellen durchgeführt.

Die Spuren bei denen das Lysat direkt aufgetragen wurde zeigen, dass in den Lysaten der transfizierten HEK-Zellen das EGFP-TPCN2-Protein vorhanden war (Abb. 24, erste und sechste Spur). Es zeigte sein typisches Bandenmuster, das die glycosylierte und unglycosylierte Form des Proteins darstellt. In der Spur bei der das Myc-TPCN2-Protein immunpräzipitiert wurde, ist auch eindeutig das EGFP-TPCN2-Protein zu sehen (Abb. 24, zweite Spur), jedoch nicht im Kontrollansatz (Abb. 24, dritte Spur). Damit wurde deutlich der Beweis erbracht, dass TPCN2-Proteine aneinander binden.

Bei der Immunpräzipitation des Myc-TPCN1-Proteins konnte das EGFP-TPCN2-Protein hingegen nicht detektiert werden (Abb. 24, vorletzte Spur).

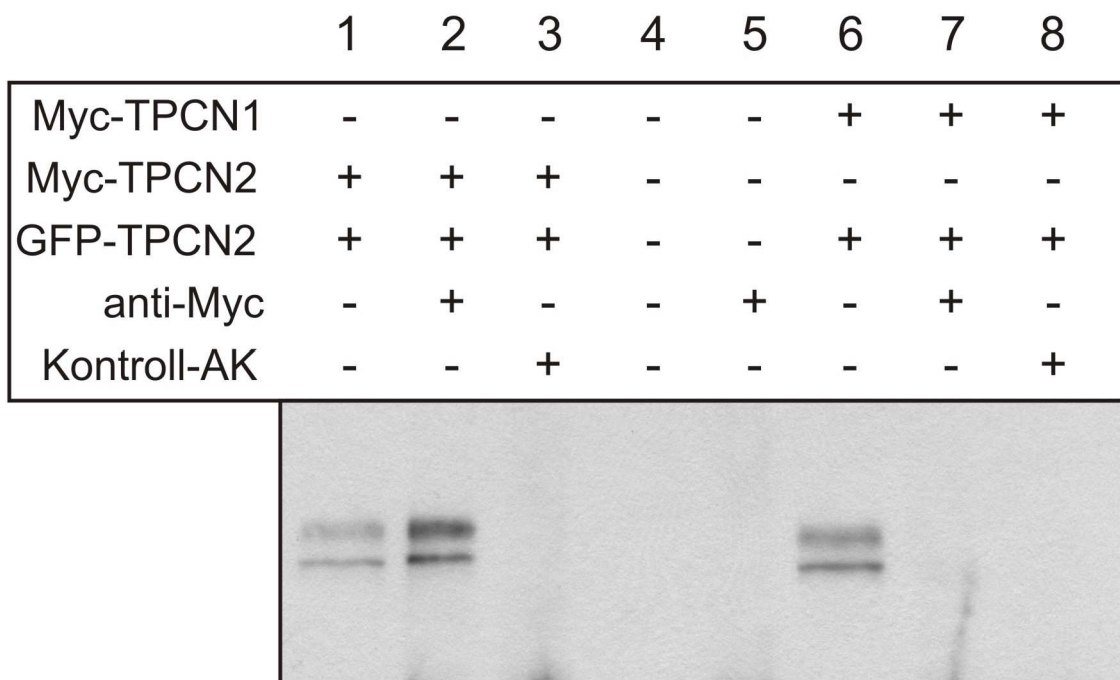


Abb. 24: Co-Immunpräzipitation aus Lysaten transfizierter HEK293-Zellen. Die Lysate wurden mit einem anti-Myc-Antikörper immunpräzipitiert, als Negativkontrolle diente ein anti-GST-Antikörper (Kontroll-AK). Nach dem Western Blot der Immunpräzipitate wurde mit einem anti-GFP-Antikörper die Anwesenheit des EGFP-TPCN2 überprüft. In den ersten drei Spuren wurden Lysate mit Myc-TPCN2 und EGFP-TPCN2 eingesetzt, in der vierten und fünften Spur Lysate untransfizierter Zellen und in den letzten drei Spuren Lysate mit Myc-TPCN1 und EGFP-TPCN2. Bei den Spuren ohne Antikörperzugabe (1, 4 und 6) wurden 10% der Lysate (100 µg) direkt auf das Gel aufgetragen. Sie dienten als Kontrolle für die Menge an EGFP-TPCN2 im Lysat.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Monomere der TPCN-Kanäle miteinander interagieren können und daher sehr wahrscheinlich *in vivo* Dimere bilden. Allerdings scheint es keine Heteromere zwischen TPCN1 und TPCN2 zu geben.

3.5 Heterologe Expression in Pflanzenzellen und Konfokalmikroskopie

Da Pflanzen einen *Two Pore Loop* Kanal besitzen, der in der Vakuolenmembran lokalisiert ist (Peiter et al., 2005), wurde getestet, ob die murinen TPCN-Kanäle nach einer heterologen Expression in Pflanzenzellen auch in der Vakuole nachweisbar sind. Dies wurde ermöglicht, indem die EGFP-TPCN-Fusionssequenzen vom pcDNA3-Vektor in den Pflanzen-Expressionsvektor pSAT1564 umklontiert wurden. Die anschließenden Experimente zur Expression der Kanäle und Mikroskopie der Pflanzen wurde von der Arbeitsgruppe um Dr. Dirk Becker, Julius-von-Sachs-Institut, Abteilung molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg, durchgeführt. Die Gruppe transfizierte Lauch-, Ackerbohnen- und Zwiebel-Epidermiszellen mit Hilfe der Schrotschuss-Methode nach dem in Ranf et al. (2008) beschriebenen Protokoll und mikroskopierte die Zellen mit einem Konfokalmikroskop.

Die transfizierten Pflanzenzellen exprimierten das EGFP-TPCN1-Protein mit guter Effizienz. Bei der Mikroskopie zeigte sich eindeutig eine Lokalisation der Proteine im Innern der Zelle und nicht in der Plasmamembran (Abb. 25A, B, Abb. 26). Die Verteilung der Fluoreszenz des murinen EGFP-TPCN1-Fusionsproteins unterschied sich aber klar von der des pflanzlichen TPCN1 (Peiter et al., 2005; Ranf et al., 2008) und schien in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums zu sein (Arbeitskreis Dr. Becker, mündliche Mitteilung).

Nach der Transfektion des murinen EGFP-TPCN2-Proteins in Pflanzenzellen glich in einigen der mikroskopierten Zellen die Verteilung des Fluoreszenzsignals der des Maus-EGFP-TPCN1 (Abb. 25C), es war demnach wahrscheinlich auch im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert. In einigen Zellen zeigten sich aber auch über die gesamte Zelle verteilte punktuelle Fluoreszenzsignale (Abb. 25D). Dabei könnte es sich einerseits um Vesikel oder kleine Organellen handeln, andererseits lässt sich nicht ausschließen, dass die Signale Fluoreszenz-Artefakte durch cytosolische Aggregation der überexprimierten Fluoreszenzproteine sind (Arbeitskreis Dr. Becker, mündliche Mitteilung).

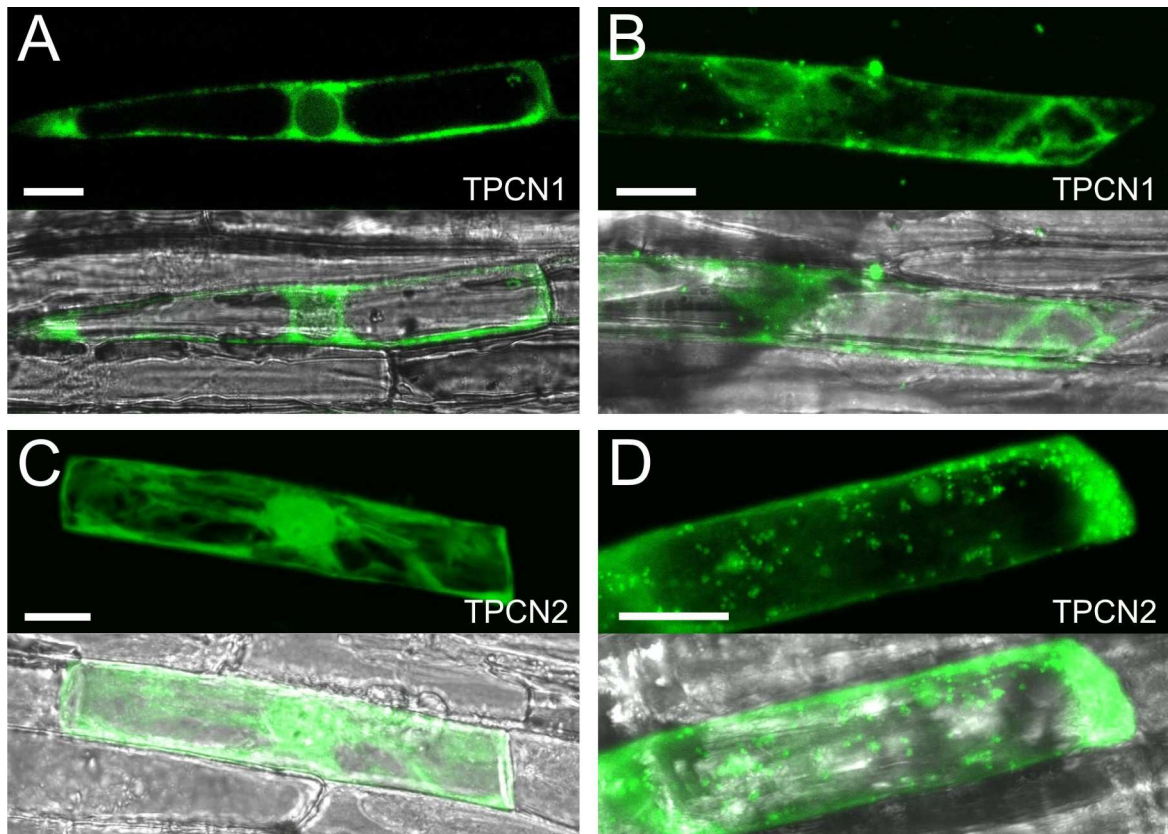


Abb. 25: Heterologe Expression muriner EGFP-Ionenkanal-Fusionsproteine in Lauch-Epidermiszellen. **A, B:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen von EGFP-TPCN1 exprimierenden Zellen (grün). In Abb. A geht die Mikroskopierebene zentral durch den Zellkörper, daher sind die Vakuolen (große schwarze Bereiche) sowie der Zellkern (runde Struktur in der Mitte) gut zu erkennen. In Abb. B geht die Mikroskopierebene oberhalb oder unterhalb der Vakuolen durch die Peripherie der Zellen. Daher sind die Vakuolen weniger gut, cytoplasmatische Strukturen hingegen besser zu erkennen als in Abb. A. Die grüne Fluoreszenz markiert möglicherweise das ER. **C, D:** EGFP-TPCN2 exprimierende Zellen. Maßstabsbalken: 20µm.

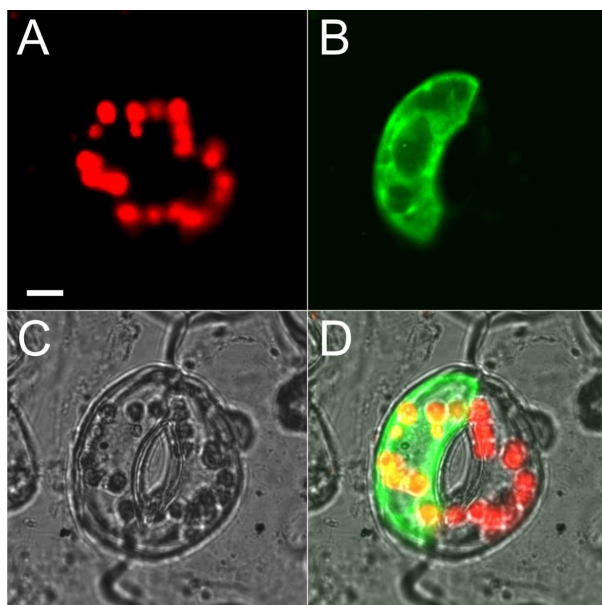


Abb. 26: Expression des murinen EGFP-TPCN1 in einer Schließzelle der Ackerbohne (*Vicia faba*). **A:** Autofluoreszenz der Chloroplasten in rot dargestellt. **B:** Fluoreszenz des EGFP-TPCN1. (grün) **C:** Durchlichtaufnahme. **D:** Überlagerung der Fotos A, B und C. Maßstabsbalken: 10µm.

3.6 Heterologe Expression in HEK293-Zellen und Konfokalmikroskopie

Um der Frage weiter nachzugehen, ob TPCN-Kanäle in der Plasmamembran oder in intrazellulären Membranen lokalisiert sind, wurden die schon in den vorherigen Experimenten erfolgreich eingesetzten EGFP-Kanal-Fusionsproteine im Vektor pcDNA3 erneut in der Zelllinie HEK293 zur Expression gebracht und dann deren Synthese und Verteilung in der Zelle durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Zellen wurden zwei bis drei Tage nach der Transfektion fixiert und unter einem Laser-Konfokalmikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) untersucht (Abb. 27).

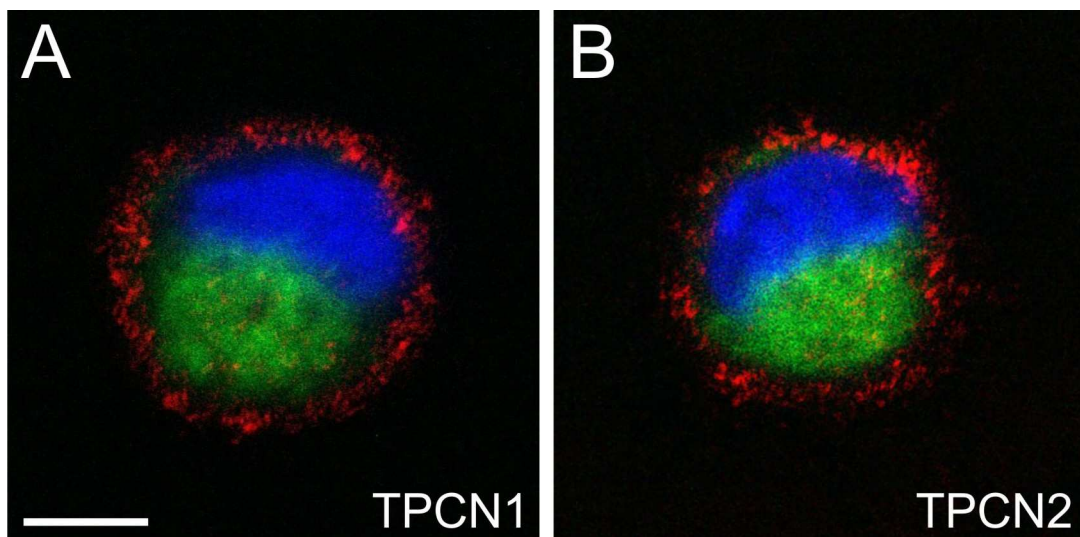


Abb. 27: Konfokale Mikroskopie von HEK293-Zellen zwei Tage nach der Transfektion von EGFP-Ionenkanal-Fusionskonstrukten im Vektor pcDNA3 (grün) und dem Membranmarker pECFP-Mem (rot). Unmittelbar vor der Fixierung wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 gefärbt (blau). **A:** Cotransfektion von EGFP-TPCN1 und CFP-Mem, **B:** Cotransfektion von EGFP-TPCN2 und CFP-Mem. Maßstabsbalken: 5 μ m.

Während das ECFP-Signal des Membranmarkers (hier in rot) deutlich die Plasmamembran der Zellen markiert, ist die EGFP-Fluoreszenz des EGFP-TPCN1 und des EGFP-TPCN2 jeweils weiter im Innern der Zelle lokalisiert. Es konnte bei der Auswertung der konfokalmikroskopischen Fotos keine Colokalisation zwischen ECFP- und EGFP-Signalen an der Plasmamembran festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob das Protein erst einige Tage nach seiner Synthese in die Plasmamembran eingebaut wird, wurde auch drei bis fünf

Tage nach der Transfektion mikroskopiert, was allerdings keinen Unterschied in der Verteilung der Fluoreszenz offenbarte.

3.7 Heterologe Expression in COS-7-Zellen und Immuncytochemie

Die folgenden Immuncytochemischen Experimente wurden ausschließlich mit COS-7-Zellen durchgeführt, da bei ihnen der Zellkern im Vergleich zur Gesamtzellgröße kleiner ist als z. B. bei HEK293-Zellen. So lassen sich in den COS-7-Zellen intrazelluläre Strukturen wie z. B. Organellen besser darstellen.

3.7.1 Immuncytochemische Untersuchung des Wildtyp TPCN2-Kanals

Die subzelluläre Lokalisation des TPCN2-Kanals war von besonderem Interesse und wurde mit der Methode der Immuncytochemie, bei der das Protein in der Zelle mit Antikörpern detektiert und visualisiert wird, noch detaillierter betrachtet. Zusätzlich wurden diverse Organellenmarker getestet und deren Verteilungsmuster in der Zelle mit dem des TPCN2-Kanals verglichen. Um den Wildtyp-TPCN2 ohne Modifikationen untersuchen zu können, wurde der selbst hergestellte und im Western Blot erfolgreich getestete Anti-TPCN2-Antikörper eingesetzt. Nach der Transfektion der COS-7-Zellen mit dem klonierten TPCN2 im pcDNA3-Vektor, konnte das TPCN2-Protein zwei Tage später mit sehr guter Spezifität detektiert werden (Abb. 28A, B).

Es zeigte wie das EGFP-TPCN2-Fusionsprotein in den HEK293-Zellen eine intrazelluläre Verteilung, jedoch war die Auflösung der Aufnahmen wesentlich besser. Das Fluoreszenzsignal war wie ein Netzwerk über das gesamte Zellinnere verteilt, meist um den Zellkern herum etwas intensiver als in der Nähe der Plasmamembran und erinnerte an die Morphologie des ER.

In Folgeexperimenten war das Ziel, die Colokalisation des TPCN2 mit Organellenmarkern zu untersuchen, um so eine klare Aussage über den Ort der TPCN2-spezifischen Fluoreszenz in der Zelle treffen zu können. Die Organellenmarker wurden zunächst an COS-7-Zellen getestet und in mehreren parallel durchgeführten Experimenten die optimalen experimentellen Bedingungen ermittelt. Für die Darstellung der Mitochondrien hat sich der Farbstoff MitoTracker CMX-Ros (Invitrogen) als optimal herausgestellt, da er die Mitochondrien in den COS-7-Zellen mit exzellenter Spezifität und Intensität anfärbte (Abb. 28C).

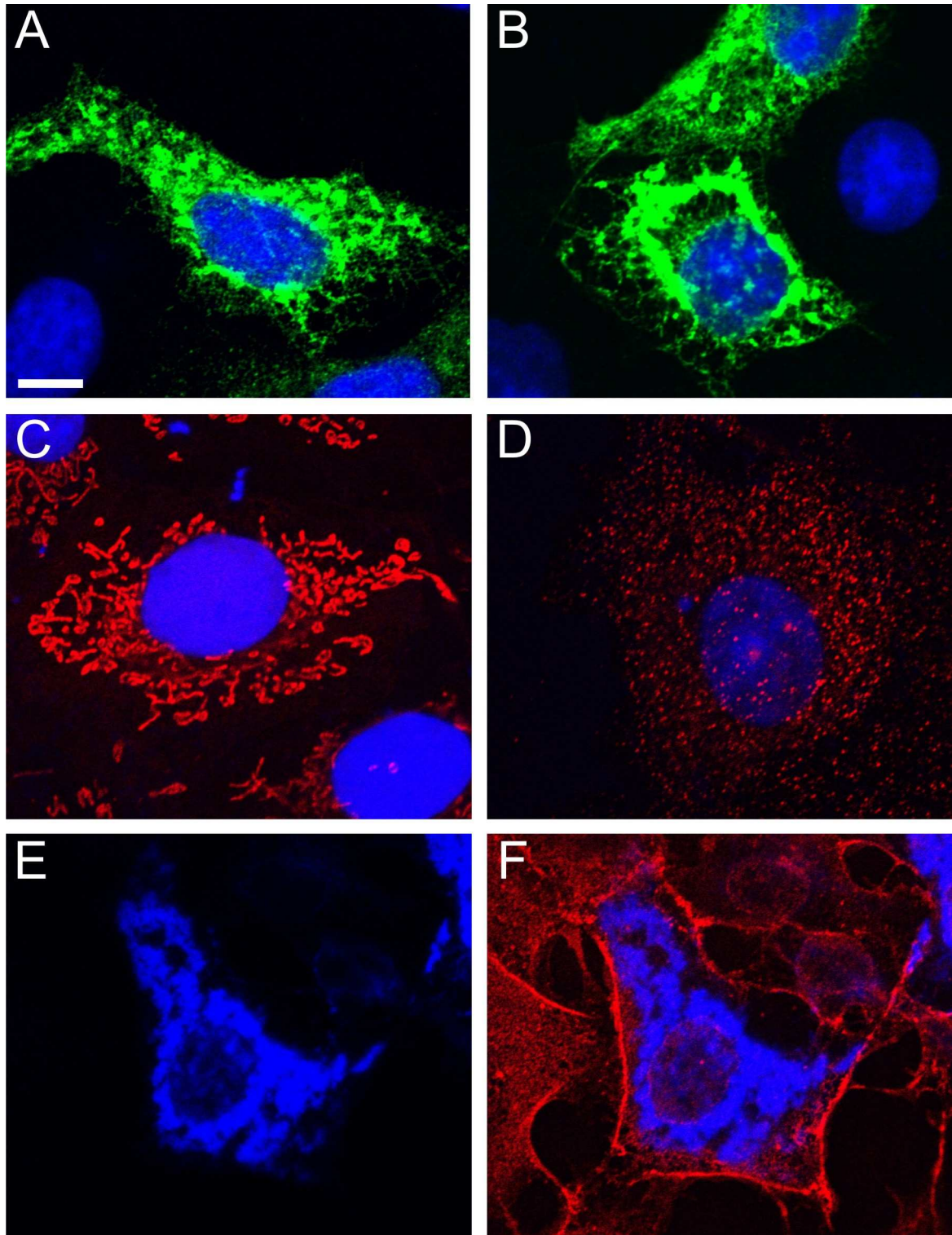


Abb. 28: Immunocytochemischer Nachweis des TPCN2-Proteins in COS-7-Zellen mit dem Konfokalmikroskop und Test diverser Organellenmarker. **A, B:** Detektion des murinen Wildtyp-TPCN2-Proteins in transfizierten Zellen mit einem selbstgenerierten spezifischen Antikörper und einem Cy3-Sekundärantikörper (grün). **C:** COS-7-Zellen nach Inkubation mit einem Mitochondrienmarker (MitoTracker[®] Red CMX-Ros, Invitrogen). **D:** Färbung der Lysosomen mit LAMP1-Antikörper (Abcam). **E:** Detektion des TPCN2 mit TPCN2-Primärantikörper und AMCA-Sekundärantikörper. **F:** Überlagerung der Fluoreszenz aus E mit der eines Membranmarkers (TRITC-WGA, Sigma). Maßstabsbalken: 10 μ m.

Die Lysosomen konnten am besten immunocytochemisch mit einem Antikörper gegen das lysosomenspezifische Protein LAMP1 (*lysosome associated membrane protein*) sichtbar gemacht werden (Abb. 28D). Für die Detektion des endoplasmatischen Reticulums (ER) gab es einen Anti-Calnexin-Antikörper, der mit mäßiger Spezifität an die Calnexin-Proteine in den COS-7-Zellen band (Abb. 29H).

Nach den erfolgreichen Tests wurden die Marker in COS-7-Zellen eingesetzt, die zuvor mit TPCN2 in pcDNA3 transfiziert worden waren. Zunächst wurde geprüft, ob der TPCN2-Kanal auch in der Plasmamembran vorkommt. Hierzu wurden die Membranen transfizierter Zellen mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff TRITC-WGA (Sigma) angefärbt und die TPCN2-Kanäle in diesem Fall mittels blauer AMCA-Fluoreszenz sichtbar gemacht (Abb. 28E, F). Es konnte bei der Konfokalmikroskopie keine Colokalisation zwischen dem Membranmarker und der TPCN2-spezifischen Fluoreszenz festgestellt werden.

Zwischen dem Mitochondrienmarker und dem TPCN2 gab es ebenfalls keine Colokalisation (Abb. 29A, B, C).

Das Lysosomenmuster sah grundsätzlich ganz anders aus als das des TPCN2 (Abb. 29D, E, F). Es kann aber nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, dass eine kleine Teilmenge an TPCN2-Proteinen auch in den Lysosomen vorkommt.

Schließlich konnte eine deutliche Colokalisation des TPCN2 mit dem Marker für das ER nachgewiesen werden (Abb. 29G, H, I). Der ER-Marker verursachte vereinzelt punktuelle unspezifische Färbungen, aber anhand der orangefarbenen Färbung in Abb. 29I wird deutlich, wie stark die beiden Fluoreszenzen überlappen. Das netzartige Muster des TPCN2-Proteins in der Zelle spricht ebenfalls für eine Lokalisation im ER.

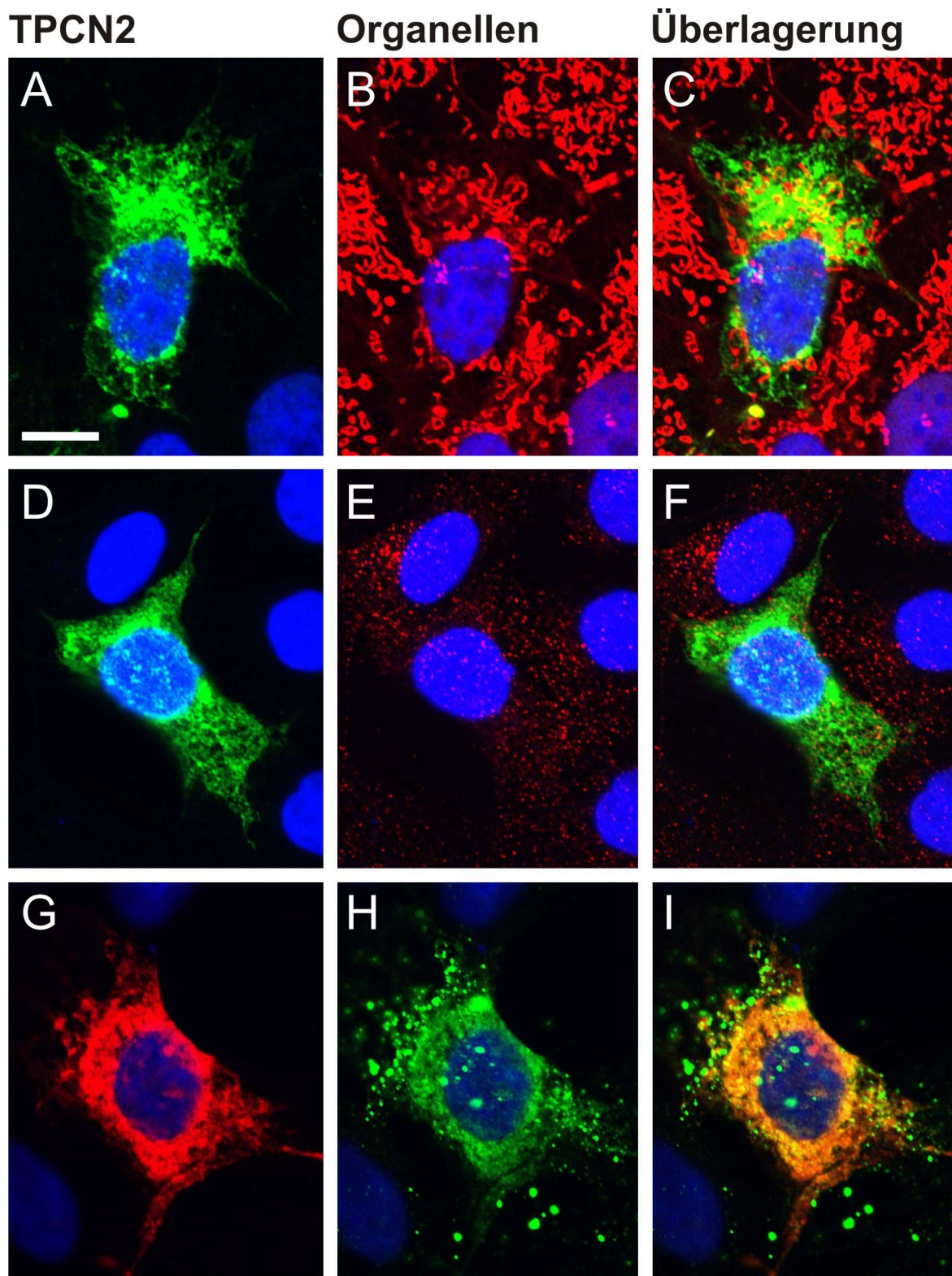


Abb. 29: Untersuchung der Lokalisation des TPCN2-Proteins mittels Immuncytochemie. **A, B, C:** Nachweis des TPCN2-Proteins (grün) und der Mitochondrien (rot). **D, E, F:** Nachweis des TPCN2 (grün) und der Lysosomen (rot). **G, H, I:** Nachweis des TPCN2 (rot) und des ER (grün). In A, C, D und F wurde das myc-TPCN2-Protein mit einem Cy2-Sekundärantikörper detektiert, in G und I der Wildtyp-TPCN2 mit einem Cy3-Sekundärantikörper. Das ER wurde mit einem Anti-Calnexin-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) und Cy2-Sekundärantikörper nachgewiesen. Maßstabsbalken: 10 μ m.

3.7.2 Immuncytochemische Untersuchungen auf Anwesenheit des TPCN2-Kanals in der Plasmamembran

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der TPCN2-Kanal nur in intrazellulären Kompartimenten transfizierter Zellen zu finden ist. Mit einem weiteren Experiment soll diese Hypothese überprüft werden.

Über immuncytochemische Versuche an nicht permeabilisierten Zellen, bei denen Antikörper nicht ins Zellinnere eindringen können, soll untersucht werden, ob potentiell vorhandene extrazelluläre Abschnitte von TPCN2-Proteinen detektierbar sind. Der TPCN2-Antikörper ist für dieses Experiment nicht geeignet, da er an den C-Terminus bindet, der aller Wahrscheinlichkeit nach auf der cytosolischen Seite liegt. So wurde in die erste Schleife zwischen dem ersten und zweiten Transmembransegment der ersten Domäne die Sequenz des Hämagglutinins (YPYDVPDYA) eingefügt. Dies wurde über eine Overlap-PCR erreicht, bei der jeder der beiden Overlap-Primer einen Teil der TPCN2- und einen Teil der HA-Sequenz enthielt (Primersequenzen siehe Anhang). Bei der Overlap-PCR überlappten die Sequenzen so, dass sie sich zur kompletten HA-Sequenz ergänzten und ein Produkt vom Anfang des TPCN2-Gens bis hinter die EcoRI-Schnittstellen entstand. Anschließend konnte die Wildtyp-Sequenz durch das PCR-Produkt mit HA-Sequenz über die Schnittstellen KpnI und EcoRI ersetzt werden.

Dieser mutierte TPCN2-Kanal (TPCN2-HA) konnte immuncytochemisch mit einem Anti-HA-Antikörper in transfizierten COS7-Zellen mit sehr guter Spezifität nachgewiesen werden und unterschied sich im Verteilungsmuster nicht vom Wildtyp-Kanal (Abb. 30A). Die eingefügte HA-Sequenz schien somit die Expression und Faltung des Proteins nicht gravierend zu beeinflussen und löste scheinbar keine Degradation des Proteins aus.

In einem Parallelansatz wurden die Zellen nicht permeabilisiert, ansonsten aber genau gleich behandelt, sodass der Antikörper nicht in die Zellen eindringen konnte. Es wurde eine große Zahl Zellen untersucht, es konnte jedoch niemals ein Fluoreszenzsignal an der Zelloberfläche beobachtet werden (Abb. 30B). Damit zeigt dieses Experiment sehr deutlich, dass das TPCN2-HA-Protein nicht in die Plasmamembran transfizierter COS-7-Zellen eingebaut wird und stattdessen ausschließlich in intrazellulären Organellenmembranen vorkommt. Bei den Kontrollreaktionen ohne Primärantikörper

konnte bei permeabilisierten Zellen eine unspezifische Färbung der Zellkerne beobachtet werden (Abb. 30D), die aber das Resultat der Experimente nicht beeinflusst.

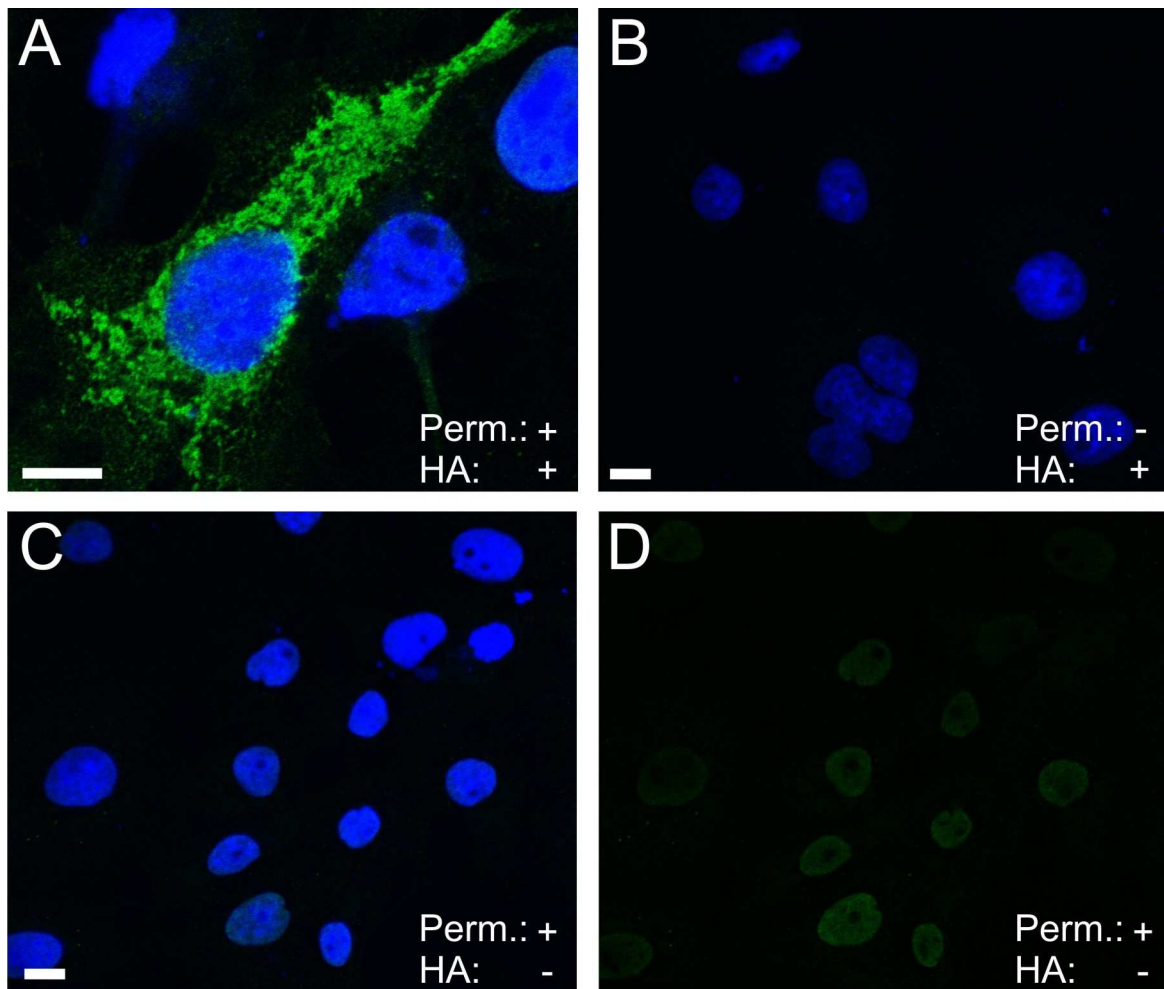


Abb. 30: Immuncytochemie zum Test auf Oberflächenexpression eines TPCN2-Proteins mit integrierter HA-Sequenz (TPCN2-HA). **A:** Eine standardmäßig durchgeführte Immuncytochemie mit permeabilisierten COS-7-Zellen konnte das transfizierte TPCN2-HA-Protein nachweisen. Das Fluoreszenzmuster unterschied sich nicht von dem des Wildtyp-Kanals. Eingesetzt wurde ein Anti-HA Primärantikörper (Cell Signaling) und ein Cy2-Sekundärantikörper. **B:** Bei nicht permeabilisierten und ansonsten genauso behandelten Zellen konnte kein TPCN2-HA-Protein nachgewiesen werden. **C, D:** Kontrollexperiment zum Test der Spezifität des Sekundärantikörpers. Permeabilisierte Zellen wurden genauso behandelt wie bei den anderen Experimenten, mit dem einzigen Unterschied, dass kein Primärantikörper zugegeben wurde (**C:** Überlagerung aus Hoechst 3342- und Cy2-Fluoreszenz, **D:** nur Cy2 Fluoreszenz). Maßstabsbalken: 10 μm .

3.7.3 Immuncytochemische Untersuchung gezielt mutierter TPCN2-Kanäle

In der Aminosäuresequenz des TPCN2 gibt es einige potenzielle ER-Rückhaltesignale, die in Folgeexperimenten durch Mutationen bzw. Trunkationen entfernt wurden. Die daraus folgende Lokalisation der TPCN2-Kanäle in der Plasmamembran hätte experimentelle Vorteile. So würden z. B. elektrophysiologische Messungen an der Plasmamembran mittels Patch-Clamp ermöglicht. Zweitens ist nicht sicher, ob die subzelluläre Lokalisation in den COS-7-Zellen der *in vivo* Situation entspricht, oder ob möglicherweise in nativen Zellen der Maus die Rückhaltesignale z. B. durch Cofaktoren maskiert sind.

Als erstes wurde ein mögliches ER-Rückhaltmotiv aus drei Argininen (RRR) in der cytosolischen Schleife zwischen den beiden Domänen gefunden. Studien an anderen Ionenkanälen und an einem G-Protein gekoppelten Rezeptor bewiesen, dass derartige RXR-Motive (R: Arginin, X: großer neutraler oder positiv geladener Aminosäurerest) für einen Rückhalt von Proteinen im ER verantwortlich sein können (Zerangue et al., 1999; Margeta-Mitrovic et al., 2000). Auch ein Sequenzmotiv aus fünf hintereinanderliegenden Argininen (RRRRR) konnte für ER-Retention verantwortlich gemacht werden (Ren et al., 2003). Aufgrund dieser Datenlage erschien es möglich, dass auch das RRR-Motiv des TPCN2-Kanals den intrazellulären Transport steuert.

Durch eine gezielte Mutation an der cDNA-Sequenz wurden die drei Arginine durch drei Alanine (AAA) ersetzt. Diese Mutante, TPCN2-AAA genannt, wurde dann mittels Immuncytochemie auf ihre subzelluläre Verteilung und mögliche Präsenz in der Plasmamembran untersucht. Es konnte jedoch keine Colokalisation mit einem Membranmarker und nach vergleichender Betrachtung vieler immuncytochemisch gefärbter Zellen auch kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden (nicht gezeigt). Weiterhin wurde bei der GFP-TPCN2-AAA-Mutante geprüft, ob ein Transport zu den Lysosomen stattfand, was jedoch scheinbar nicht der Fall war (Abb. 31A, D, G).

Bei der Überprüfung der Aminosäuresequenz des N- und C-Terminus wurden weitere potentielle Rückhalte- bzw. Rücktransportsignale gefunden. So gab es sowohl im N- als auch im C-Terminus des TPCN2-Kanals Di-Leucin-Motive, von denen bekannt ist, dass sie die Internalisierung und Rückführung von Plasmamembranproteinen zu intrazellulären

Kompartimenten vermitteln können (Ren et al., 2003). Jedoch gibt es keine eindeutigen, allgemeingültigen Consensus-Sequenzen für Rückhalte- und Rücktransportsignale und es könnten theoretisch auch noch ganz andere unbekannte Sequenzmotive die Lokalisation des TPCN2 im ER bewirken. So wurde – um sicherzugehen – bei zwei weiteren TPCN2-Mutanten mittels PCR-Klonierung zum einen der gesamte N-Terminus, zum anderen der gesamte C-Terminus des EGFP-TPCN2-Fusionsprotein entfernt. Hier konnte nur mit dem EGFP gearbeitet werden, da ein TPCN2-Kanal ohne C-Terminus nicht mehr von dem Anti-TPCN2-Antikörper detektiert würde.

Diese beiden Mutanten zeigten bei der Konfokalmikroskopie keinen signifikanten Unterschied in der subzellulären Verteilung gegenüber dem Wildtyp (Abb. 31B, C) und keine Colokalisation mit einem Membranmarker (nicht gezeigt). Die Mutanten konnten auch nicht in den Lysosomen nachgewiesen werden (Abb. 31H, I). Diese Befunde zeigen einerseits, dass die Mutationen die Expression und den Einbau in die Membran des ER nicht beeinträchtigen. Zum anderen scheint es nicht nur ein einzelnes Rückhaltesignal in den cytosolischen Sequenzabschnitten des Kanals zu geben, sondern mehrere, die sich gegenseitig kompensieren können. Um dies restlos aufzuklären und einen Transport zur Plasmamembran zu erzwingen, müssten weitere Mutanten mit noch mehr mutierten Sequenzabschnitten generiert werden, bei denen dann jedoch fraglich wäre, ob sie noch korrekt gefaltet wären, da sie kaum noch Ähnlichkeit mit dem Wildtyp-Kanal hätten.

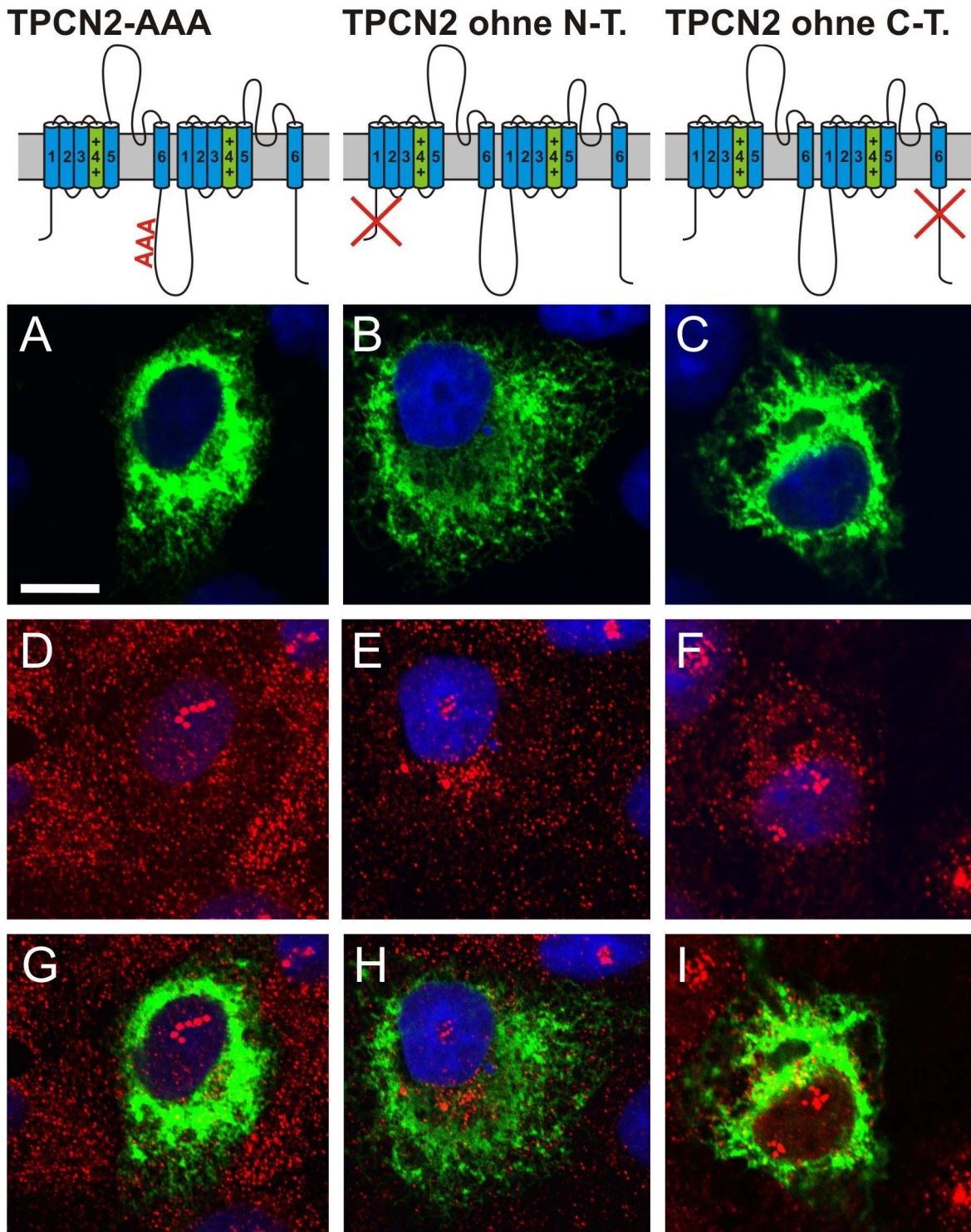


Abb. 31: Konfokalmikroskopischer Nachweis fluoreszierender TPCN2-Mutanten in COS-7-Zellen nach einer immuncytochemischen Detektion des Lysosomenmarkers LAMP1. Oben sind die Mutanten schematisch dargestellt. **A, D, G:** Nachweis des EGFP-TPCN2-AAA-Proteins durch Anregung des EGFP (grün) und der Lysosomen mit LAMP1-Antikörper und Cy3-Sekundäntikörper (rot). **B, E, H:** Nachweis des EGFP-TPCN-Proteins ohne N-Terminus und der Lysosomen. **C, F, I:** Nachweis des EGFP-TPCN-Proteins ohne C-Terminus und der Lysosomen. Maßstabsbalken: 10 μ m.

3.8 Nachweis der TPCN-Kanäle im Mausgewebe mittels *in situ* Hybridisierung

Die RT-PCR- und Northern Blot-Experimente zu Beginn der Arbeit zeigten, dass die Transkripte der TPCN-Kanäle in sehr vielen verschiedenen Geweben und Organsystemen präsent sind. Um die Lokalisation der TPCN-Kanäle genauer studieren zu können, wurden *in situ* Hybridisierungen an Gewebeschnitten durchgeführt.

Für die Herstellung spezifischer Sonden für die *in situ* Hybridisierung wurde für den TPCN1-Kanal mit einer PCR ein 579 bp langes Stück amplifiziert und 471 bp davon über die Restriktionsschnittstellen XbaI und EcoRI in den Vektor pBluescript II SK(-) kloniert. Für die TPCN2-Sonde wurde ein 424 bp langes Stück der cDNA mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI ausgeschnitten und ebenfalls in den Vektor pBluescript II SK(-) subkloniert. Der Vektor besitzt in 5'-Richtung vor der MCS den Promoter für die T7- und in 3'-Richtung von der MCS den Promoter für die T3-RNA-Polymerase. Zur Herstellung von *Sense*- und *Antisense*-Sonden wurde der Vektor jeweils vor dem entsprechenden Promoter linearisiert, um zu gewährleisten, dass nur die inklonierte spezifische Sequenz transkribiert wird (Tab. 6).

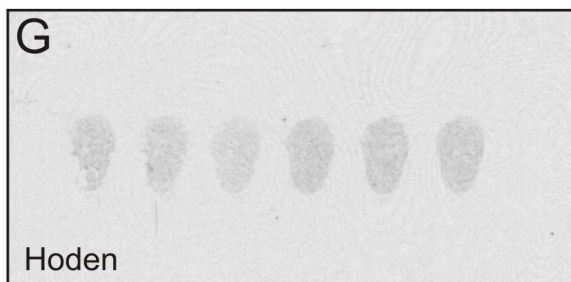
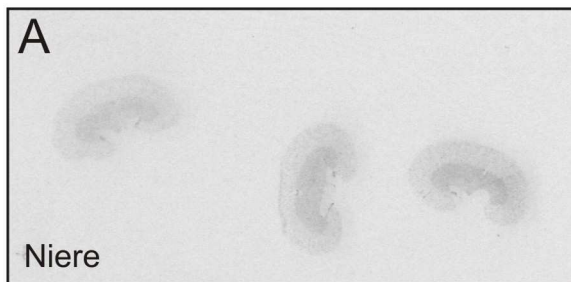
Sonde	Restriktionsverdau	RNA-Polymerase
TPCN1-antisense	Xba I	T7
TPCN1-sense	EcoR I	T3
TPCN2-antisense	Hind III	T7
TPCN2-sense	Xho I	T3

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme und RNA-Polymerasen für die Herstellung der Sonden für *in situ* Hybridisierungen.

Bei der *in situ* Hybridisierung von Nieren-Schnitten mit der TPCN2-*Antisense*-Sonde gab es eine starke Hybridisierung in der inneren Medulla und eine schwächere Hybridisierung in der äußeren Medulla und dem Cortex (Abb. 32A, Abb. 33B). Diese schwächeren Signale sind aber auch spezifisch, was im Vergleich mit den gleich behandelten und mit der *Sense*-Sonde hybridisierten Schnitten deutlich wird. Diese zeigten überhaupt kein Signal (Abb. 32B). Bei den hybridisierten Hirn-Schnitten gab es ein deutliches, spezifisches Signal im Cerebellum (Abb. 32C, D, Abb. 33A). Weiterhin wurden mit der

TPCN2-Sonde Schnitte aus Milz und Hoden untersucht, die beide deutliche, spezifische Signale zeigten (Abb. 32E-H). Diese Resultate bestätigen die Northern Blots, bei denen die TPCN2-mRNA ebenfalls in diesen Geweben nachgewiesen werden konnte.

TPCN2 antisense



TPCN2 sense

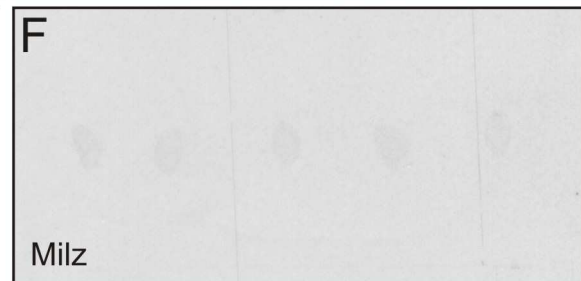
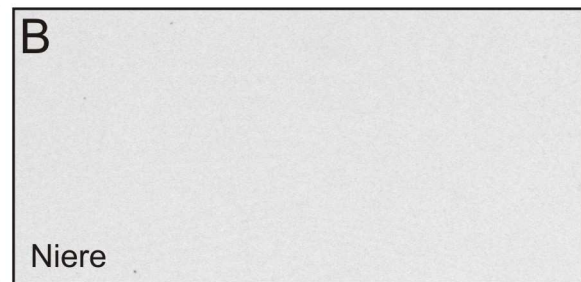


Abb. 32: Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung zur Detektion der TPCN2-mRNA in diversen Organen. Jeweils 16 μm dicke Kryoschnitte wurden mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die Hybridisierungssignale wurden durch Auflegen eines Films (Kodak BioMax) für jeweils sieben Tage detektiert. **A, B:** Hybridisierung mit Nierenschnitten, **C, D:** Hybridisierung mit Gehirn-Schnitten, **E, F:** Hybridisierung mit Milz-Schnitten, **G, H:** Hybridisierung mit Hoden-Schnitten. Die Hybridisierungen mit der Sense-Sonde (B, D, F und H) dienten als Negativkontrolle.

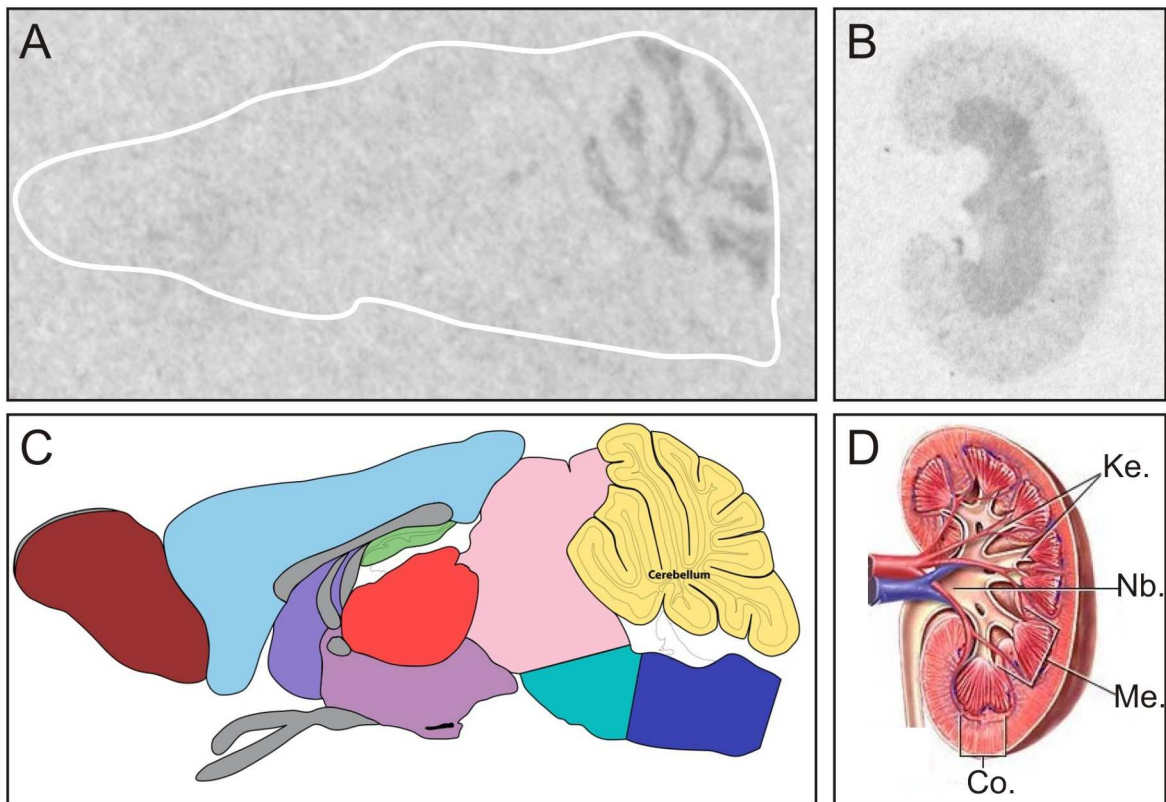


Abb. 33: Interpretation der Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung mit der TPCN2-Antisense-Sonde. **A:** Hirnschnitt hybridisiert mit der TPCN2-Antisense-Sonde. **B:** Nierenschnitt hybridisiert mit der TPCN2-Antisense-Sonde. **C:** Schematische Darstellung eines Querschnitts durch das Mäusehirn. Der hybridisierte Bereich in A entspricht exakt dem Cerebellum (gelber Bereich). **D:** Schematische Darstellung einer aufgeschnittenen Niere. Die starke Hybridisierung (dunkle Färbung bei B) erstreckt sich nicht über die gesamte Medulla, sondern nur über den inneren Bereich (Co.: Cortex, Me.: Medulla, Nb.: Nierenbecken, Ke.: Kelche). Abb.C modifiziert von www.gensat.org, Abb. D modifiziert von www.nlm.nih.gov

Ausgewählte Schnitte, bei denen es deutliche Signale auf dem Film gab, wurden anschließend mit einer Filmemulsion behandelt, die bei radioaktiver Bestrahlung Silberkörnchen direkt im Gewebe erzeugt. So können die Hybridisierungssignale genauer als beim Film einzelnen Gewebestrukturen bzw. Zellen zugeordnet werden. Abb. 34 legt die Ergebnisse von Hirnschnitten, die mit der TPCN2-Antisense-Sonde hybridisiert wurden, nach einer vierwöchigen Inkubation mit der Emulsion dar. Die Hellfeldaufnahmen zeigen das Gewebe nach HE-Färbung, bei den Dunkelfeldaufnahmen fallen die Silberkörnchen als helle Punkte auf. Abb. 35 zeigt die mit der TPCN2-Antisense-Sonde hybridisierten Nierenschnitte, die genauso wie die Hirnschnitte behandelt und ausgewertet wurden.

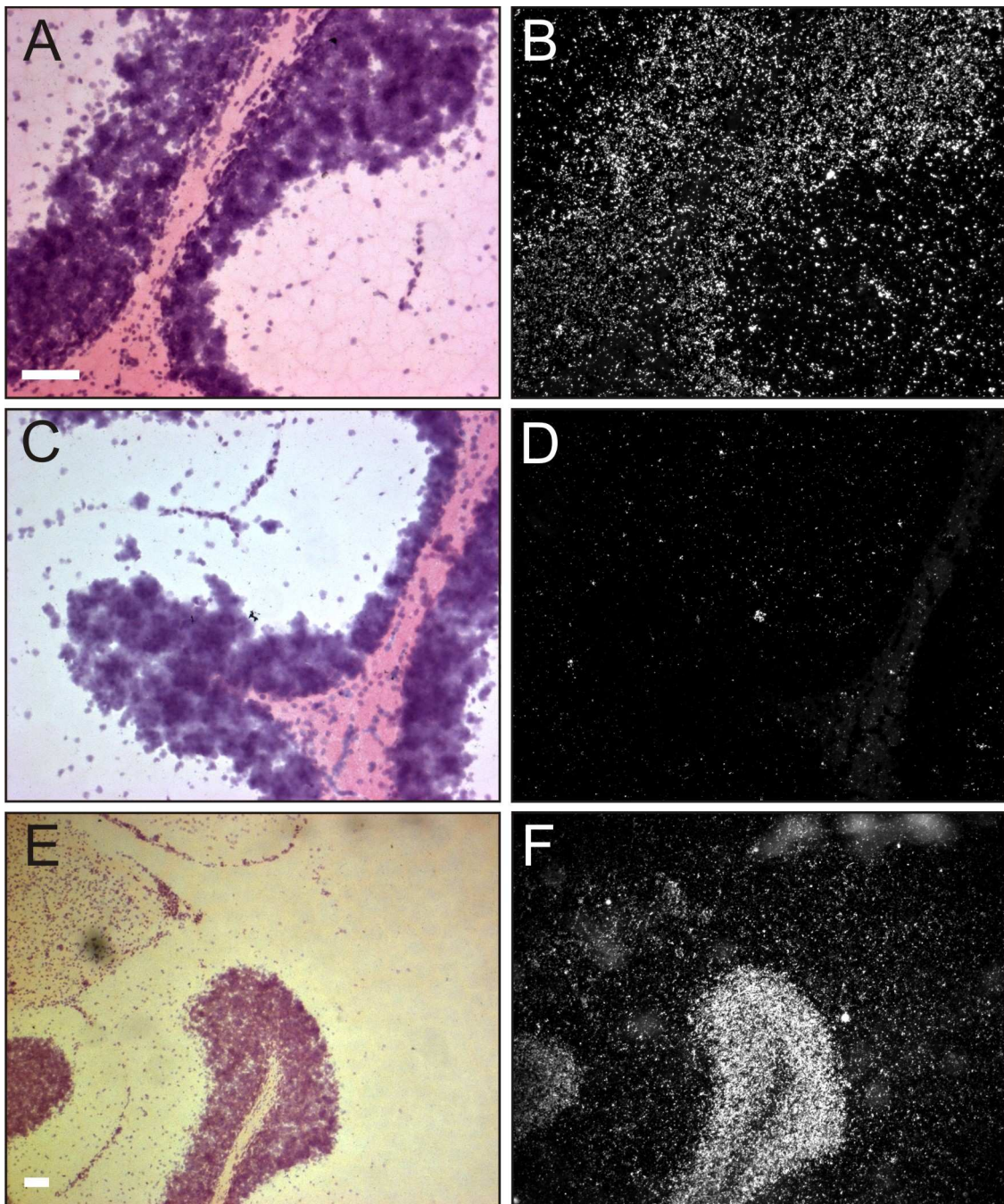


Abb. 34: Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung zur Detektion der TPCN2-mRNA in Hirnschnitten nach der Behandlung mit einer Filmemulsion. **A, B:** Hybridisierung eines Hirnschnitts mit der TPCN2-*Antisense*-Sonde (A: Hellfeld-, B: Dunkelfeldaufnahme). **C, D:** Hybridisierung mit der TPCN2-*Sense*-Sonde als Negativkontrolle. **E, F:** Hybridisierung mit der TPCN2-*Antisense*-Sonde, Mikroskopie bei niedrigerer Vergrößerung. Maßstabsbalken: 100 μ m.

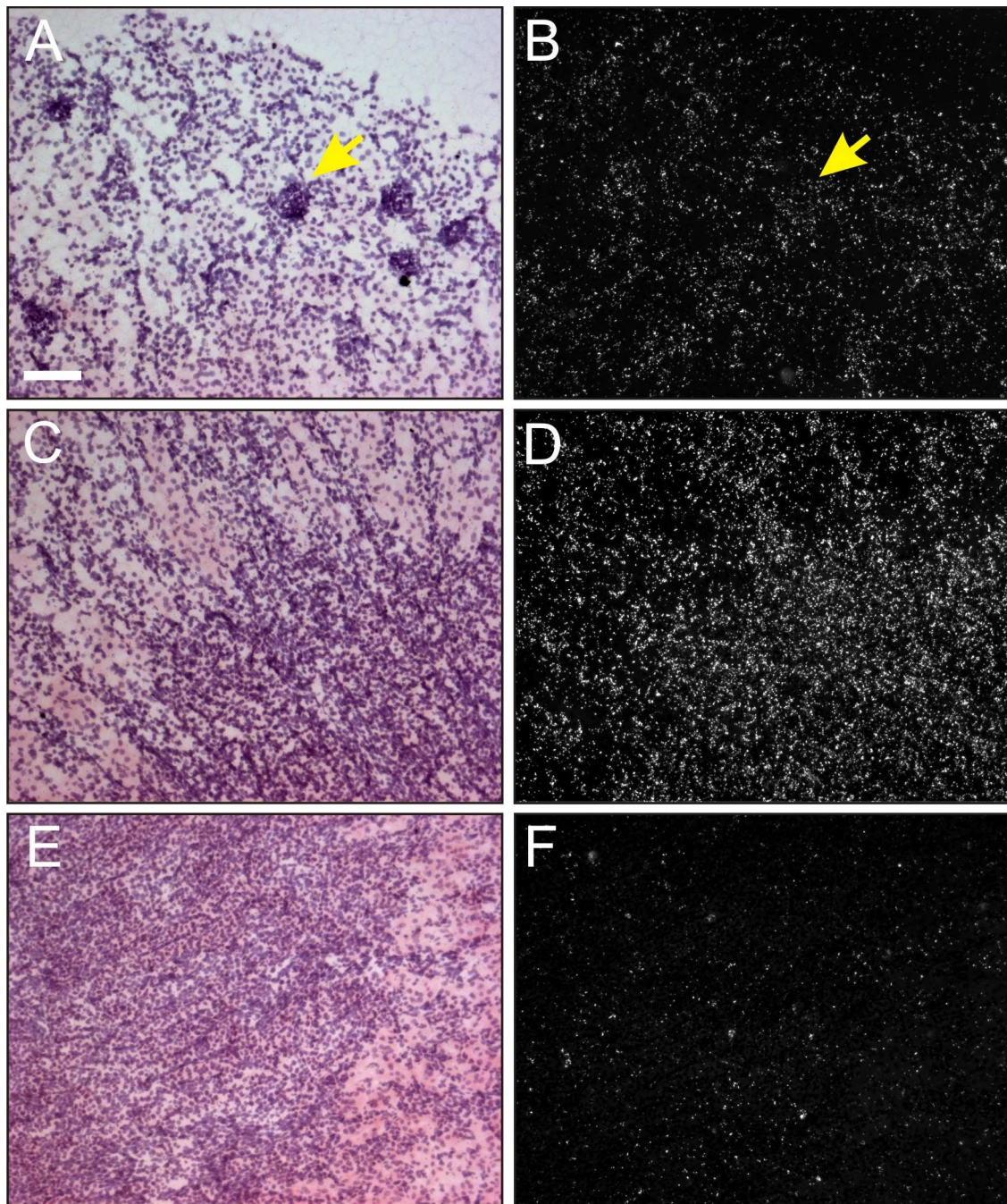
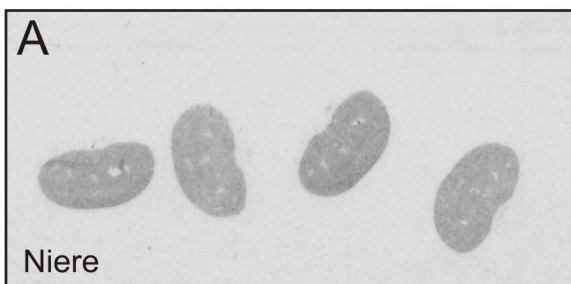


Abb. 35: Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung zur Detektion der TPCN2-mRNA in Nierenschnitten nach der Behandlung mit Filmemulsion. **A, B:** Signale der TPCN2-Antisense-Sonde in der Nierenrinde. Gut erkennbar sind die Glomeruli (Pfeil) bei denen es jedoch kein signifikant stärkeres Signal gegenüber dem umgebenden Gewebe gibt. **C, D:** Signale der TPCN2-Antisense-Sonde in der Übergangszone zwischen äußerem Mark (oben) und innerem Mark (rechts unten) (A, C: Hellfeld-, B, D: Dunkelfeldaufnahme). **E, F:** Hybridisierung mit der TPCN2-Sense-Sonde als Negativkontrolle, ebenfalls in der Übergangszone zwischen äußerem Mark (rechts) und innerem Mark (links). Maßstabsbalken: 100 μm .

Weitere Gewebeschnitte des Gehirns und der Niere wurden mit den TPCN1-Sonden untersucht. Die *Antisense*-Sonden für TPCN1 zeigten in diesen Organen ein insgesamt stärkeres Signal als die des TPCN2 (Abb. 36A, C), was im Einklang mit den Ergebnissen aus den Northern Blots steht, wo auch jeweils die TPCN1-spezifischen Signale stärker waren.

Die Hybridisierung der TPCN1-*Antisense*-Sonde in der Niere war über den gesamten Schnitt gleich intensiv, es fielen keine besonderen strukturellen Muster auf. Im Hirn war die Hybridisierung im Bereich des Cerebellums am intensivsten, im Gegensatz zum Experiment mit der TPCN2-spezifischen Sonde waren aber auch Hybridisierungen in den anderen Regionen des Gehirns detektierbar.

TPCN1 antisense



TPCN1 sense

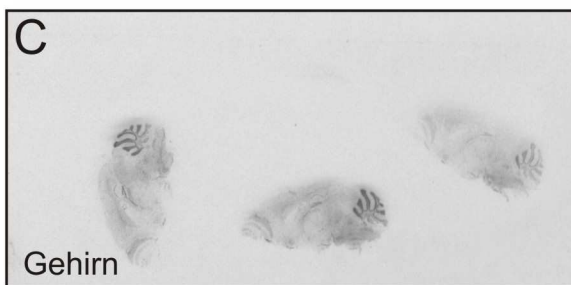
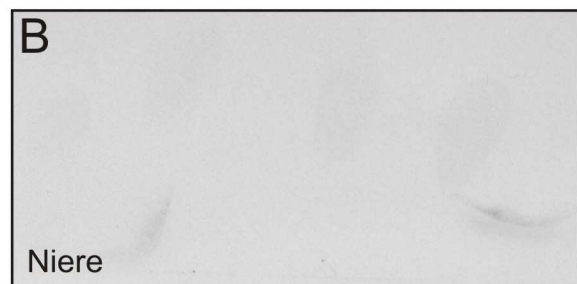


Abb. 36: Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung zur Detektion der TPCN1-mRNA. 16 μ m dicke Kryoschnitte von Mäuse-Gehirn und -Niere wurden mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. **A, B:** Hybridisierung mit Nierenschnitten, **C, D:** Hybridisierung mit Gehirn-Schnitten. Die Hybridisierungen mit der TPCN1-*Sense*-Sonde (B, D) dienen als Negativkontrolle.

3.9 Ausarbeitung einer Gentergeting-Strategie zur Inaktivierung des TPCN2-Gens in der Maus

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Herstellung eines Gentergetingvektors, der eine gezielte Inaktivierung des TPCN2-Gens unter Einsatz des Cre-LoxP-Systems (Orban et al., 1992, Gu et al., 1994) ermöglicht. Ein solcher Targetingvektor enthält Sequenzbereiche, die zu Abschnitten des Zielgens homolog sind und über homologe Rekombination eine gezielte Integration der Targetingvektorsequenz in das Zielgen ermöglichen (Smithies et al., 1985; Thomas & Capecchi, 1987, Rajewsky et al., 1996). Weiterhin enthält der Vektor den zu verändernden codierenden Genabschnitt (Exon) des Zielgens, der von LoxP-Sequenzen flankiert ist. Bei den LoxP-Sequenzen handelt es sich um Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase. Je nach Orientierung der beiden LoxP-Sequenzen zueinander wird der dazwischenliegende Genbereich von der Rekombinase entweder deletiert oder invertiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Targetingvektor so konstruiert, dass das Exon 7 des TPCN2-Gens von zwei LoxP-Sequenzen in gleichgerichteter Anordnung flankiert ist. Dies führt bei einer Rekombinaseaktivität zu einer Deletion des Exons. Das Exon 7 wurde für das Targeting aus zwei Gründen ausgewählt: Erstens weil es einen Großteil des fünften Transmembransegments und einen Teil des *Pore Loops* der ersten Domäne codiert und somit essentiell für die Struktur und Funktion des TPCN2-Proteins ist und zweitens weil die Cre-vermittelte Deletion des Exons zu einer Verschiebung des Leserasters und einem frühzeitigen Translationsstop bei der Synthese des TPCN2-Proteins führt, da ein vorzeitiges Stopcodon entsteht. Aus einem derart mutierten TPCN2-Allel resultiert somit nur der aminoternale Teil des TPCN2-Proteins ohne Porenregionen und ohne die charakteristische Struktur aus sechs Transmembransegmenten. Mit der Deletion eines einzigen Exons wird also sichergestellt, dass nach der Deletion kein funktionsfähiger Ionenkanal mehr entstehen kann. Das Exon kann in den embryonalen Stammzellen, die das mutierte Allel aus dem Targetingvektor tragen, durch Transfektion mit einem Cre-Rekombinase-Plasmid deletiert werden. Dies führt zu einem totalen Knockout des TPCN2-Gens in der aus der Stammzelle resultierenden Maus. Alternativ kann das Exon in rekombinanten Mäusen durch Einkreuzung von Cre-Rekombinase-Mauslinien entfernt werden (Abb. 37). Letzteres wurde in dieser Arbeit angewendet.

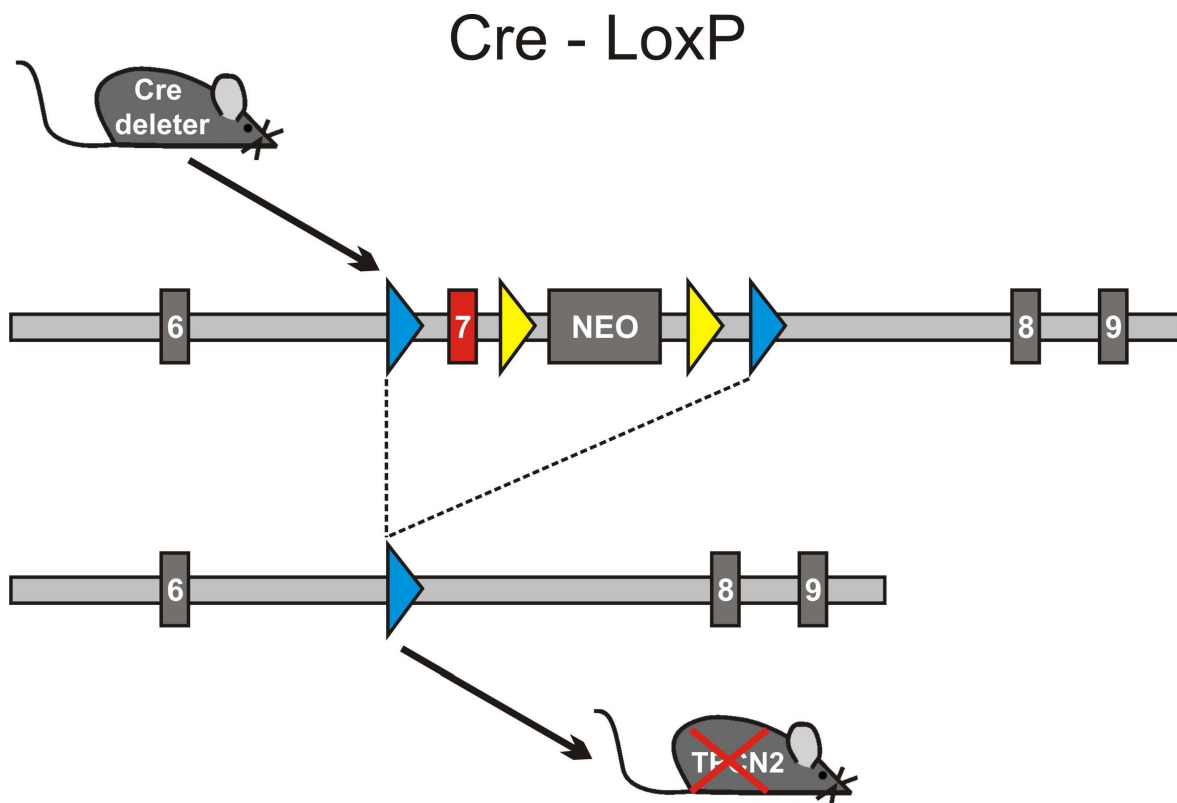


Abb. 37: Schematische Darstellung des TPCN2-Genlocus nach Integration des Targetingkonstrukts (oben) und dessen Veränderung nach Verpaarung mit einer Cre-Deleter-Maus (unten). Bei den Nachkommen dieser Verpaarung entfernt die Cre-Rekombinase sowohl das Exon 7 des TPCN2 als auch die Neomycin-Resistenzkassette aus dem Genom. Diese Mäuse besitzen ein Allel mit defektem TPCN2-Gen. Werden zwei derartige Mäuse miteinander verpaart, dann können homozygote Mäuse entstehen, bei denen auf beiden Allelen das TPCN2-Gen defekt ist (Knockout-Mäuse, $TPCN2^{-/-}$).

Der Vektor enthält weiterhin FRT-Sequenzen, Erkennungssequenzen für die Flp-Rekombinase, die nach dem gleichen Prinzip wie die LoxP-Sequenzen funktionieren. Über sie kann die Neomycin-Resistenzkassette, die das Gen der Neomycinphosphotransferase enthält und eine Positivselektion von rekombinanten Stammzellklonen ermöglicht (Thomas & Capecchi, 1987; Mansour et al., 1988), entfernt werden (Abb. 38). Die Neomycin-Resistenzkassette in einem Genlocus kann sich negativ auf die Expression benachbarter Gene auswirken (Rajewsky et al., 1996) und so unerwünschte, nicht unmittelbar mit der Ausschaltung des Zielgens verbundene Sekundäreffekte in der Knockout-Maus erzeugen. Aus diesem Grund wird sie in der Regel nach dem Targeting entfernt.

In diesem Targetingvektor wird das Gen der Thymidinkinase (TK) aus dem *Herpes simplex* Virus als Negativselektor (Mansour et al., 1988) eingesetzt. Beim

Stammzelltargeting wird der Targetingvektor an einem Ende der Homologie linearisiert. Um zu vermeiden, dass am anderen Ende nach der Homologie auch noch Teile des Vektors mit integriert werden, setzt man die TK an dieses Ende der Homologie. Denn in allen Zellen, bei denen die TK mit integriert wurde, entfaltet das TK-Gen nach Zugabe der Nucleotidanaloga Gancyclovir oder Acyclovir seine Wirkung. Die Nucleotidanaloga werden phosphoryliert, in die DNA eingebaut und schädigen auf diese Weise die Zellen.

Die Strategie zur Herstellung des Vektors wird nachfolgend kurz zusammengefasst und dann in den weiteren Kapiteln Schritt für Schritt ausführlicher dargelegt. Erst wurden der 5'-Homologiebereich, der 3'-Homologiebereich sowie der zentrale Genabschnitt mit Exon 7 parallel in separaten Klonierungsschritten kloniert. Hierzu wurden die Sequenzabschnitte mittels PCR aus genomischer ES-Zell-DNA bzw. PAC-Klon-DNA amplifiziert und über Restriktionsschnittstellen in der Sequenz in drei separate Vektoren subkloniert. Die verwendeten Vektoren waren selbst generierte Hilfsvektoren, die die erforderlichen Restriktionsschnittstellen sowie die LoxP- und FRT-Sequenzen enthielten. Die subklonierten Fragmente wurden anschließend zusammenkloniert und schließlich noch die Gensequenzen der Neomycin-Resistenzkassette der Thymidinkinase (TK) eingebaut.

Durch den Einsatz von sowohl LoxP-Sequenzen als auch FRT-Sequenzen können mit dieser Gtargeting-Strategie zwei verschiedenen Mauslinien generiert werden:

Erste Mauslinie: TPCN2^{-/-}

Bei dieser Mauslinie wird das Exon Nr. 7 zusammen mit der Neomycin-Resistenzkassette schon in der rekombinanten Stammzelle mit dem Cre/LoxP-System deletiert (Abb. 37). Somit fehlt das funktionelle TPCN2-Protein schon in der frühen Embryonalentwicklung und es entsteht eine Maus, bei der das Protein in keiner einzigen Zelle funktionell und damit aktiv ist.

Zweite Mauslinie: TPCN2^{flox/flox}

Bei dieser Mauslinie wird in der rekombinanten Stammzelle nur die von den FRT-Sequenzen flankierte Neomycin-Resistenzkassette entfernt, während die das Exon 7 flankierenden LoxP-Sequenzen erhalten bleiben (Abb. 38). Da die LoxP-Sequenzen in Intronbereichen liegen, haben sie keinen Einfluss auf das resultierende Protein und aus der Stammzelle entwickelt sich eine scheinbar normale Maus. Diese gefloxtete Maus wäre sehr vorteilhaft für den Fall, dass das TPCN2-Gen essentiell für die Embryonalentwicklung und

ein Totalknockout embryonal letal sein sollte. Wird die $TPCN2^{\text{flox/flox}}$ -Maus mit transgenen Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase zelltypspezifisch exprimieren, ist bei den Nachkommen dieser Verpaarung das $TPCN2$ -Gen nur in definierten Zelltypen inaktiviert. Weiterhin kann das $TPCN2$ -Gen zeitkontrolliert ausgeschaltet werden, z. B. erst in der adulten Maus (Rajewsky et al., 1996).

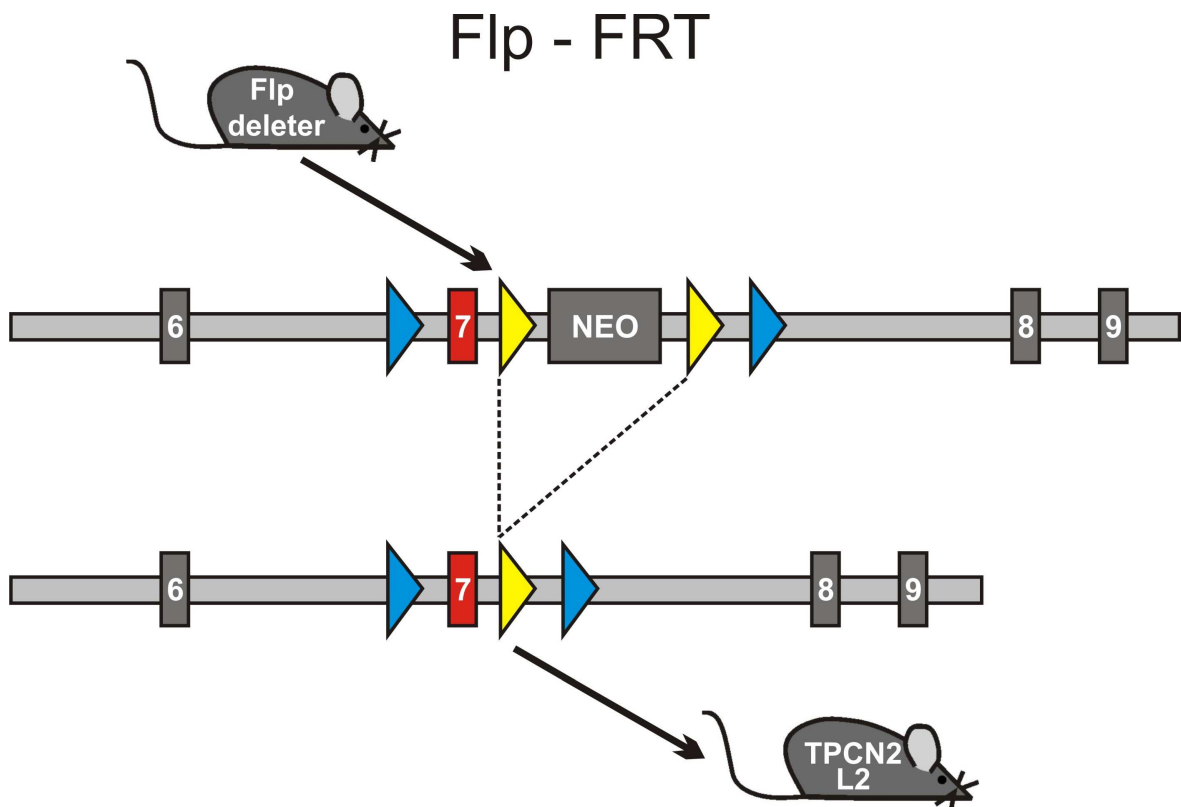


Abb. 38: Schematische Darstellung des $TPCN2$ -Genlocus nach Integration des Targetingkonstrukts (oben) und dessen Veränderung nach Verpaarung mit einer Flp-Deleter-Maus (unten). In den Nachkommen der Verpaarung deletiert die Flp-Rekombinase nur die Neomycin-Kassette, während das von LoxP-Sequenzen flankierte Exon 7 des $TPCN2$ -Gens erhalten bleibt. Phänotypisch bleiben auch homozygote Mäuse ($TPCN2$ -L2, $TPCN2^{\text{flox/flox}}$) normal, da das $TPCN2$ -Gen weiterhin normal transkribiert wird.

3.9.1 Detektion der genomischen Sequenz des $TPCN2$ -Kanals

Für die Herstellung des Targetingvektors und zum Testen der Southern Blot Sonden wurde genomische DNA benötigt. Sie wurde aus einer genomischen Maus-DNA-Bibliothek (*mouse PAC library RPC121*) (Osoegawa et al., 2000) erhalten. Diese Bibliothek bestand aus etwa 129000 Klonen, die jeweils durchschnittlich 147 kb des Mausgenoms in dem Vektor pPAC4 (Frengen et al., 2000) enthielten. Mit Hilfe von sieben Filtermembranen (Fa. Geneservice Ltd., Cambridge, England), auf denen die DNA jedes Klons in Form

kleiner Punkte doppelt aufgetragen war, konnte mit radioaktiven Sonden ein bestimmter Klon, d. h. ein bestimmter Abschnitt des Mausgenoms identifiziert werden. Die identifizierten PAC-DNA-Klone wurden dann in kommerziell erhältlichen transformierten Bakterien (ebenfalls Fa. Geneservice Ltd.) bestellt und im eigenen Labor isoliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Filtermembranen mit einer 330 bp langen DNA-Sonde hybridisiert, die gegen das Exon 7 des TPCN2-Gens und dessen flankierenden Intronsequenzen gerichtet war. Die Sondenherstellung und Hybridisierung wurde wie bei einem Southern Blot durchgeführt und es konnten nach der Hybridisierung zwei positive PAC-Klone mit den Identifikationsnummern 394-I14 bzw. 396-G1 detektiert werden. PCR-Analysen und Sequenzierungen bestätigten, dass in beiden der genomische Bereich mit dem TPCN2-Gen enthalten war. Die Sequenzierungen offenbarten außerdem, dass der Klon Nr. 394-I14 insgesamt 117170 bp des Mausgenoms enthielt und sich das TPCN2-Gen von Position 71943 bis Position 101231 erstreckte, also komplett enthalten war. Somit war dieser Klon optimal für die folgenden Arbeitsschritte geeignet und es wurde nur noch mit ihm weitergearbeitet, indem er als Matrize für PCR-Reaktionen für die Konstruktion des Targetingvektors sowie zum Test der Southern Blot Sonden eingesetzt wurde.

3.9.2 Klonierung der homologen Bereiche des Targetingvektors

Eine verlässliche Planung des Targetingvektors und der Southern Blot Strategie ist nur möglich, wenn die genaue Sequenz des Genlocus bekannt ist. Außerdem werden Sequenzbereiche der genomischen DNA für die beiden homologen Bereiche des Targetingvektors benötigt. Aus diesen beiden Gründen wurden 9217 bp des Genlocus um Exon 7 in mehreren Stücken mittels PCR aus PAC-Klon-DNA bzw. isolierter Wildtyp-ES-Zell-DNA amplifiziert und über die in Abb. 39 angegebenen Restriktionsschnittstellen in Klonierungsvektoren subkloniert.

Die Amplifikation der DNA gelang mit beiden Ausgangsmaterialien problemlos. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass sie das zu klonierende Fragment mit einem Abstand von ca. 200 bp zu den jeweiligen Restriktionsschnittstellen flankieren, damit nach dem Restriktionsverdau der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese sichergestellt werden konnte, dass die Enzyme richtig geschnitten haben. Eine Ausnahme bildete die AscI-Schnittstelle am Ende von Fragment 7, sie wurde mit einem PCR-Primer künstlich angehängt, da in diesem Bereich der Sequenz keine geeignete Schnittstelle vorhanden war.

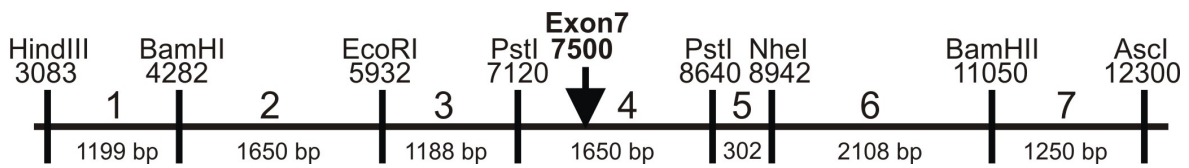


Abb. 39: Schematische Darstellung des genomischen Sequenzausschnitts für die homologen Bereiche des Targetingvektors. Die Sequenz wurde in den dargestellten sieben Teilstücken über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen in Klonierungsvektoren kloniert und sequenziert. Die Zahlen unter den Restriktionsenzymen geben die Position in der Sequenz an, wobei die erste Base des 78 bp langen Exons 7 willkürlich als Position 7500 festgelegt wurde. Die 5'-homologe Sequenz bis zum Exon hat demnach eine Länge von 4417 bp, während die 3'-homologe Sequenz eine Länge von 4722 bp hat.

Nachdem die subklonierten Stücke sequenziert waren, zeigte sich beim Vergleich mit der Referenzsequenz aus *ENSEMBL*, dass es vereinzelt Differenzen – in Form von Basenaustauschen, kleinen Insertionen oder Deletionen – in der Sequenz gab. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Referenzsequenz aus dem Mausstamm C57BL/6J stammt, während die PAC-Klon-DNA aus einer Milz des Mausstammes 129/SvevTACfBr gewonnen wurde (Osoegawa et al., 2000). Die für die PCR-Reaktionen eingesetzte ES-Zell-DNA stammte ebenfalls aus diesem Stamm. Da es zwischen den klonierten, sequenzierten Stücken von PAC-Klon-DNA und ES-Zell-DNA keine Differenzen gab, ist davon auszugehen, dass es sich bei den Differenzen zur Referenzsequenz um Polymorphismen zwischen den Mausstämmen handelt und nicht um PCR-bedingte Fehler.

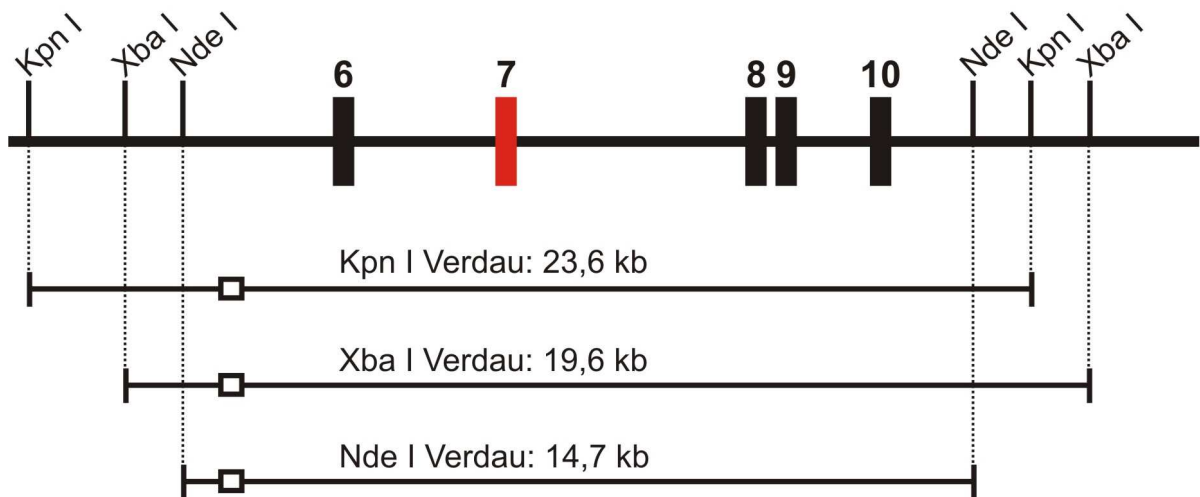
3.9.3 Southern Blot-Strategie zum Nachweis des homologen

Rekombinationsereignisses

Die 4,4 bzw. 4,7 kb langen homologen Arme des Targetingvektor-Konstrukts ermöglichen die homologe Rekombination in das Mausgenom. Allerdings findet sehr viel häufiger eine heterologe Rekombination statt, d. h. eine Integration des Targetingvektors an beliebigen Stellen des Genoms (Bollag et al., 1989). Der in dieser Arbeit konstruierte und eingesetzte Targetingvektor ist so geplant worden, dass seine korrekte Integration über Southern-Blot-Analyse bestimmt werden kann. Hierzu muss die genomische DNA der Stammzellen mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden, für das im Targetingkonstrukt eine bzw. mehrere künstliche Erkennungsstellen existieren. Mit DNA-Sonden, die an Sequenzen binden, die in 5'- bzw. 3'-Richtung außerhalb des homologen Bereichs des Targetingkonstrukts liegen, ist es anschließend möglich, das Wildtypallel vom rekombinanten Allel eindeutig zu unterscheiden (Abb. 40, Abb. 41).

Southern Blot mit 5'-Sonde: (□)

Wildtyp



Integrierter Vektor

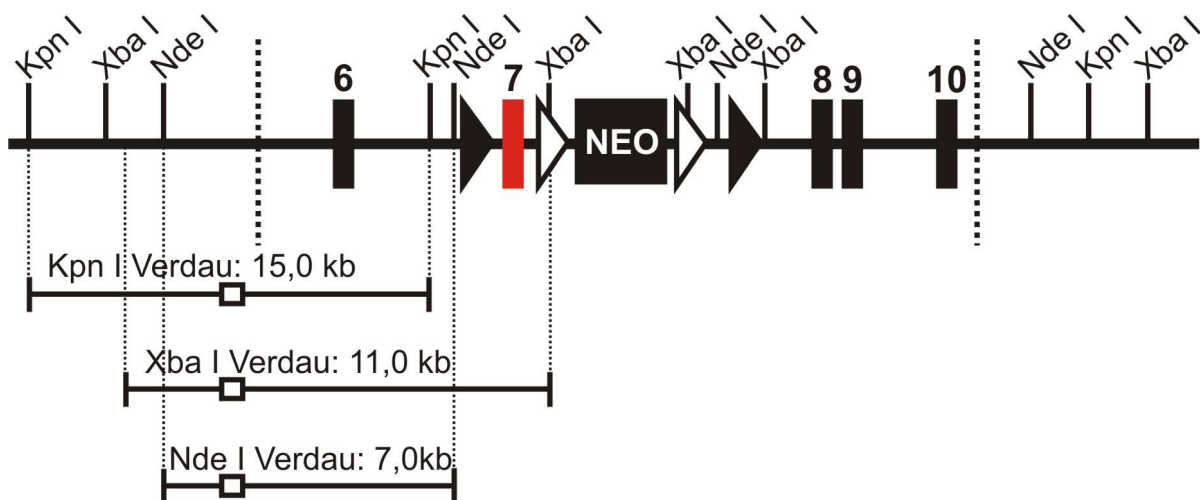
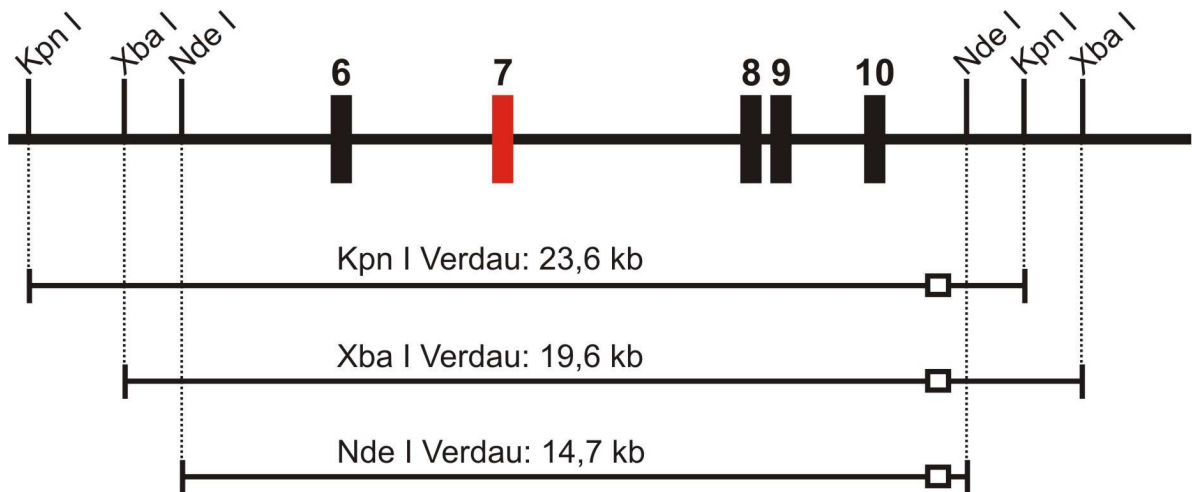


Abb. 40: Schematische Darstellung der 5'-Southernstrategie. Dargestellt sind oben das Wildtypallel und unten das Allel mit korrekt integriertem Targetingkonstrukt. Die Exonsequenzen sind als Rechtecke und die Intronsequenzen als dicke schwarze Linie dargestellt. Das rekombinante Allel besitzt zusätzlich zwei LoxP-Sequenzen (schwarze Dreiecke), zwei FRT-Sequenzen (weiße Dreiecke) und die Neomycin-Resistenzkassette (Neo). Die Grenzen des Targetingvektors sind als senkrechte dick-gepunktete Linien eingezeichnet. Jeweils unter der schematischen Darstellung der Allele sind die DNA-Fragmente abgebildet, die nach dem angegebenen Restriktionsverdau und der Hybridisierung mit der 5'-Sonde (kleines weißes Rechteck) im Southern Blot nachgewiesen werden.

Southern Blot mit 3'-Sonde: (□)

Wildtyp



Integrierter Vektor

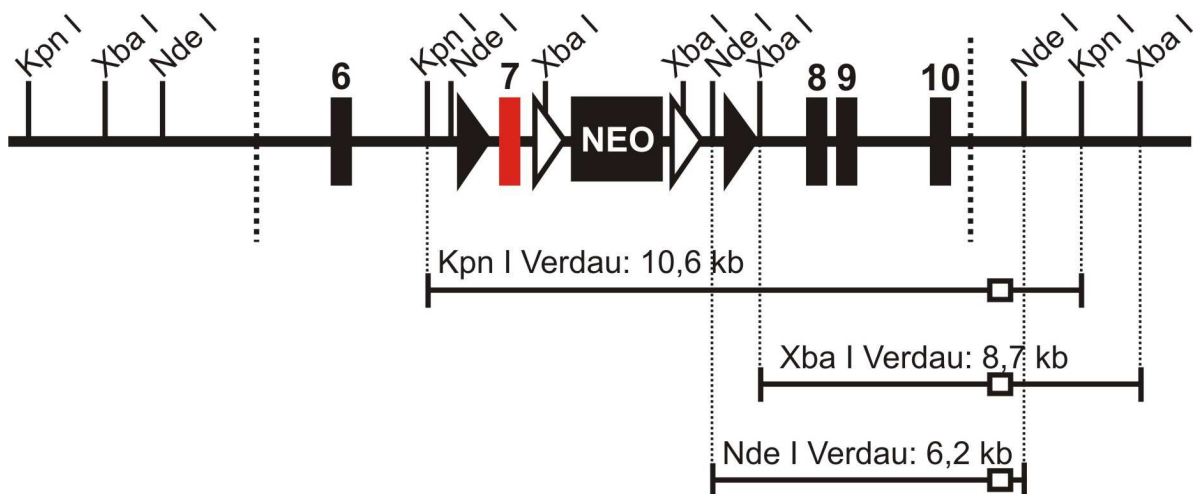


Abb. 41: Schematische Darstellung der 3'-Southernstrategie. Die Symbole entsprechen denen von Abb. 39. Jeweils unter der schematischen Darstellung der Allele sind die DNA-Fragmente dargestellt, die nach dem angegebenen Restriktionsverdau und der Hybridisierung mit der 3'-Sonde (kleines weißes Rechteck) im Southern Blot nachgewiesen werden.

Vor der endgültigen Planung und Assemblierung des Targetingvektors wurden die Sonden und die drei Strategien an Wildtyp-ES-Zell-DNA getestet, um festzustellen, ob die ausgewählten Restriktionsenzyme zuverlässig genomische DNA schneiden. Zum anderen zeigten diese Test-Southern Blots, ob die ausgewählten Sondensequenzen spezifisch genug waren, um deutliche Banden zu erzeugen.

Sowohl die 5'-Sonde als auch die 3'-Sonde wurden über PCR-Reaktionen aus PAC-Klon-DNA und aus ES-Zell-DNA gewonnen. Die 5'-Sonde hatte eine Länge von 462 bp und entsprach der Sequenz 519 bis 981 bp vor dem Beginn des 5'-homologen Bereichs. Die 3'-Sonde hatte eine Länge von 478 bp und entsprach der Sequenz 118 bis 596 bp hinter dem Ende des 3'-homologen Bereichs. Die 5'-Sonde wurde zunächst an einem Southern-Blot mit geschnittener DNA des PAC-Klons Nummer 394-I14 getestet. Es konnten jeweils die Fragmente korrekter Länge mit sehr großer Intensität detektiert werden (Abb. 42, links).

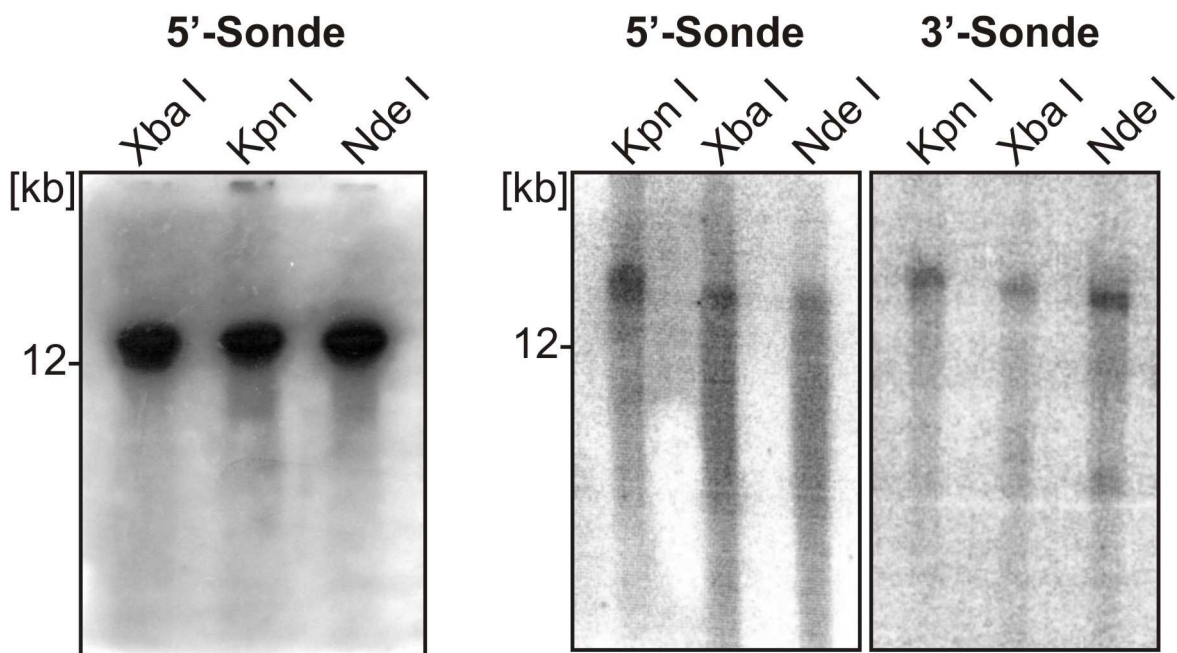


Abb. 42: Ergebnis der Southern Blots mit geschnittener PAC-Klon-DNA und Wildtyp-ES-Zell-DNA zum Test der Sonden und der Restriktionsschnittstellen. Die DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten, auf einem 0,6% Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit den oben angegebenen radioaktiven Sonden hybridisiert. Linker Blot: PAC-Klon-DNA, mittlerer und rechter Blot: ES-Zell-DNA. Der linke Blot wurde mit einem Film (Amersham HyperFilm) ausgewertet, der für drei Stunden aufgelegt wurde. Bei den Blots mit der ES-Zell-DNA (Mitte und rechts) wurden die radioaktiven Signale mit einem Phosphoimager ausgelesen, nachdem die zugehörige Detektionsplatte für drei Tage auflag.

Die Signalstärke ist erklärbar aufgrund der Tatsache, dass der PAC-Klon nur einen kleinen Bereich des Genoms abdeckt und daher der mengenmäßige Anteil des Zielfragments für die Hybridisierung viel größer ist als bei ES-Zell-DNA. Folglich können bei der PAC-Klon-DNA viel mehr Sondenmoleküle binden und es entstehen intensivere Hybridisierungssignale.

Ein gleich aufgebautes Experiment mit geschnittener ES-Zell-DNA lieferte ebenfalls positive Resultate. Es konnten jeweils die Banden mit der rechnerisch richtigen Größe (23,6 kb mit Kpn I, 19,6 kb mit Xba I und 14,7 kb mit Nde I) detektiert werden (Abb. 42, Mitte). Die 3'-Sonde wurde direkt mit geschnittener ES-Zell-DNA getestet und war ebenfalls geeignet, die Zielfragmente spezifisch zu detektieren (Abb. 42, rechts).

3.9.4 Herstellung von Hilfsvektoren mit definierten Restriktionsschnittstellen

Nachdem die Sequenz der homologen Bereiche bestimmt und die Southern Blot Strategie getestet worden war, konnte mit der Erstellung der Hilfsvektoren für die Klonierung des Targetingvektors begonnen werden, indem die MCS des Vektors pBluescript II KS(-) durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym BssHIII entfernt und eine alternative MCS-Sequenz einligiert wurde. Es wurden drei Hilfsvektoren generiert (Abb. 43), einer für die Klonierung des 5'-homologen Bereichs (HV1), einer für den zentralen Bereich mit dem Exon 7 (HV2) und einer für den 3'-homologen Bereich (HV3).

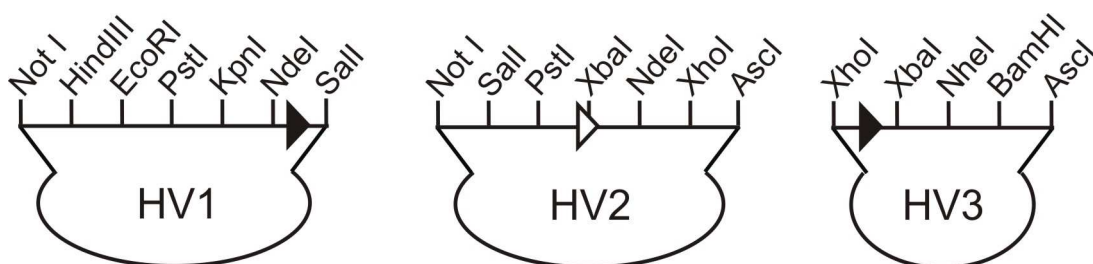


Abb. 43: Schematische Darstellung der für die Targetingstrategie hergestellten Hilfsvektoren. Die schwarz gefüllten Dreiecke stellen die LoxP-Sequenzen dar und das weiße Dreieck eine FRT-Sequenz.

3.9.5 Klonierung des Targetingvektors

In den ersten Schritten zur Erstellung des Targetingvektors wurden die Sequenz des gesamten 5'-Bereichs (HindIII an Pos. 3083 bis PstI an Pos. 7120), des gesamten 3'-Bereichs (PstI an Pos. 8640 bis AscI an Pos. 12300) sowie der dazwischenliegenden Sequenz um das Exon 7 (Abb. 39, siehe Seite 96) in drei PCR-Reaktionen amplifiziert und in die Hilfsvektoren kloniert (Abb. 44).

Da in den Sequenzen mehrere Erkennungssequenzen für das Enzym PstI vorhanden waren, wurde für den 5'-Bereich ein Rückwärts-Primer eingesetzt, der eine KpnI-Schnittstelle direkt hinter der PstI-Stelle anfügt. Der Vektor HV1 enthielt ebenfalls eine KpnI-Schnittstelle direkt hinter der PstI-Sequenz, sodass das Fragment über HindIII und KpnI kloniert werden konnte (Abb. 44, oben). Für die Klonierung des zentralen Fragments 4 in den Vektor HV2 wurde die XbaI-Schnittstelle in der FRT-Sequenz ausgenutzt, indem ein PCR-Primer erstellt wurde, der nach der zum Template komplementären Sequenz auch noch den Teil der FRT Sequenz bis zur XbaI Schnittstelle als Überhang enthielt. Der Vorwärts-Primer beinhaltete die Erkennungssequenz für SalI vor derjenigen für PstI. So konnte das PCR-Produkt über SalI und XbaI in den HV2 kloniert werden (Abb. 44, Mitte). Der Vorwärts-Primer für die Klonierung des 3'-homologen Bereichs setzte direkt hinter der PstI-Schnittstelle an der Position 8640 an und enthielt eine künstliche Schnittstelle für XbaI, sodass das PCR-Produkt über die Schnittstellen XbaI und AscI in den HV 3 kloniert werden konnte (Abb. 44, unten).

Nachdem die Klonierung der PCR-Produkte in die drei Hilfsvektoren abgeschlossen war, wurden jeweils die Übergänge zwischen Vektor und Insert sequenziert, um Gewissheit über die Funktionsfähigkeit der Restriktionsschnittstellen zu bekommen.

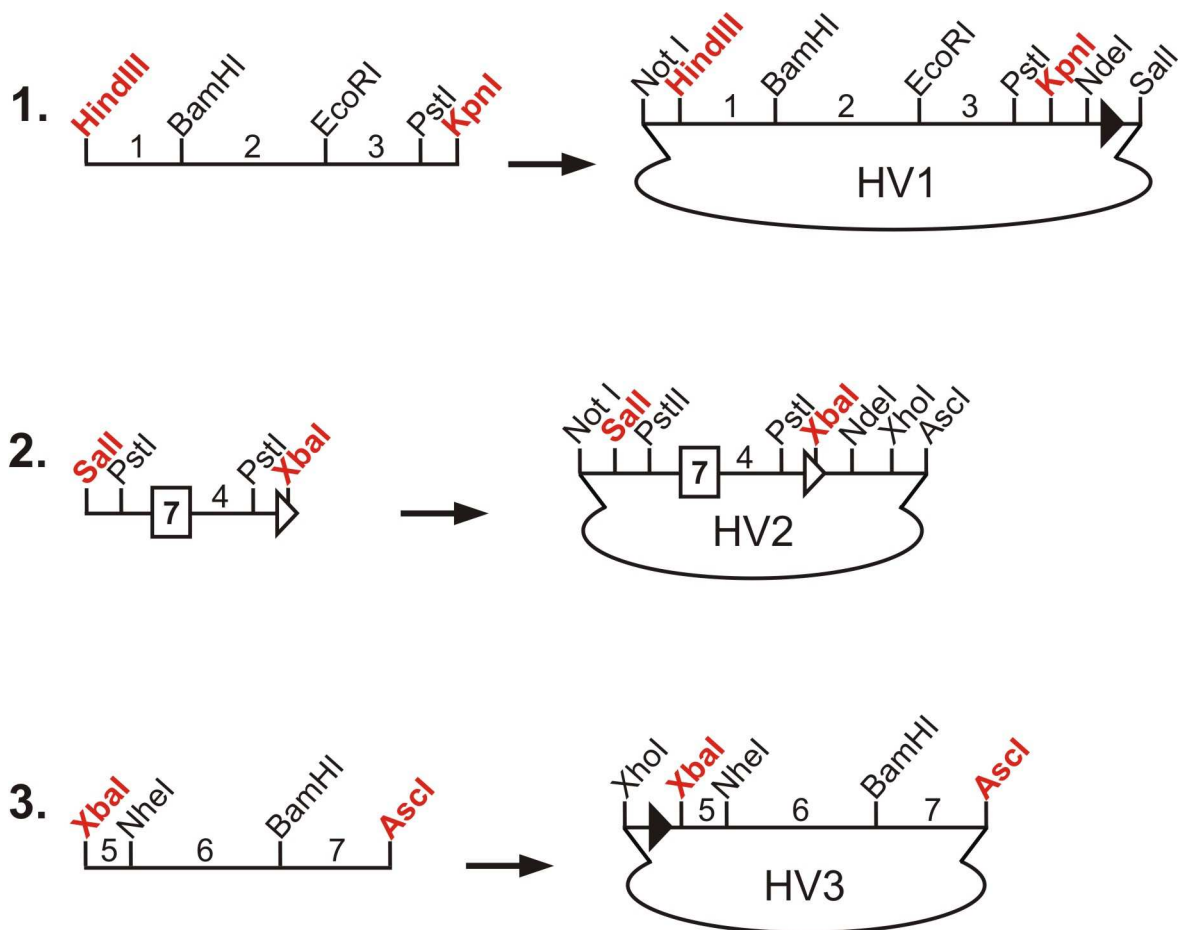


Abb. 44: Klonierungsschema zur Erstellung des TPCN2-Targetingvektors (Teil 1). In den ersten drei Klonierungsschritten wurden die homologen Bereiche mit PCR amplifiziert und über die rot hervorgehobenen Schnittstellen in die Hilfsvektoren ligiert. Die Nummern entsprechen den Fragmenten aus Abb. 39. Die schwarz gefüllten Dreiecke stellen die LoxP-Sequenzen dar, die weißen Dreiecke die FRT-Sequenzen. Das Rechteck bildet das Exon Nummer 7 des TPCN2 (nicht maßstabsgetreu) ab.

In den nachfolgenden Klonierungsschritten wurde zunächst der 5'-homologe Bereich im HV1 zusammen mit der einen LoxP-Sequenz über die Enzyme *NotI* und *SallI* aus dem Vektor freigesetzt und über die gleichen Schnittstellen in HV2 mit Fragment 4 einligiert (Abb. 45, oben). In das resultierende Vektorkonstrukt wurde anschließend im fünften Schritt die Neomycin-Resistenzkassette eingefügt. Hierzu wurde das Konstrukt mit *XbaI*, dessen Erkennungssequenz in der FRT-Sequenz lag, linearisiert und der Vektor pm4-06, der die Neomycin-Kassette enthielt, wurde ebenfalls mit *XbaI* geschnitten. Da das Neomycin-Resistenzgen in diesem Vektor von zwei FRT-Sequenzen flankiert war, wurden diese durch den Restriktionsverdau zerschnitten. Nachdem die Neo-Kassette in den linearisierten Hilfsvektor ligiert worden war ergänzten sich die zerschnittenen FRT-

Sequenzen wieder zu zwei kompletten FRT-Sequenzen, die dann die Neo-Kassette im HV2 flankierten (Abb. 45, unten).

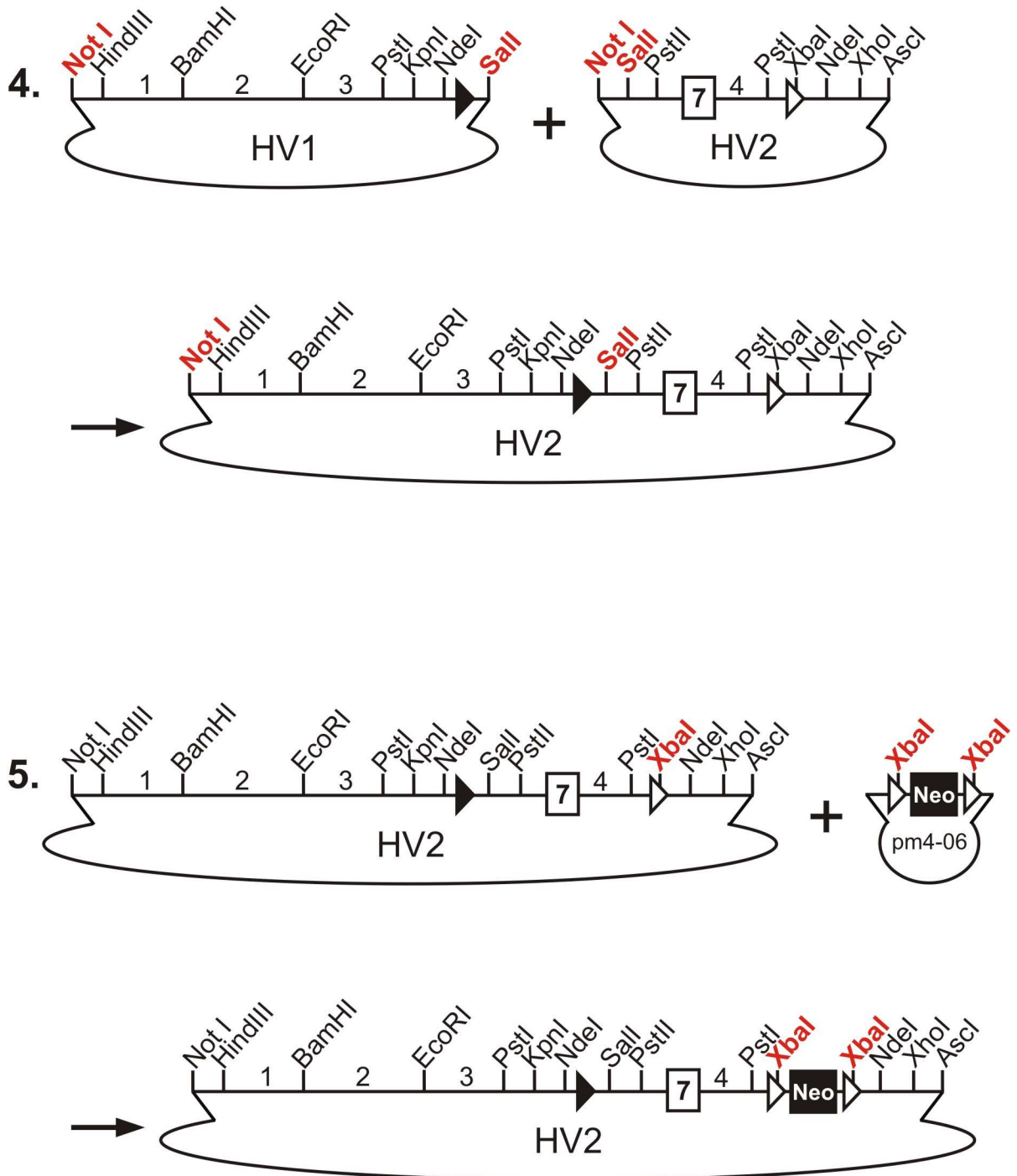


Abb. 45: Klonierungsschema zur Erstellung des TPCN2-Targetingvektors (Teil 2). Im vierten Klonierungsschritt wurde die 5'-homologe Sequenz aus HV1 ausgeschnitten und mit dem zentralen Bereich inklusive Exon Nr. 7 im Vektor HV2 fusioniert. In das Produkt dieser Klonierung wurde die Neomycin-Kassette (schwarzes Rechteck) über XbaI einkloniert.

Im sechsten Schritt wurde der 3'-homologe Bereich zusammen mit der zweiten LoxP-Sequenz aus dem HV3 ausgeschnitten und über die Schnittstellen XhoI und AscI in das Konstrukt kloniert, das den 5'-homologen Bereich, den zentralen Bereich mit dem Exon sowie die Neomycin-Resistenzkassette enthielt (Abb. 46).

Das daraus resultierende Produkt wurde im letzten Schritt mit NotI linearisiert und das Thymidinkinase-Gen (TK) über diese Schnittstelle am 5'-Ende des Targetingkonstrukts einkloniert (Abb. 47). Der finale Targetingvektor wurde zur Sicherheit sequenziert, um die Funktionalität der für die folgenden Southern Blots relevanten Schnittstellen sowie der LoxP- und FRT-Sequenzen und der Exons zu gewährleisten. Die Sequenz des gesamten Targetingvektors ist im Anhang zu finden.

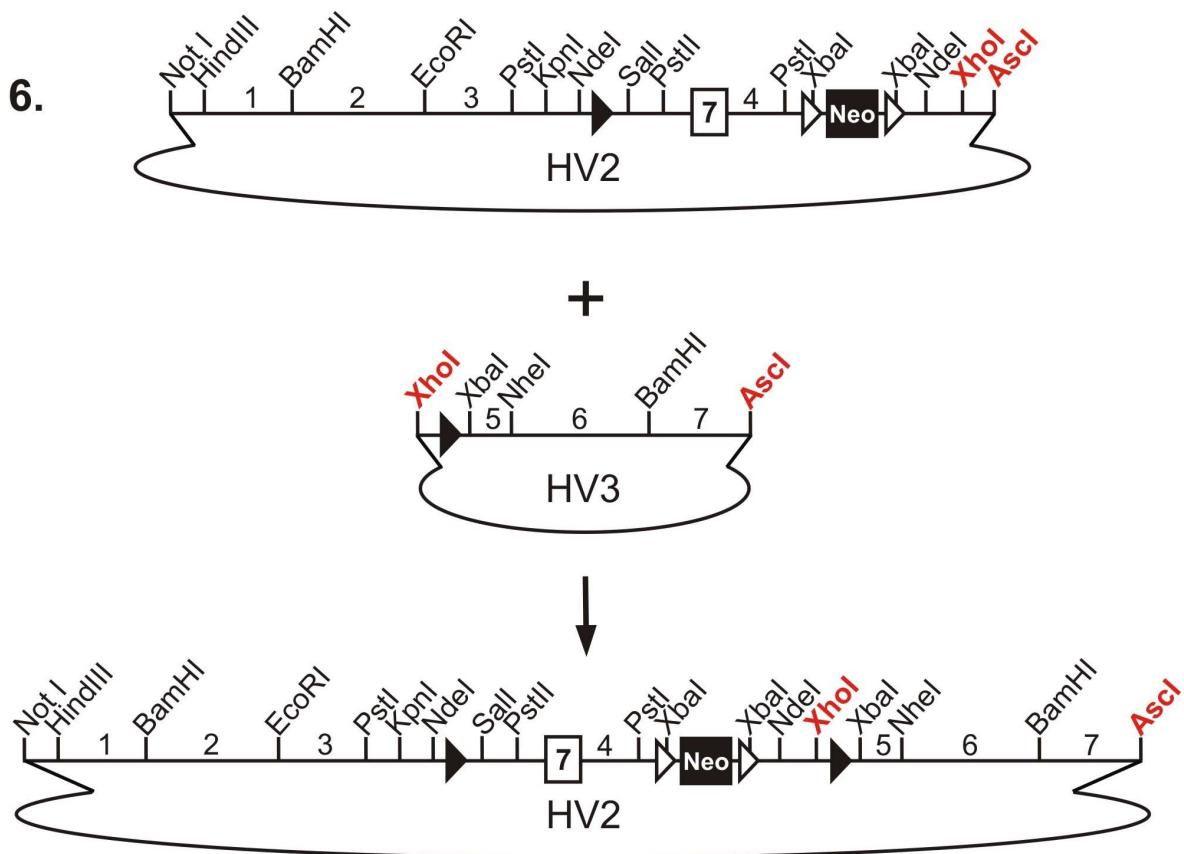


Abb. 46: Klonierungsschema zur Erstellung des TPCN2-Targetingvektors (Teil 3). Im sechsten Klonierungsschritt wurde die 3'-homologe Sequenz aus HV3 ausgeschnitten und in das Produkt aus Schritt 5 über XhoI und AscI einkloniert.

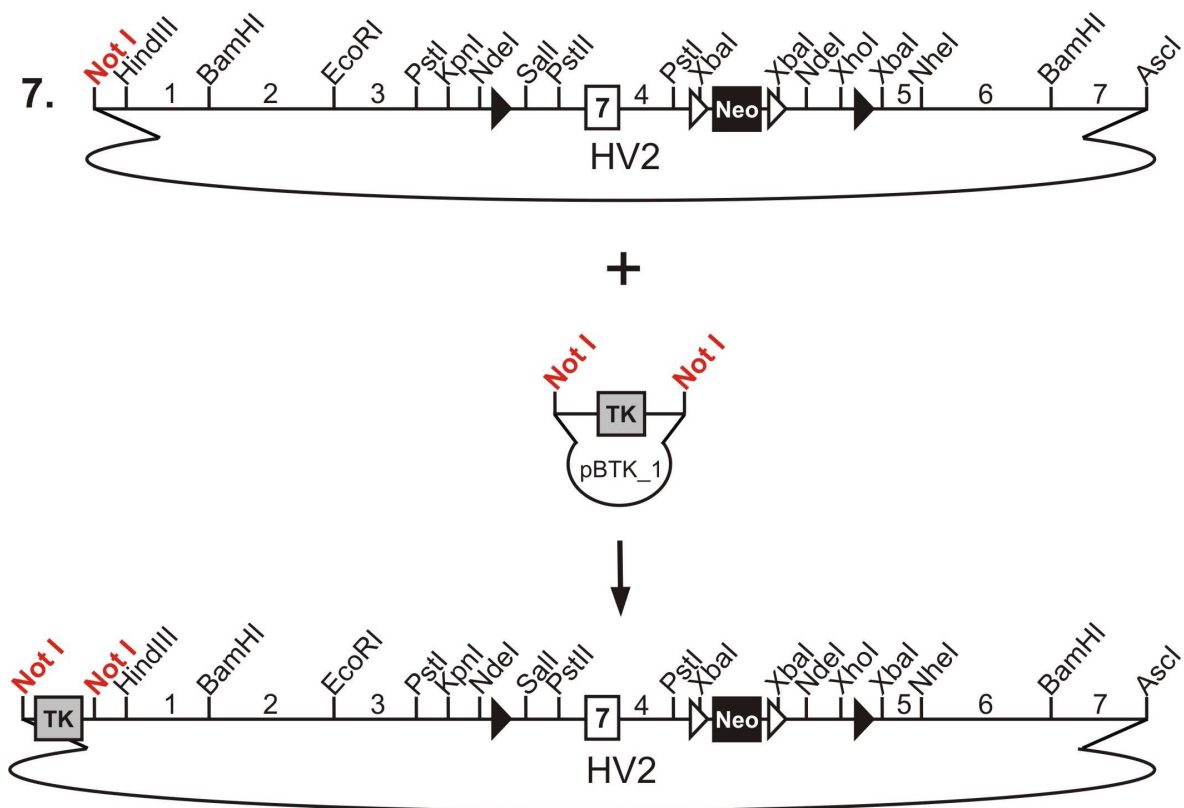


Abb. 47: Klonierungsschema zur Erstellung des TPCN2-Targetingvektors (Teil 4). Im letzten Klonierungsschritt wurde das Thymidinkinase-Gen (TK) in das Produkt aus Schritt 6 über Not I einkloniert. Die untere schematische Vektor-Abbildung entspricht dem kompletten Targetingvektor, wie er für das Stammzelltargeting eingesetzt wurde.

3.10 Herstellung der transgenen TPCN2-Mäuse

3.10.1 Stammzelltargeting

Die Gewinnung und Kultur der murinen embryonalen Stammzellen und Feederzellen sowie die Elektroporation wurden vom Arbeitskreis um Dr. Markus Moser, MPI für Biochemie, durchgeführt. Sie linearisierten 60 µg der Targetingvektor-DNA mit dem Enzym AscI und brachten die DNA mittels Elektroporation in ca. 4×10^7 Stammzellen ein. Anschließend säten sie die Stammzellen auf acht mit Feederzellen bewachsenen 10cm-Schalen aus und ließen sie anwachsen.

Nach 24 h wurde dem Medium das Aminoglycosid-Antibiotikum G-418 (Geneticin) zugesetzt, das die Proteinsynthese sowohl prokaryotischer als auch eukaryotischer Zellen hemmt und diese so abtötet. Nur die Zellen, die das Targetingkonstrukt stabil integriert hatten, überlebten diese Behandlung und wurden so selektiert. Die Zellen wurden bei täglichem Mediumwechsel weitere sechs bis acht Tage kultiviert, dann konnte mit der

Isolation einzelner gewachsener Klone begonnen werden. Im Verlauf von mehreren Tagen wurden insgesamt 312 Klone isoliert und in 24-Well-Platten weiter kultiviert. Nach weiteren drei bis fünf Tagen – je nach Wachstumsgeschwindigkeit – konnte von jedem Zellklon ein Teil weggefroren werden, der Rest wurde bis zu einer hinreichenden Zelldichte weiter kultiviert und dann lysiert zur Gewinnung genomischer DNA, die dann im Southern Blot untersucht wurde.

3.10.2 Southern Blots zum Nachweis der Rekombination

Zunächst wurden je 12 µl der Stammzell-DNA aller 312 Klone mit Xba I geschnitten und mit der 5'-Sonde (Abb. 40, siehe Seite 97) im Southern Blot getestet. Hierbei konnten die allermeisten Klone aussortiert werden, da sie nur das Wildtyp-Bandenmuster zeigten. Zwei Klone zeigten das Bandenmuster für homologe Rekombination und einige andere Klone waren nicht eindeutig einzuordnen, da bei ihnen im Southern Blot keine klaren Banden zu sehen waren. Die beiden positiven Klone und die zweifelhaften Klone wurden als nächstes mit dem KpnI Restriktionsverdau und der 3'-Sonde (Abb. 41, siehe Seite 98) geprüft. Auch hier zeigte sich bei den beiden zuvor positiven Klonen – den Klonen Nr. 254 und 291 – das Bandenmuster für homologe Rekombination. Die restlichen Klone stellten sich alle als Klone mit falscher Integration heraus.

Um das Ergebnis des XbaI-Cuts mit der 5'-Sonde zu bestätigen, wurde DNA der zwei Klone mit NdeI geschnitten und mit einer neuen 5'-Sonde getestet, die eine Länge von 455 bp hatte und 2183 bis 2638 bp vor dem Beginn des 5'-homologen Bereichs hybridisierte. Es wurde eine neue Sonde verwendet, da es mit der ersten 5'-Sonde relativ viel unspezifische Signale auf den Blots gab und dadurch manche Klone bei der ersten Analyse nicht eindeutig bewertet werden konnten. Die neue 5'-Sonde zeigte in Testexperimenten ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis als die alte. Nach dem NdeI-Cut und der Hybridisierung mit der neuen 5'-Sonde war nur bei dem Klon Nr. 254 das korrekte Bandenmuster zu sehen (Abb. 48). Um das widersprüchliche Ergebnis bei Klon Nr. 291 zu klären, wurde dessen DNA mehrere weitere Male mit XbaI geschnitten und mit der neuen 5'-Sonde getestet, immer mit dem gleichen Resultat, dass nur die Wildtypbande zu sehen war. Möglicherweise handelte es sich bei der im ersten Experiment beobachteten Bande um eine unspezifische Bindung der alten 5'-Sonde. Dieser Klon schien somit auch kein

bzw. ein nur teilweise homolog rekombiniertes Targetingkonstrukt zu enthalten und wurde aussortiert.

Ein weiterer Southern Blot mit der DNA des Klons Nr. 254 und einer Sonde gegen das Neomycin-Resistenzgen offenbarte, dass es bei diesem Klon keine multiplen Integrationen des Targetingkonstrukts gab (Abb. 48) und er somit geeignet war, eine Maus daraus zu generieren.

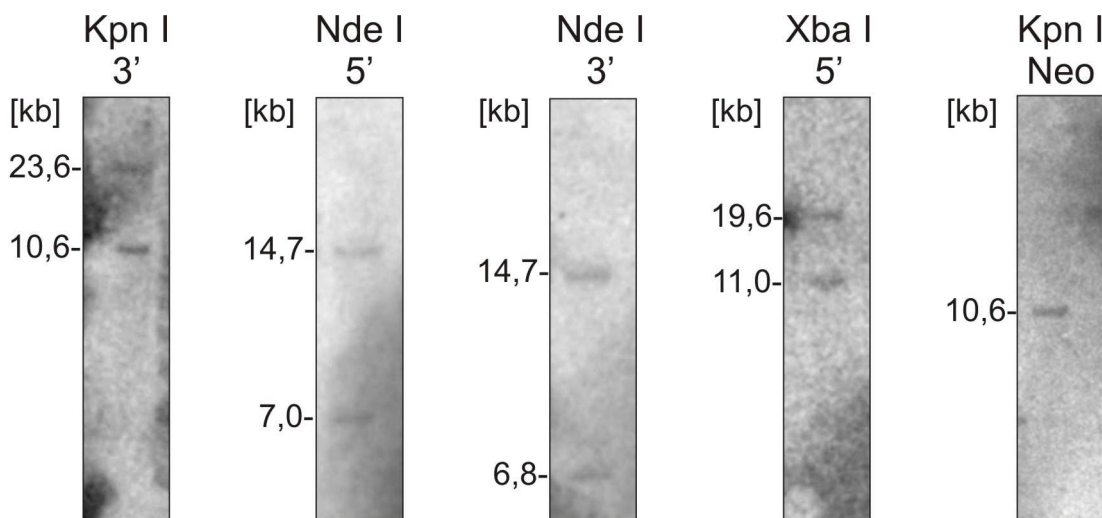


Abb. 48: Zusammenstellung der Ergebnisse der Southern Blots des Klons Nr. 254, der als einziger Klon das Bandenmuster für homologe Rekombination zeigte (erste vier Membranen). Er ist auch nur einmal ins Genom integriert, da nur eine einzige Neomycin-Resistenzkassette in einer Bande der korrekten Größe nachgewiesen wurde (Membran ganz rechts). Die verwendeten Restriktionsenzyme und Sonden sind oberhalb der Blots angegeben, die Größe der Banden steht jeweils links neben den Blots.

3.10.3 PCR-Analysen und Sequenzierungen von Stammzell-DNA

Als zusätzliche Kontrolle vor der Injektion in die Blastocysten wurden die kritischen Bereiche der genomischen DNA des Stammzellklons Nr. 254 mit PCR-Analysen und Sequenzierungen untersucht. Geprüft wurden die *LoxP*- und *FRT*-Sequenzen, da deren exakte Basenabfolge später über das Gelingen des Knockouts entscheidet. Als Ausgangsmaterial für die PCR-Analysen diente die isolierte Stammzell-DNA, die auch für den Southern Blot verwendet wurde.

In der ersten PCR-Reaktion lag der Vorwärts-Primer vor der ersten *LoxP*-Sequenz und der Rückwärts-Primer in der Neomycin-Resistenzkassette, wodurch ein Produkt entstand, das eine Länge von 2018 bp hatte und die Sequenzen der ersten *LoxP*- und *FRT*-Sequenzen sowie das Exon Nr. 7 beinhaltete (Abb. 49, links). Aus dem Wildtyp-Allel entstand kein

Produkt, da der Rückwärts-Primer nicht binden konnte. Die zweite PCR-Reaktion deckte die Sequenz der zweiten LoxP- und FRT-Sequenzen ab. Hier lag der Vorwärts-Primer in der Neomycin-Resistenzkassette und der Rückwärts-Primer hinter der LoxP-Sequenz (Abb. 49, rechts).

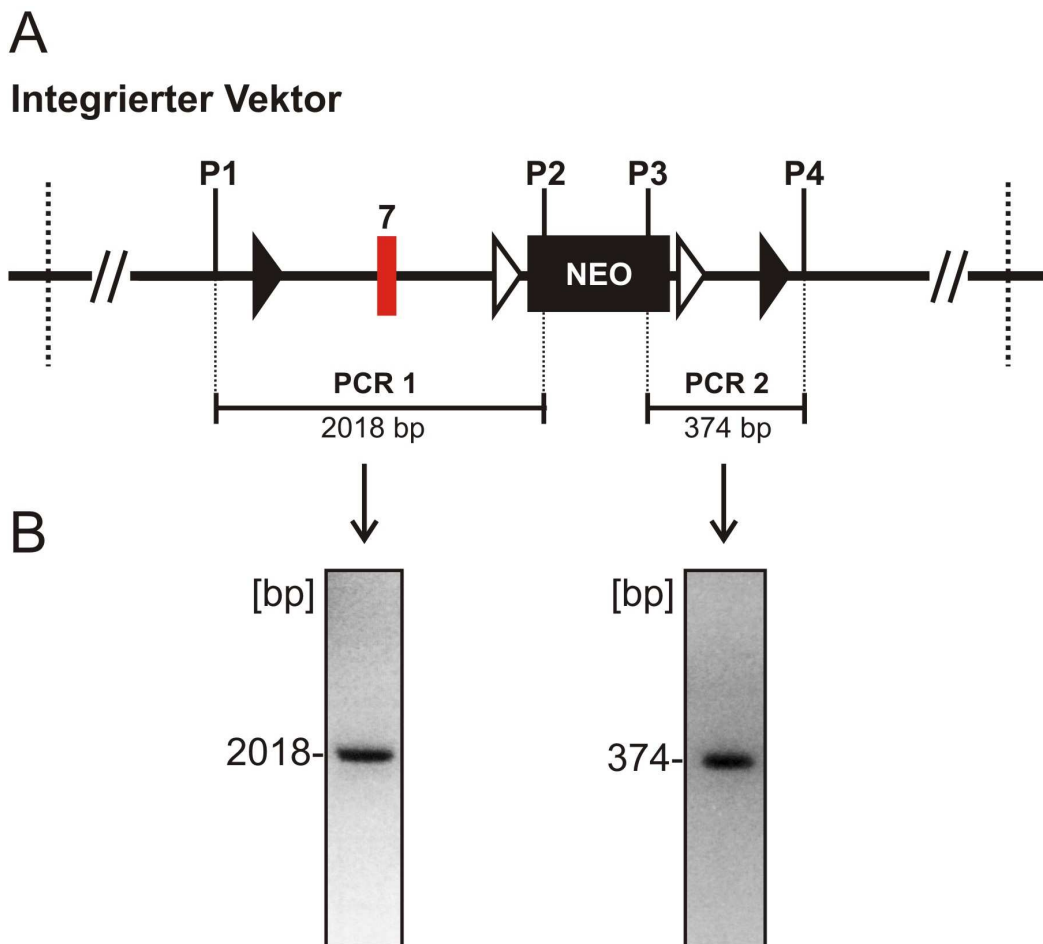


Abb. 49: Ergebnis der Test-PCR-Analysen der DNA des Stammzellklons Nr. 254. **A:** Schematische Darstellung des genomischen Abschnitts mit dem integrierten Targetingvektor. Die Symbole entsprechen denen von Abb. 40. P1 und P2 sind die Primer, die zur Amplifikation eines Produkts mit den Sequenzen der ersten LoxP- und FRT-Sequenzen sowie des Ziel-Exons verwendet wurden (P1: T2-33f, P2: NeoSeqRev). Das PCR-Produkt, das die anderen beiden LoxP- und FRT-Sequenzen enthielt, wurde mit den Primern P3 und P4 amplifiziert (P3: T2-35f, P4: T2-36r). **B:** Agarosegele, auf die Aliquots der PCR-Produkte aufgetragen wurden. Die Banden entsprechen jeweils der korrekten Größe. Die restliche DNA wurde aufgereinigt und sequenziert.

In beiden PCR-Reaktionen wurden Fragmente der richtigen Größe amplifiziert, während parallel durchgeführte Kontrollreaktionen mit Wasser statt DNA-Template zu keinem Produkt führten. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und mit dem Ergebnis sequenziert, dass alle für das Targeting wichtigen Sequenzbereiche korrekt waren. Der

Sequenzbereich unmittelbar vor dem Start der 5'-Homologie wurde ebenfalls sequenziert, um den unwahrscheinlichen Fall auszuschließen, dass Teile der TK-Kassette in das Genom integriert wurden. Dies war nicht der Fall und damit stand der Blastocysteninjektion des Klons Nr. 254 nichts mehr im Wege.

3.10.4 Blastocysten-Injektion eines positiven Stammzellklons

Die Arbeiten von der Blastocysten-Injektion bis zur Zucht der chimären Mäuse wurden vom Arbeitskreis um Dr. Markus Moser, MPI für Biochemie nach einem etablierten Protokoll (Howlett 1999) durchgeführt.

Nachdem die obigen Ergebnisse zeigten, dass der Stammzellklon Nr. 254 die gewünschte Mutation im Genom besaß, wurden die tiefgefrorenen Zellen dieses Klons aufgetaut, wieder in Kultur genommen und in den inneren Hohlraum isolierter Blastocysten injiziert. Die Blastocysten wurden dann in den Uterus pseudoschwangerer Mäuse eingesetzt. Die Blastocysten stammten aus Mäusen des Stamms C57Bl/6J, während die injizierten ES-Zellen dem Mäusestamm 129/Sv angehörten, sodass nach der Injektion aus der Blastocyste chimäre Mäuse entstanden. Bei ihnen konnte der Anteil, den die Stammzellen zum gesamten Organismus beitrugen, anhand der Fellfarbe festgestellt werden, da C57Bl/6J-Mäuse schwarz und 129/Sv-Mäuse braun (agoutifarben) sind. Bei diesen Mäusen ist es umso wahrscheinlicher, dass die Targetingvektor-Mutation in der Keimbahn vorhanden ist, je größer der Anteil der Braunfärbung an der gesamten Fellfarbe ist.

3.10.5 Verpaarungen zur Gewinnung heterozygoter TPCN2-Mäuse

Insgesamt entwickelten sich elf chimäre Mäuse aus den Blastocysten, davon waren zehn Mäuse männlich und eine weiblich. Von den Chimären hatten neun Individuen ein nahezu komplett agoutifarbenes Fell (100% Chimärismus, Abb. 50), was ein gutes Zeichen dafür ist, dass die Stammzellen viel zur Entstehung der Maus beigetragen haben und die Wahrscheinlichkeit, dass die TPCN2-Mutation in die Keimbahn gelangte, sehr hoch ist. Die restlichen beiden Chimären wiesen einen Chimärismus von etwa 60% bzw. 40% auf. Die zehn männlichen Chimären wurden in separaten Käfigen jeweils mit zwei weiblichen Wildtypmäusen des Stamms C57Bl/6J verpaart. Alle Zuchten lieferten Nachwuchs, bei dem sehr einfach festgestellt werden konnte, ob es sich um heterozygote TPCN2-Mäuse handelte, da in der ersten Generation von Nachkommen das Allel für die Agouti-

Fellfärbung dominant ist. Bei allen schwarzen Nachkommen handelte es sich demnach um Wildtypen. In allen Würfen gab es anteilmäßig viele braune Mäuse, die inzwischen auch größtenteils schon im adulten Zustand sind.



Abb. 50: Vier adulte Exemplare chimärer Mäuse, die aus dem Gentergeting mit dem TPCN2-Targetingvektor entstanden sind. Das nahezu komplett braune Fell der Mäuse zeigt einen 100%igen Chimärismus an.

3.10.6 Verpaarungen heterozygoter TPCN2-Mäuse mit Cre-Deleter-Mäusen

Die Mäuse, die das Targetingkonstrukt heterozygot integriert hatten, wurden sobald sie fortpflanzungsfähig waren, mit Cre-Deleter-Mäusen verpaart. Zwei Zuchtpaare der Cre-Deleter-Mäuse wurden von Prof. Dr. Marc Freichel, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, zur Verfügung gestellt. Momentan wird der Nachwuchs erwartet, bei dem dann die erfolgreiche Deletion des Exons Nr. 7 und der Neo-Kassette über PCR-Analysen der genomischen DNA überprüft werden wird. Hierfür wird ein Vorwärts-Primer vor der ersten LoxP-Sequenz und ein Rückwärts-Primer hinter der zweiten LoxP-Sequenz eingesetzt. So eignet sich z. B. das Primerpaar P1 und P4 aus Abb. 49A für diesen Test.

4 Diskussion

4.1 Gewebeverteilung des VGCNL1-Kanals und der TPCN-Kanäle

Im ersten Abschnitt der Arbeit gelang es, einen Überblick über die Verteilung der drei uncharakterisierten Ionenkanäle VGCNL1, TPCN1 und TPCN2 im Organismus zu gewinnen. Die ersten Schritte zum Erreichen dieses Ziels waren Nachweise der Ionenkanal-Transkripte mittels RT-PCR-Analysen. Die Untersuchungen von Herzgewebe offenbarten, dass die TPCN-Kanäle nicht ubiquitär im gesamten Herzen exprimiert werden, sondern differenziell in einzelnen funktionellen Abschnitten. So war der TPCN1-Kanal ausschließlich im Sinusknoten nachweisbar, einer Region des Herzens, die den Herzrhythmus vermittelt. Die mRNA des verwandten TPCN2-Kanals zeigte ein etwas breiteres Vorkommen und war neben dem Sinusknoten auch in der Herzkammer und der Aorta zu finden. Diese interessanten Verteilungsmuster lassen eine Beteiligung der Kanäle am Schrittmacherpotential des Herzens möglich erscheinen. Dies macht die TPCN-Kanäle zu vielversprechenden Forschungsobjekten, denn es sind noch nicht alle am Schrittmacherpotential beteiligten Ionenkanäle auf molekularer Ebene aufgeklärt (Wahl-Schott & Biel, 2008.).

Die Expression der TPCN-mRNA in anderen Organen wurde dann systematischer mit Northern Blots aufgedeckt. Die TPCN-Kanäle zeigten ein sehr breites Verteilungsmuster und waren in allen untersuchten Geweben nachweisbar. Im Einklang mit den Daten aus der Literatur (Ishibashi et al., 2000) konnte der TPCN1 auch in der Niere detektiert werden. Auffälligerweise war die Signalstärke des TPCN1, d. h. die Expressionsrate, in allen untersuchten Organen deutlich höher als die des TPCN2.

Die *in situ* Hybridisierungen offenbarten jedoch, dass die TPCN-Kanäle nicht ubiquitär in allen Zellen exprimiert werden, sondern, wie schon die RT-PCR-Experimente zeigten, sehr differenziell. So war die mRNA des TPCN2 im Gehirn ausschließlich im Bereich des Cerebellums nachweisbar. Über seine physiologische Rolle dort kann derzeit keine Aussage getroffen werden, solange seine elektrophysiologischen Eigenschaften noch unbekannt sind.

In Kryoschnitten der Niere konnte ein starkes TPCN2-spezifisches Signal im inneren Mark detektiert werden, während die TPCN2-Expression im äußeren Mark und in der Nierenrinde deutlich niedriger war. Die scharfe Trennlinie zwischen innerem und äußerem

Mark bei der TPCN2-Expression lässt die Vermutung zu, dass der TPCN2 in den dünnen Abschnitten der Henle-Schleife präsent ist, da der Übergang zwischen dicker und dünner Henle-Schleife die Grenze zwischen innerem und äußeren Mark definiert (Jamison, 1987; Imai et al., 1987). Auch sind die Abschnitte der Henle-Schleife in ihrer physiologischen Funktion deutlich voneinander getrennt, sodass eine selektive Expression des Ionenkanals in einer der beiden Zonen Sinn machen würde.

Der verwandte TPCN1 zeigte in den Hirnschnitten ebenfalls im Cerebellum die höchste Expressionsrate, konnte aber, im Gegensatz zum TPCN2, auch mit niedrigerer Expressionsrate im gesamten restlichen Hirn nachgewiesen werden. In der Niere zeigte der TPCN1 eine gleichmäßig starke Expression über das gesamte Organ. Damit deuten die *in situ* Hybridisierungen darauf hin, dass es zumindest kleine funktionelle Unterschiede zwischen den beiden TPCN-Kanälen zu geben scheint.

Die Expressionsanalysen des VGCNL1-Kanals zeigten eine sehr starke Expression im Gehirn. Dieser Befund steht im Einklang mit den Daten von Lee et al. (1999), die den homologen Kanal der Ratte aus dem Gehirn klonierten. Im Verhältnis zur nachgewiesenen Expression im Hirn war diejenige im Herzen sehr gering und in anderen Organen war die VGCNL1-mRNA gar nicht zu finden.

Nachdem diese Arbeiten am VGCNL1 durchgeführt worden waren, erschien eine Publikation über funktionelle Eigenschaften des VGCNL1. Lu et al. (2007) brachten das im Jahre 1999 klonierte Rattengen in Zellkulturen zur Expression und generierten VGCNL1-Knockout-Mäuse. Diese Knockout-Mäuse haben einen gestörten Atemrhythmus. Sie sterben innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt, aufgrund unzureichender Sauerstoffversorgung durch die abnorm verlängerten Atemintervalle (Lu et al., 2007). Elektrophysiologische Messungen und Untersuchungen an den Knockout-Mäusen ermöglichten erste grobe Einblicke in die physiologische Rolle des Kanals. Demnach scheint der VGCNL1 ein spannungsunabhängiger, unselektiver und nicht inaktivierender Kationenkanal zu sein, der dazu beiträgt, die Erregbarkeit von Neuronen aufrecht zu erhalten, indem er eine Hintergrundsleitfähigkeit für Natriumionen vermittelt.

Es gab schon früher Hinweise, dass ein derartiger Strom in Neuronen existiert (Eggermann et al., 2003), der dementsprechend *leak Na⁺-current* (I_{L-Na}) genannt wurde. Da mit dem VGCNL1 offenbar der lange gesuchte Kanal gefunden ist, der für den I_{L-Na} verantwortlich

ist, wurde neben der Bezeichnung VGCNL1 auch der Name NALCN (*sodium leak channel, nonselective*) eingeführt (Lu et al., 2007). Weiterhin wurde entdeckt, dass der VGCNL1 für den sog. Substanz-P-aktivierten Kationenstrom (I_{SP}) im Gehirn verantwortlich zu sein scheint (Lu et al., 2008). Der VGCNL1 bildet außerdem einen Komplex mit dem bisher uncharakterisierten Protein UNC-80 und ist ein Ziel von Tyrosinkinase der Src-Familie (SFKs) (Lu et al., 2008). Daher wird er vermutlich durch Peptid-Neurotransmitter, die die SFKs aktivieren können, moduliert. Auch im Fadenwurm ist der homologe Kanal, der von den Genen *nca-1* und *nca-2* codiert wird, mit dem Protein UNC-80 assoziiert (Jospin et al., 2007).

Viele Fragen zur Rolle des VGCNL1 bleiben jedoch weiterhin offen. So ist noch nicht klar, wie das Fehlen des I_{L-Na} -Stroms genau mit dem defekten Atemrhythmus im Phänotyp der Knockout-Maus zusammenhängt. Weiterhin ist die Signalkaskade zur Modulation des VGCNL1 und damit des I_{SP} -Stroms im Hirn noch nicht komplett aufgeklärt.

Ein Vergleich der in dieser Arbeit gewonnenen Daten zum murinen VGCNL1 mit denen von Lu et al. führt zu folgender These: Der beschriebene Natriumionenstrom I_{L-Na} sowie der durch die SFKs aktivierte Kationenstrom I_{SP} scheinen in erster Linie in den Neuronen des Gehirns relevant zu sein, während sie in den Neuronen der Peripherie, mit Ausnahme des Herzens, keine Rolle zu spielen scheinen, da die mRNA nur selektiv in den beschriebenen Organen nachweisbar war.

4.2 Klonierung und Phylogenetische Betrachtungen der TPCN-Kanäle und des VGCNL1

Ein weiteres zentrales Ziel der Arbeit war die Klonierung der cDNA-Sequenzen der Ionenkanäle VGCNL1, TPCN1 und TPCN2 aus der Maus. Bis jetzt sind noch keine Klonierungen muriner TPCN-Kanäle publiziert und es existiert nur eine einzige Arbeit über eine Klonierung eines TPCN-Kanals aus einem Vertebraten (Ishibashi et al., 2000).

Neben dem Ziel der Aufklärung der exakten cDNA-Sequenzen sollte mit den Klonierungen aber auch noch weitere Ziele verfolgt werden. Diese waren Expressionsstudien in Zellkulturen, aus denen dann wiederum weitere Erkenntnisse über die Kanäle gewonnen werden konnten.

Die Sequenz des klonierten murinen VGCNL1-Kanals stimmt exakt mit der in der Gendatenbank des NCBI abgelegten Sequenz überein, die im Jahre 2007 publiziert wurde

(Lu et al., 2007), (Accession Number: NM_177393). Die Proteinsequenz der Maus stimmt zu 99% mit der der Ratte überein. Differenzen gibt es nur in der Verbindungsregion zwischen Domäne 2 und 3 sowie im C-Terminus.

Bei dem murinen TPCN1-Kanal konnte die vorhergesagte Sequenz in der NCBI-Datenbank (Accession Number: NM_145853) durch die Klonierung ebenfalls bestätigt werden.

Beim murinen TPCN2 existierten keinerlei gesicherte Vergleichssequenzen. Daher wurde viel Wert darauf gelegt, sicherzugehen, dass bei der Klonierung der cDNA aus Mäusehirn tatsächlich der gesamte Leserahmen des Gens erfasst wurde. Durch eine bioinformatische Analyse des genomischen Bereichs des TPCN2-Gens konnten sowohl der Startpunkt der Transkription als auch das Polyadenylierungssignal gefunden werden.

Der mutmaßliche Leserahmen des Gens konnte in einem Stück mittels RT-PCR amplifiziert werden, was bewies, dass die vorhergesagten Exons tatsächlich alle zu einem einzigen Gen gehören. Auch bei diesem Kanal stimmt die klonierte Sequenz genau mit der vorhergesagten Sequenz der Accession Number: NM_146206 überein.

Bei einer vergleichenden Zusammenstellung (*Multiple Alignment*) der beiden TPCN-Kanäle aus Mensch, Maus und Ratte zeigte sich, dass es in den Peptidsequenzen der mutmaßlichen *Pore Loops* der Kanäle die größte Übereinstimmung gab.

Bei den TPCN-Kanälen der drei Spezies sind in der Porenschleife der ersten Domäne von 25 Aminosäuren 11 identisch (Abb. 51A). Es ist zu beachten, dass die vorhergesagte Ratten-TPCN2-Sequenz sehr wahrscheinlich unvollständig ist, da eine Folge von 22 Aminosäuren in der Porenschleife bzw. dem nachfolgenden Abschnitt fehlt, die in allen anderen TPCN-Sequenzen vorkommt und eine gute Übereinstimmung zeigt. Wird die Sequenz des TPCN1 der Pflanze *Arabidopsis thaliana* im *Alignment* mit hinzugenommen, verringert sich die Übereinstimmung auf sechs Aminosäuren (bzw. sieben, wenn die Rattensequenz die gleiche Aminosäure enthält). In der zweiten Porenschleife gibt es größere Unterschiede zwischen TPCN1 und TPCN2, denn unter den drei TPCN2-Sequenzen der Vertebraten sind 20 der 25 Aminosäuren der Porenschleife gleich. Werden die TPCN1-Kanäle der Vertebraten mit dazu genommen, dann verringert sich die Übereinstimmung auf neun Aminosäuren und kommt zusätzlich die TPCN1-Sequenz der Pflanze hinzu, dann reduziert sich die Übereinstimmung auf sechs Aminosäuren (Abb.

51A). Es gibt nur zwei Aminosäuren, die nicht nur zwischen den Spezies, sondern auch zwischen den beiden *Pore Loops* konserviert sind (Abb. 51B).

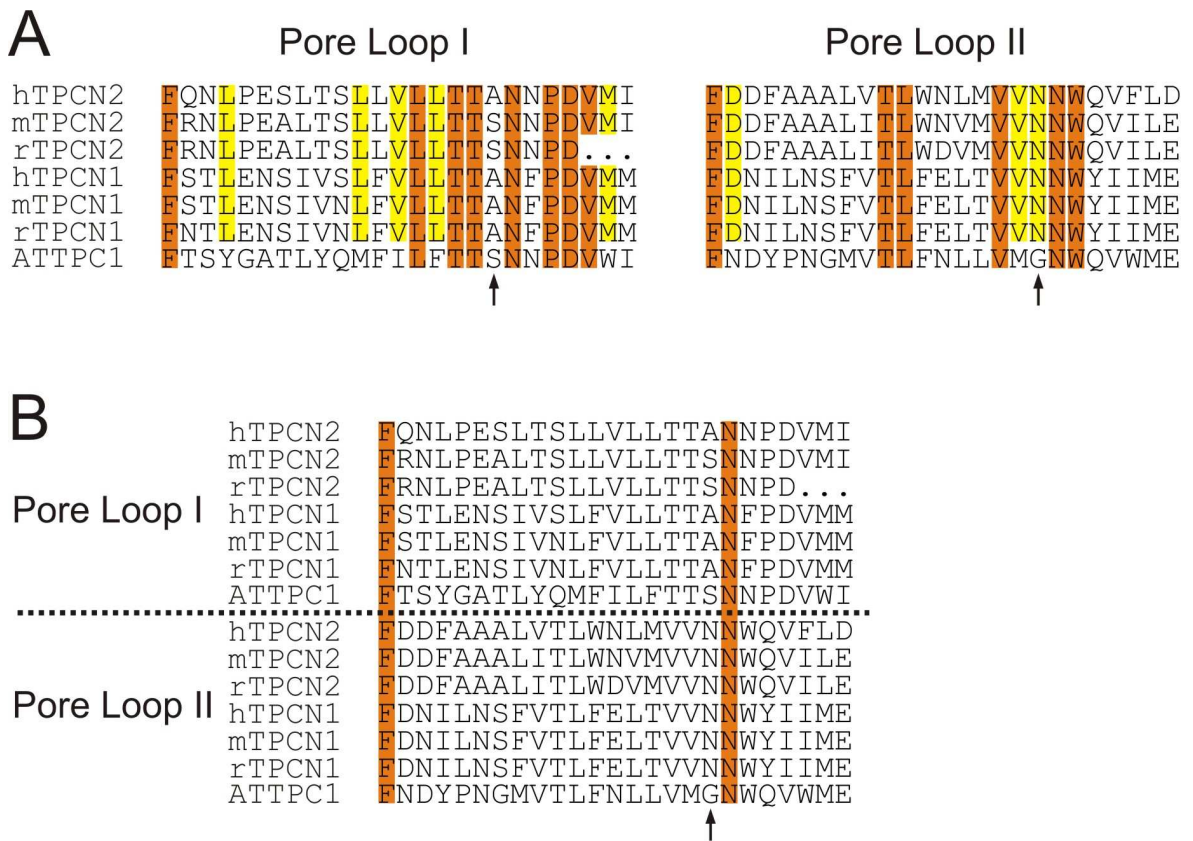


Abb. 51: Abgleich (*Multiple Alignment*) der Peptidsequenzen der TPCN-Kanäle von Mensch (h), Maus (m), Ratte (r) sowie vom TPCN-Kanal der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (ATTPC1). **A:** Getrennter Vergleich der beiden *Pore Loops*. **B:** *Alignment* aller *Pore Loop* Sequenzen. Die Aminosäuren mit 100% Übereinstimmung zwischen den Sequenzen sind orange hervorgehoben. Die Aminosäuren, die zwischen den Sequenzen der Vertebratenkanäle zu 100% übereinstimmen, sind gelb hervorgehoben. Die Pfeile kennzeichnen die Aminosäuren, die bei den spannungsgesteuerten Calcium- und Natriumkanälen entscheidend für die Ionenselektivität sind. Die drei Punkte in der vorhergesagten Ratten-TPCN2-Sequenz zeigen einen möglicherweise fehlenden Sequenzabschnitt in der vorhergesagten Sequenz an, da es an analoger Position bei den Kanälen der anderen Spezies 22 Aminosäuren gibt, zu denen sich die Ratten-TPCN2-Sequenz nicht abgleichen lässt. Weiter in 3'-Richtung gibt es wieder eine gute Übereinstimmung mit den anderen fünf Sequenzen.

Bei einem Vergleich der mutmaßlichen Porenregionen der TPCN-Kanäle mit denen bekannter Vier-Domänen-Kanäle lassen sich die vermutlich für die Ionenselektivität entscheidenden Aminosäuren bestimmen. Bei den bekannten Calcium- und Natriumkanälen sind diese Aminosäuren ganz charakteristisch und dienen als Identifikationsmerkmal (Yu & Catterall, 2004; Tang et al., 1993; Sather & McCleskey, 2003; Heinemann et al., 1992; Sun et al., 1997), (siehe auch Abb. 4 in der Einleitung). Bei den TPCN-Kanälen ist die Aminosäure an analoger Position in der ersten Domäne nicht

konserviert, da sich entweder Serin oder Alanin an entsprechender Position befindet (Abb. 51A, Pfeil links). Werden noch die Sequenzen anderer Spezies, von denen TPCN-Kanäle bekannt und einigermaßen zuverlässige Sequenzen in den Datenbanken vorhanden sind, im *alignment* hinzugenommen, bestätigt sich diese Beobachtung. Dabei ist interessant, dass bezüglich dieser Aminosäure nicht klar zwischen TPCN1 und TPCN2 getrennt werden kann. So befindet sich ein Serin beim TPCN2 von Ratte und Maus sowie beim TPCN1 der Pflanzen und dem des Huhns an dieser Position. Auffälligerweise ist die C-terminal benachbarte Aminosäure in allen Sequenzen ein Asparagin. Möglicherweise ist sie für die Selektivität der TPCN-Kanäle entscheidend.

In der Porenschleife der zweiten Domäne ist die vermutete Ionenselektivität-induzierende-Aminosäure bei den TPCN-Kanälen hoch konserviert. So befindet sich in allen bekannten TPCN-Kanälen sowohl der Vertebraten (Abb. 51A, Pfeil rechts) als auch der Invertebraten ein Asparagin an entsprechender Position. Beim TPCN1 der Pflanzen liegt hingegen ein Glycin an dieser Stelle. Rückschlüsse auf die mögliche Ionenselektivität lassen sich aus diesen Befunden jedoch nur schwer bzw. gar nicht ziehen. Selbst bei den schon viel intensiver beforschten TRP-Kanälen, den engsten Verwandten der TPCN-Kanäle, konnte bis jetzt noch keine einheitliche Consensus-Sequenz für die Ionenselektivität gefunden werden (Yu & Catterall, 2004).

Die Identifikation von Genen in genomischen Sequenzen von Eukaryoten nur mit bioinformatischen Mitteln und ohne experimentelle Befunde, die sog. *ab initio* Gensuche, ist bis heute eine wissenschaftliche Herausforderung. Über die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten multiplen *Alignments* der TPCN-Sequenzen diverser Spezies und die gezielte Suche nach neuen TPCN-Sequenzen konnten in den Gendatenbanken viele unidentifizierte und unbenannte vorhergesagte Gene den TPCN-Kanälen zugeordnet werden. So scheinen die beiden Kanäle TPCN1 und TPCN2 in allen Vertebraten vorzukommen, denn homologe Sequenzen gibt es z. B. auch beim Schnabeltier, beim Huhn und beim Zebrafisch. In der Fliege und dem Fadenwurm konnten keine homologen TPCN-Kanäle gefunden werden, dafür jedoch in anderen Invertebraten, wie z. B. im kürzlich sequenzierten Genom der Seeanemone. In anderen Invertebraten-Genomen, wie z. B. dem des Seeigels oder der Blattlaus konnte jeweils nur ein Vertreter der TPCN-Kanäle identifiziert werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass in diesen neu sequenzierten

und weniger etablierten Genomen noch Lücken und Fehler vorhanden sind und deshalb manche Gene noch nicht gefunden werden können.

Im TPCN2-Gen des Menschen wurden bei Genomvergleichen isländischer Individuen zwei Polymorphismen einzelner Basen (*single nucleotide polymorphisms*) gefunden, die phänotypische Auswirkungen auf die Haut- und Haarpigmentierung haben (Sulem et al., 2008). Die beiden Polymorphismen M484L (Methionin zu Leucin) und G734E (Glycin zu Glutamat) korrelierten jeweils signifikant mit blonden Haaren, während die untersuchten Menschen ohne einen der beiden Polymorphismen braune Haare haben. Der Polymorphismus M484L liegt mitten im Transmembransegment 2 der zweiten Domäne. Interessanterweise befindet sich nur in der humanen Referenzsequenz und den Sequenzen der TPCN1-Kanäle der Pflanzen ein Methionin an entsprechender Stelle. Die TPCN1- und TPCN2-Kanäle aller anderen Spezies haben ein Leucin an dieser Position, wie die auf Genomebene untersuchten blondhaarigen Menschen. Lediglich der TPCN1-Kanal der Blattlaus und der des Zebrafischs fallen mit einem Valin an dieser Position ganz aus dem Rahmen.

Der zweite Polymorphismus liegt in einer wenig konservierten Region im C-Terminus des TPCN2. Es ist ungeklärt, wie sich die beiden Polymorphismen auf die Struktur und Funktion des Ionenkanals auswirken, sodass solche deutlichen Effekte im Phänotyp entstehen. Allerdings konnte in dieser Arbeit das Transkript des TPCN2 in Hautproben der Maus detektiert werden. Damit können zukünftige Experimente zeigen, ob dieser Ionenkanal in den Melanocyten präsent ist, um dort die Pigmentierung zu regulieren.

Bei der Untersuchung des TPCN2 auf Proteinebene wurden zwei Stellen für N-Glycosylierungen gefunden: Der Asparaginrest an Position 594 und der an Position 601. Die erste Glycosylierungsstelle ist bei beiden TPCN-Kanälen von Mensch, Maus und Ratte vorhanden. Die zweite Glycosylierungsstelle des TPCN2 fehlt beim TPCN1, dafür besitzt dieser Kanal aber zwei andere Glycosylierungsstellen, die nur wenige Aminosäuren entfernt von der Stelle des TPCN2 liegen (siehe 6.5, *Alignment* zwischen TPCN1 und TPCN2). Beide Orte sind innerhalb der TPCN1-Kanäle ebenfalls hoch konserviert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien an heterolog exprimierten TPCN-Proteinen bestätigten, dass diese Stellen tatsächlich glycosyliert werden und dass die Glycosylierungen partiell resistent gegenüber einer Behandlung mit Endo H sind. Daraus kann folgende Schlussfolgerung gezogen werden: Eine partielle Endo H-Resistenz zeigt,

dass das Protein das ER, in dem es synthetisiert wird, verlässt und zum Golgi-Apparat transportiert wird, wo die komplexen Zuckergestelle an das Protein angefügt werden (Helenius & Aebi, 2004; Caramelo & Parodi, 2007; Dreses-Werringloer et al., 2008).

Die Wichtigkeit der Glycosylierungen für die Funktion der Kanäle können jedoch erst zukünftige Experimente zeigen.

4.3 Zelluläre Funktion des TPCN2-Kanals

Mittels Coimmunpräzipitations-Experimenten konnte in dieser Arbeit klar gezeigt werden, dass TPCN2-Proteine *in vitro* spezifisch aneinander binden. Diese Erkenntnis passt zu der Vermutung, dass sich die Monomere der TPCN-Kanäle paarweise zusammenlagern, um einen funktionellen Ionenkanal zu bilden, der strukturell den Vier-Domänen-Kanälen ähnlich ist (Ishibashi et al., 2000). Interaktionen zwischen TPCN1 und TPCN2 waren nicht zu beobachten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit fluoreszenzmarkierten und immunocytochemisch nachgewiesenen TPCN-Kanälen offenbarten, dass die Kanäle intrazellulär lokalisiert sind. Mit diesen Daten ist sehr einfach zu erklären, warum standardmäßig durchgeführte Patch Clamp-Messungen an den Plasmamembranen transfizierter Zellen keine TPCN-spezifischen Ströme erfassen. Derartige Messungen wurden mit den in dieser Arbeit klonierten TPCN-Kanälen, die in HEK293-Zellen zur Expression gebracht wurden, durchgeführt. Auch frühere Experimente an transfizierten Zellkulturen und injizierten *Xenopus*-Oocyten konnten keine TPCN-spezifischen Ströme an der Plasmamembran detektieren (Ishibashi et al., 2000).

Die genaue subzelluläre Lokalisation des TPCN2-Kanals konnte mit COS-7-Zellen und der Methode der Immunocytochemie bestimmt werden. Durch den Einsatz des selbst hergestellten TPCN2-spezifischen Antikörpers, der sich als optimal geeignet für den immunocytochemischen Nachweis des TPCN2-Proteins erwies, und diverser Organellenmarker, konnte eindeutig gezeigt werden, dass das heterolog exprimierte TPCN2-Protein im ER lokalisiert ist.

Für diese Beobachtung gibt es zwei mögliche Interpretationen. Eine Möglichkeit ist, dass der TPCN2 zwar *in vivo* in der Plasmamembran vorkommt, aber in den verwendeten Zellkulturen Cofaktoren für die korrekte Faltung und den korrekten intrazellulären Transport fehlen. Es ist denkbar, dass derartige Cofaktoren die in der TPCN2-Sequenz

vorhandenen ER-Rückhaltesignale maskieren und so den Transport zur Plasmamembran induzieren. Derartige Mechanismen konnten bei Proteinen beobachtet werden, deren Zelloberflächenexpression genau reguliert sein muss (Ren et al., 2003). Bei diesen Proteinen sind die Rückhaltesignale je nach Faltung maskiert oder freiliegend und damit aktiv. Zur Abklärung dieser Möglichkeit müssten die Studien zur subzellulären Lokalisation mit Zelllinien durchgeführt werden, die einen nativen TPCN2-Kanal besitzen. Derartige Experimente sind in Zukunft geplant.

Die zweite Möglichkeit ist, dass der TPCN2-Kanal tatsächlich *in vivo* in den Membranen intrazellulärer Organellen vorliegt. Das naheliegendste Indiz hierfür sind die TPCN-Kanäle der Pflanzen, die sich in der Membran der Vakuolen befinden und dort eine Ca^{2+} -abhängige Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen vermitteln (Peiter et al., 2005; Ranf et al., 2008).

Betrachtet man sich in Analogie dazu die tierischen Zellen, dann stellen ER und saure Organellen (Endosomen und Lysosomen) die Speicher für Ca^{2+} -Ionen dar. Daher wäre es denkbar, dass der TPCN2 ein noch funktionell unidentifizierter Ionenkanal des ER ist. Die Ca^{2+} -Signaltransduktionsprozesse am ER und die daran beteiligten Ionenkanäle sind bereits relativ gut charakterisiert (Berridge et al., 2000; Schulz & Krause, 2004; Verkhratsky, 2005), aber noch nicht restlos aufgeklärt. Als größter und bekanntester dynamische Speicher von Ca^{2+} -Ionen ermöglicht das ER, dass die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration über ein komplexes Signaltransduktionsnetz (Abb. 52) in einem sehr engen Rahmen und insgesamt sehr niedrig gehalten wird. Dies ist essentiell für die Zelle, da Ca^{2+} -Ionen wichtige Second Messenger sind (Endo, 2006). Es sind zwei Familien von Ca^{2+} -Kanälen bekannt, die den Ausstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER koordinieren: Erstens die Ca^{2+} -gesteuerten Ca^{2+} -Kanäle, die generell als Ryanodin-Rezeptoren bezeichnet werden und zweitens die Inositoltriphosphat-Rezeptoren (Abb. 52) (Berridge et al., 2000; Schulz & Krause, 2004; Guse, 2004; Verkhratsky, 2005).

Die Signalkaskade zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER über das D-myo-Inositol-1,4,5-triphosphat (InsP_3) sowie dessen Bildung und Wirkung als Botenstoff sind relativ gut charakterisiert (Berridge et al. 2000). Bis jetzt gibt es keinerlei Indizien oder publizierte Daten dafür, dass das InsP_3 neben den bekannten InsP_3 -Rezeptoren auch weitere Zielproteine steuert.

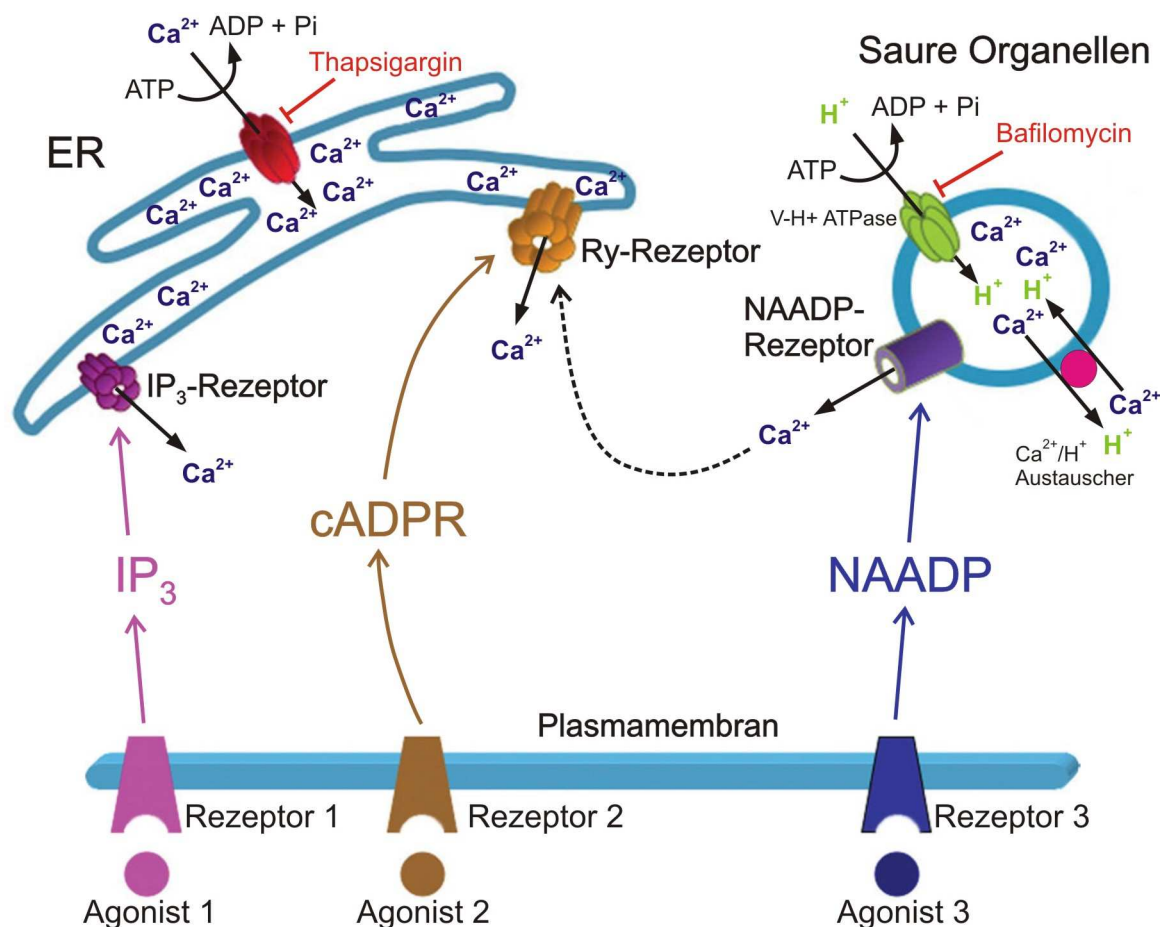


Abb. 52: Selektive Ca^{2+} -Freisetzung aus verschiedenen Ca^{2+} -Speichern durch die Aktivierung unterschiedlicher Zelloberflächenrezeptoren. Nach der Bindung eines Agonisten an einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor werden in der Zelle die Second Messenger mobilisiert. Heute sind drei verschiedene Second Messenger für die Ca^{2+} -Freisetzung bekannt (InsP₃, cADPR und NAADP), die jeweils von separaten Rezeptoren angesteuert werden. Eine Aktivierung der Rezeptoren 1 und 2 setzt Ca^{2+} -Ionen aus dem ER frei, indem InsP₃ an InsP₃-Rezeptoren bindet und sie öffnet, während vom cADPR angenommen wird, dass es die Ryanodin-Rezeptoren öffnet. Die Aktivierung von Rezeptor 3 führt zur Synthese von NAADP, das wiederum einen eigenständigen Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus an separaten Organellen in Gang setzt. Der NAADP-vermittelte Effekt ist eine lokal begrenzte Ca^{2+} -Freisetzung. Möglicherweise kann der NAADP-vermittelte Mechanismus auch Sekundärreaktionen auslösen, indem er Ryanodin-Rezeptoren (gestrichelte Linie) oder InsP₃-Rezeptoren in der Nähe stimuliert und so einen globalen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bewirkt. Der SERCA-Inhibitor Thapsigargin entleert den Ca^{2+} -Speicher des ER und macht damit die Zelle unempfindlich gegenüber InsP₃ und cADPR sowie gegenüber den Agonisten 1 und 2. Eine Behandlung der Zelle mit Bafilomycin löst den Protonengradienten der sauren Organellen auf und beeinträchtigt so ihre Ca^{2+} -Speicherfähigkeit. Dies macht sowohl NAADP als auch Agonist 3 ineffektiv hinsichtlich der Generierung von Ca^{2+} -Signalen. (modifiziert aus Galione, 2006)

Neben dem InsP₃-Signalweg scheint auch der Signalweg über die cyclische Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR) eine zentrale Bedeutung für die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER zu haben und weit verbreitet zu sein (Guse, 2004). Er konnte in einer Vielzahl von Zelltypen, wie z. B. glatte Muskel-, Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen, Neuronen,

hämatopoietische Zellen, Drüsenzellen und Oocyten nachgewiesen werden (Zhang & Li, 2006). Über die Bindung eines Liganden an Rezeptoren in der Plasmamembran wird das Enzym ADP-Ribosylcyclase (ADPRC) aktiviert, das wiederum die Bildung des Botenstoffs cADPR im Cytosol katalysiert (Fliegert et al., 2007). Bekannte Ziele der cADPR sind die in der Membran des ER gelegenen Ryanodin-Rezeptoren, weitere bisher unbekannte Zielproteine können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Hier wäre es interessant in zukünftigen Experimenten zu testen, ob der murine TPCN2 durch cADPR aktivierbar ist.

In neuerer Zeit gewinnt ein dritter Ca^{2+} -mobilisierender Second Messenger an Bedeutung, das Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotidphosphat (NAADP) (Abb. 52) (Lee, 2004; Galione, 2006). Pharmakologische Experimente an Seeigeleiern mit Thapsigargin, einem Inhibitor der sarco(endo)plasmatische Reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), belegten, dass es sich bei den NAADP-sensitiven Ca^{2+} -Speichern um saure Organellen wie z. B. Lysosomen handelt (Genazzani & Galione, 1996; Lee & Aarhus, 2000; Churchill et al., 2002). Weitere Studien an diversen Zelltypen von Mammaliern machten deutlich, dass die NAADP-vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus sauren Organellen ein weit verbreitetes Phänomen ist (Galione, 2006).

Die Signalkaskade der Ca^{2+} -Freisetzung aus den Lysosomen ist auf molekularer Ebene noch nicht komplett aufgeklärt (Galione & Petersen, 2005). So ist z. B. noch nicht sicher, ob das NAADP ausschließlich auf Zielproteine in den sauren Organellen wirkt, oder ob es noch unidentifizierte Ziele am ER gibt. Daher sollen zukünftige Experimente zeigen, ob der heterolog in Zellkulturen exprimierte TPCN2 durch NAADP regulierbar ist.

Interessanterweise sind bestimmte Vertreter der TRP-Kanäle, die ja bekanntlich sehr nahe Verwandte des TPCN2 sind, Zielproteine des NAADP. So zeigen aktuell publizierte Daten, dass der Ionenkanal TRPML1 ein durch NAADP aktivierbarer Ca^{2+} -Freisetzungskanal in der Membran der Lysosomen von Herzmuskelzellen ist (Zhang et al., 2008). Mutationen im TRPML1-Gen führen zu Mucopolipidose Typ IV, einer neurodegenerativen Krankheit die auf einem Defekt der Lysosomen beruht (Sun et al., 2000). Ein weiterer naher Verwandter des TPCN2, der Mucopolipin TRP-Kanal TRPML3, konnte sowohl intrazellulär in Vesikeln von sensorischen Haarzellen als auch in der Plasmamembran von Stereocilien nachgewiesen werden (Di Palma et al., 2002; Clapham, 2003). Sein Fehlen

führt bei Mäusen zu Taubheit und zu Defekten in der Pigmentierung (Di Palma et al., 2002; Clapham, 2003).

Zur Untersuchung, ob der TPCN2 am intrazellulären Signalweg beteiligt ist und wenn ja, welche physiologischen Rolle er dort spielt, sind weitere Experimente geplant, die in naher Zukunft durchgeführt werden sollen. So haben die in dieser Arbeit durchgeführten Studien alle nötigen Voraussetzungen geschaffen, um mit Calcium-Imaging-Experimenten die funktionellen Eigenschaften des TPCN2-Kanals aufzudecken. Mit dieser Methode sollen an transfizierten Zellkulturen unterschiedliche Agonisten, wie z. B. die Second Messenger NAADP und cADPR, auf eine mögliche Steuerung des TPCN2-Kanals hin getestet werden.

Parallel dazu sollen, nachdem jetzt die subzelluläre Lokalisation bekannt ist, Patch Clamp-Messungen am freigelegten ER aufgelöster Zellen durchgeführt werden. Diese beiden unterschiedlichen Methoden könnten dann den entscheidenden Durchbruch in der Aufklärung der elektrophysiologischen und zellbiologischen Rolle des TPCN2-Kanals bringen.

4.4 Bedeutung und Wichtigkeit der TPCN2-Knockout-Maus

Der in dieser Arbeit geplante und erfolgreich hergestellte TPCN2-Targetingvektor sowie das gelungene Gentergeting ermöglichen in naher Zukunft die Zucht einer Mauslinie, deren TPCN2-Gen ausgeschaltet ist. Momentan werden Mäuse, die das Targeting-Konstrukt heterozygot integriert haben, mit Cre-Deleter-Mäusen verpaart, um Nachkommen zu erhalten, deren TPCN2-Gen auf einem Allel ausgeschaltet ist. Diese Mäuse müssen dann nur noch miteinander verpaart werden, um homozygote TPCN2-Total-Knockout-Mäuse zu erhalten.

Danach sind mehrere Szenarien für den Fortlauf der Forschungsarbeit denkbar. Sollte der ungünstige Fall eintreten, dass TPCN2-Total-Knockout-Mäuse nicht lebensfähig sind, dann wäre das kein großes Problem, da bei der Planung des Targetingvektors dieser Fall eingeplant wurde. Dann wären lediglich einige weitere Verpaarungsschritte mit den heterozygoten Mäusen nötig, um „geflochte“ Mäuse zu gewinnen. Diese Mäuse bieten dann eine Fülle von weiteren Möglichkeiten z. B. für einen gewebsspezifischen Knockout oder für einen Knockout erst im adulten Stadium der Mäuse. Spätestens dann, möglicherweise aber auch schon früher, sofern die Total-Knockout-Mäuse lebensfähig sind, eröffnen sich

neue Möglichkeiten zur weiteren Charakterisierung des TPCN2-Kanals. Ein Vergleich von Mäusen, denen der TPCN2-Kanal fehlt mit Wildtyp Mäusen könnte schließlich in der Aufklärung der physiologischen Rolle des TPCN2-Kanals den Durchbruch bringen.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann über die möglichen phänotypischen Auffälligkeiten der Knockout-Maus nur spekuliert werden. Aufgrund des interessanten vielfältigen Expressionsmusters des TPCN2-Kanals, wie z. B. Cerebellum, Nierenmark oder Sinusknoten des Herzens, ist es jedoch sehr gut vorstellbar, dass messbare physiologische Effekte bei der Knockout-Maus auftreten. Am Institut sind die Apparaturen für Verhaltenstests, EKG-Messungen sowie metabolische Untersuchungen vorhanden und etabliert, sodass der phänotypischen Charakterisierung der TPCN2-Knockout-Maus nichts im Wege steht, sobald sie verfügbar ist.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, drei weitgehend uncharakterisierte Vertreter aus der Familie der spannungsgesteuerten Ionenkanäle zu klonieren und auf molekularer Ebene zu charakterisieren.

Zwei dieser Ionenkanäle repräsentieren die *Two Pore Cation* Kanäle (TPCN1, TPCN2), die eine einzigartige Membrantopologie bestehend aus zwei Domänen mit je sechs Transmembransegmenten aufweisen und deren Funktion in Mammaliern unbekannt ist. Der dritte untersuchte Ionenkanal *Voltage Gated Channel Like 1* (VGCN1) ist ein weitgehend uncharakterisierter Vertreter aus der Familie der spannungsgesteuerten Vier-Domänen-Kanäle.

Die Gewebeverteilung aller drei Ionenkanäle in der Maus wurde erstmals systematisch durch den Einsatz verschiedener biochemischer und molekularbiologischer Methoden untersucht. Weiterhin wurden zum ersten Mal die murinen cDNA-Sequenzen der drei Ionenkanäle kloniert, sodass wertvolle neue Sequenzinformationen gewonnen werden konnten.

Die weiteren Arbeiten konzentrierten sich auf den TPCN2-Kanal, da dieser bisher am wenigsten charakterisiert und damit am vielversprechendsten als Forschungsziel war. Die in einen eukaryotischen Expressionsvektor klonierte cDNA-Sequenz ermöglichte eine heterologe Expression des TPCN2-Proteins in Zellkulturen. Durch den Einsatz verschiedener Zelllinien und der Herstellung von gentechnischen Ionenkanal-Mutanten, wie z. B. Fusionen mit dem GFP, konnte die Lokalisation des TPCN2 in der Zelle aufgeklärt werden. Der heterolog exprimierte Kanal war ausschließlich intrazellulär in der Membran des ER lokalisiert. Die Abwesenheit des Kanals in der Plasmamembran wurde nicht nur konfokalmikroskopisch bestimmt, sondern auch immunocytochemisch klar belegt. Weiterhin wurde erstmalig der TPCN2-Kanal auf Proteinebene charakterisiert. Die erfolgreiche Herstellung eines spezifischen Antikörpers machte die Detektion des heterolog exprimierten Proteins im Western Blot möglich. Auf diese Weise konnte in Folgeexperimenten nicht nur festgestellt werden, dass der TPCN2-Kanal glycosyliert wird, sondern auch, dass TPCN2-Proteine aneinander binden und somit vermutlich *in vivo* als Dimere vorliegen.

Schließlich war ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit die Planung und erfolgreiche Klonierung eines Targetingvektors für eine TPCN2-Knockout-Maus. Das sich anschließende Gentergeting von murinen embryonalen Stammzellen mit dem Targetingvektor gelang ebenfalls, sodass zunächst chimäre Mäuse und dann nach Verpaarungen heterozygote Mäuse mit dem Targetingkonstrukt erhalten werden konnten. Mit diesen Mäusen kann jetzt mit wenigen weiteren Verpaarungsschritten eine TPCN2-Total-Knockout-Maus gewonnen werden, die in naher Zukunft ein wertvolles Mittel für die weitere Charakterisierung des TPCN2-Kanals sein wird.

6 Anhang

6.1 Verwendete Primer

Primer für den VGCNL1-Kanal

Primer zur Klonierung der cDNA-Einzelfragmente des VGCNL1-Kanals

Vorderes Fragment (NheI / EcoRI, Klonierung in pIRES2-EGFP)

Rb21_kozacneu_f AAC TAG CTA GCG CCA CCA TGC TCA AAA GAA AGC AGA GTT
CCA

Rb21_22r GAG CTG ATG TAG CCA GTA AAC

Mittleres Fragment (EcoRI / KpnI, Klonierung in pcDNA3)

Rb21_14f CAA CTT CTA CAG CCA CCA CAC

Rb21_29r TGG AGG TTG AAC CAT ACA ATC

Hinteres Fragment (KpnI / XhoI, Klonierung in pcDNA3)

Rb21_1f AAT CCT CGG AAC TTT AAC TTC G

Rb21_Xho-rev CCG CTC GAG CTT GGG TGG AAT TTA GGG TTT A

Vorderes Fragment (SacI / EcoRI, Klonierung in pBluescript II SK)

Rb21_SacI-NheI-k ACC GTC AGA GAG CTC GCT AGC GCC ACC ATG CTC AAA AGA
AAG CAG AGT TC

pIRES_egfp_rev2 CTT CGG CCA GTA ACG TTA GG

Vorderes Fragment (HindIII / EcoRI, Klonierung in pcDNA3)

Rb21HindSacNhe-f GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCT TGA GCT CGC TAG
CGC CAC C

Rb21_22r GAG CTG ATG TAG CCA GTA AAC

Primer für Nachweis-RT-PCR-Reaktionen

Rb21_10f CAG GGG GAA ATC TCT TGA AAC T

Rb21_15f GGA CGA CAG AGA AGT CTT AGG

Rb21_9r CAG AAG TTT CTG AAC CTG TGC T

Primer zur Amplifikation von cDNA, Plasmid-DNA oder zur Sequenzierung

Rb21_2f TGC GGT TAC AGA CTG TGG TTTT

Rb21_5f CTG AAT CTG CTT GTA GCC ATAAT

Rb21_6r ATT ATG GCT ACA AGC AGA TTC AG

Rb21_8f GGG AAA AAA CTT GGA AGC TTG G

Rb21_11r AAC TAC ACC GAC AAA AAG CGT C

Rb21_12f ATG TGA AGG ATC GCT GGT GTG

Rb21_13f TAG CTA TTC CAG ATA CGC ACT G

Rb21_16f TCA TGA GCA TTG AGC TTA ATC TG

Rb21_17f ATG AGG AAA GTT GTT CGA GAA C

Rb21_18f GGT TCT GGC CCA GTC TGT GT

Rb21_19f TAT CGC TCT GTA GAC ATC AGA AA

Rb21_20r AGC CCG GAT CAT AAT GAG TG

Rb21_23r GTT GCA AAG AGA TGA TAG AGG

Rb21_24r ATT TTT GTG ACT GCA GTC TCC

Rb21_25r	TTT TGG ATG CAT TGA AGC GTG
Rb21_26r	CACTGA AAA GTT CTC GAA CAA C
Rb21_27r	CAA CCC AGG AAT ACG AAA ACA
Rb21_28r	CTT CTG CTT TGC CAG AAT CCA
Rb21_30r	TTT CTG ATG TCT ACA GAG CGA TA
Rb21_31r	CAA TCT TCC TTT GGG GTT TTC
Rb21_32f	CCG TAA AGT ATG GTG AGA ACA TT

Primer für Northern-Blot-Sonden

N-hinten_f	TGC TGG AGT TGT TCT GTT TGG
N-hinten_r	CTA AAT ATC CAG GAG GTC ATC TC

Primer für den TPCN1-Kanal

Primer zur Klonierung der cDNA-Einzelfragmente des TPCN1-Kanals

Vorderes Fragment (HindIII / EcoRI, Klonierung in pcDNA3)

TPCN1_5f	TTA GAA ATG CCT CTG ATG GAA
TPCN1_8r	ATG CTT TGA GGT GAA ATT CCC A

Hinteres Fragment (EcoRI / XhoI, Klonierung in pcDNA3)

TPCN1_1f	CAG ACA GCA TTG GTT TGA TGA G
TPCN1_20r-XhoI	GTG GGG TTT CTT CCT AGT GGT CTC GAG CCT CAT ACC AGA CAC AGA CAC

Primer für Nachweis-RT-PCRs

TPCN1_3f	CAC AAC TGG GAG ATG AAT TAT CA
TPCN1_4r	TTG AAG GTG TCG AAC ACC ACG

Primer zur Amplifikation von cDNA, Plasmid-DNA oder zur Sequenzierung

TPCN1_7f	TCC TCA TCT TCA AAG GGA TTA A
TPCN1_9f	TCA TCG AGG CCA TTG TGG TG
TPCN1_10f	CTT TCC AGA TGT CAT GAT GCC
TPCN1_11r	GTT GAC AAC GGT GAG CTC AAA G
TPCN1_13f	AAC ACC AGC ACA GTG GCC G
TPCN1_13r	CAT AGA AGA GGC TGG CTT GAC
TPCN1_14f	CTG AGT CTG AAG ATG TAC CAG
TPCN1_15f	TGG GAA TTT GAC TTG CTC AGG
TPCN1_16r	CCA AGC AAC AGC AGG TTT GGA
TPCN1_17r	ATC CTC ATA CCA GAC ACA GAC A
TPCN1_18r	TTC AAA TAC CAC CAC CAT GAG
TPCN1_19f	GAG CTA CGC TGT GCA GAC C
TPCN1_21f	GAG CTA CGC TGT GCA GAC C
TPCN1_22f	GAC GGC GCG TAC CTT AGA AG
TPCN1_23r	GGC GAA TGC CGT GAC CGA G

Primer zum Anbringen eines myc-Tags an das 5'-Ende der TPCN1-cDNA-Sequenz

TPCN1_Hind_myc_f	GAG GAC CGC AAA GCT TGC CAC CAT GGA ACA AAA ACT CAT
	CTC AGA AGA GGA TCT GAT GGC TGT AAG TTT AGA TGA
TPCN1_24r	CAG GAA AAT GCA GCG TAG TGC

Primer zum Anbringen der GFP-Sequenz an das 5'-Ende der TPCN1-cDNA-Sequenz

GFP_HindIII_f	GCT AGC GCT AAA GCT TGC CAC CAT GGT GAG CAA GGG CGA G
OLf_GFP_TPCN1	GGA CGA GCT GTA CAA GAT GGC TGT AAG TTT AG
OLr_GFP_TPCN1	CTA AAC TTA CAG CCA TCT TGT ACA GCT CGT CC
TPCN1_24r	s.o.

Primer zur Klonierung der TPCN1-cDNA-Sequenz in den Pflanzenvektor pSAT-1564

T1_pf_Hind3_f	CCA TTC CCA AGC TTG CCG CCA CCA TGG CTG TAA GTT TAG
T1_pf_Kpn1_r	CGG GCC CGC GGT ACC TGG TGA CAG TCT GGG AGC GCT GGC

Primer zur Klonierung der Sequenz für die *in situ* Hybridisierungs-Sonde

TPCN1_XbaI_10f	CTA GTC TAG ACT TTC CAG ATG TCA TGA TGC C
TPCN1_8r	s.o.

Primer für den TPCN2-Kanal**Primer zur Klonierung der TPCN2-cDNA-Sequenz in den Vektor pcDNA3**

TPCN2-KpnI-Kozak	GGC TGT GGT ACC GCC ACC ATG GCG GCA GAA GAG CAG C
TPCN2_14r_XhoI	GCC GCT CGA GAG GCC AGC ATC TCT GTC CTG

Primer für Nachweis-RT-PCRs

TPCN2_3f	GAC AAC AAC TCA GCT GTA TGT G
TPCN2_4r	TGC CGA CTA ATG GTC TGC CAA

Primer zur Amplifikation von cDNA, Plasmid-DNA oder zur Sequenzierung

TPCN2_1f	CAT CCC CAA CAT AAA GCC AAT
TPCN2_7f	ATC TTG TAC TAC CTG CTG GAG
TPCN2_8r	CGT AGC GCT TAT AGG CTT CCA
TPCN2_10f	ATG CTG CTG TTC ACC ATT GGT
TPCN2_12f	CGG CCT GTT ACA TTG GTG GG
TPCN2_13r	ACG AGG TTC CCC AGG TAG TC
TPCN2_15f	GGA CAT GAC ACG ACT GAT GAA
TPCN2_16f	CTT CCT GCT GCA GAA TTC CTC
TPCN2_17r	CCG TAT GAT ACA CAA ACG GTA C
TPCN2_18f	CGC TGA GCC TTG CTT GTG AG
TPCN2_19r	CTG GAG GCG AGG ACT TCG TA
TPCN2_20f	GAA ATC TCT ACA GAC CTC ACT G
TPCN2_21r	CAC CTC GGA ACA GGT TGA TC
TPCN2_22f	ATC AGA GTG GCT TCC TTG CTG
TPCN2_23f	CTT CTG CCA CTA GGT GCT GC

TPCN2_24r GCA CAC GTT GGC AGA CGT TC

Primer zum Test auf ein hypothetisches Zusatzexon im 5'-Bereich

TPCN2-5utr-test CGA GTT AGT GTC AAC ATA TTG

Primer zum Anbringen eines myc-Tags an das 5'-Ende der TPCN2-cDNA-Sequenz

TPCN2_KpnI-mycf CCG GGG TAC CGC CAC CAT GGA ACA AAA ACT CAT CTC AGA
AGA GGA TCT GAT GGC GGC AGA AGA GCA GC

TPCN2_11r GTG AGG TCA GTG CTT CTG GAA

Primer zum Anbringen der GFP-Sequenz an das 5'-Ende der TPCN2-cDNA-Sequenz

GFP-KpnI-f CCG GGG TAC CGC CAC CAT GGT GAG CAA GGG CGA G
OLf_GFP_TPCN2 GGA CGA GCT GTA CAA GAT GGC GGC AGA AGA GCA GC
OLr_GFP_TPCN2 GCT GCT CTT CTG CCG CCA TCT TGT ACA GCT CGT CC
TPCN2_11r GTG AGG TCA GTG CTT CTG GAA

Primer zur Klonierung der TPCN2-cDNA-Sequenz in den Pflanzenvektor pSAT-1564

T2_pf_BglIIIf GGA GGA GGA AGA TCT GCC GCC ACC ATG GCG GCA GAA GAG
CAG C

T2_pf_Kpn1r GAT CCC GGG CCC GCG GTA CCT CCT GCA CAG ATG CAA GTG
TGG G

Primer zur Insertion eines HA-Tag in die cDNA-Sequenz des TPCN2 in pcDNA3

T2-HA_OL_rev GTC GGG AAC ATC GTA TGG GTA AGT CTT TGT GAA GGA AGA
TGG G

T2-HA_OL_for TAC GAT GTT CCC GAC TAC GCA GAT GTG CGC TAC CGT TC

Primer zur Erstellung der TPCN2-AAA-Mutante

T2_QC-aaa_for CAG ACC TCA CTG TTC GCT GCT GCT CTG GGG GCC CGT GC
T2_QC-aaa_rev GCA CGG GCC CCC AGA GCA GCA GCG AAC AGT GAG GTC TG

Primer zur Erstellung der TPCN2-Mutanten ohne N- bzw. ohne C-Terminus

T2-ohneNT_Kpn_f CAG GGG TAC CGC CAC CAT GTA TTA CTC GAA CGT CTG CCA AC
GFPT2_QC_NTw_f CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAT TAC TCG AAC GTC
TGC CAA CG

GFPT2_QC_NTw_r CGT TGG CAG ACG TTC GAG TAA TAC TTG TAC AGC TCG TCC
ATG CCG AG

T2_QC_NTweg_f CCA AGC TTG GTA CCG CCA TGT ATT ACT CGA ACG TCT GCC
AAC G

T2_QC_NTweg_r CGT TGG CAG ACG TTC GAG TAA TAC ATG GTG GCG GTA CCA
AGC TTG G

T2_ohne_CT_Xho_r GCC GCC TCG AGT CAG TGG AGA AAG TTC TCC AGA AG

Primer für Southern-Blot-Sonden zur Untersuchung der PAC-Klone

T2_Ex7_BamHI_for CCG CGG ATC CCA GGG CTG AAA ATC CTC AGG
T2_Ex7_EcoRI_rev GTC CGG AAT TCG CTT AAG CGG GGT CAT GAC A

Primer für das TPCN2-Targeting

Primer zur Klonierung der homologen Bereiche des TPCN2-Targetingvektors

Klonierung der 5'-Homologie

T2_5'_1f	CTT GCT TGT GAG GAG GTA GG	Beginn Fragment 1
T2_32r_KpnI-NdeI	AAT GGG AAT TCC ATA TGG GTA CCC TGC AGG GCT TCC GGG CC	Ende Fragment 3

Klonierung der 3'-Homologie

T2_XbaI_30f:	CTA GTC TAG AAC TAG GTT TCT GCC CTT TGA AG	Beginn Fragment 5
T2_22r-AscI-XhoI	GGA ATC GGC CTC GAG GGC GCG CCG ACA GTC ACA CCA CTA GAG G	Ende Fragment 7

Klonierung des zentralen Bereichs mit Exon 7

T2_Fr4_Not-Sal_f	GGT TGC GGC CGC CGG AAG TCG ACC TGC AGC TCT TGG AGC CTT C	Beginn Fragment 4
T2_31r_FRT-XbaI	CTA TCT AGT CTA GAG AAT AGG AAC TTC CTG CAG GAG GAA CTT TCC AG	Ende Fragment 4

Primer für die Sequenzierung des Targetingvektors

T2_5'_2r	TAC TGT TCC CAC ATG CTA GGC
T2_5'_3f	CAA GAA TGT TGT GTC ATC CCT T
T2_5'_4r	GCT CAC CTG GCC ATT TCT GG
T2_5'_6r	TAG CTT CAC ACA GTG TAA GAG G
T2_5'_7f	TCC TTC TAT AAA CTA AGT TTA CGG
T2_5'_8r	CCT GGA CAT AGC CCT TAA ACG
T2_3'_9f	GTC CAC CCT GTT TTC TGA GC
T2_3'_12r	GCT AGA AGA TGA GAA CAG GCC
T2_5'_13f	AAG AGA ATG GTT GTA TAG CCA TC
T2_5'_14r	CTG GAT AGA CTC TGT TTT GTG C
T2_5'_15f	AGG TGC TAG GTG TCT TGA TGG
T2_5'_16r	CAC ACA GGG ACA TAA CAA CTA C
T2_5'_17r	CAA ACA GGC ACA GAA TGC TTG
T2_5'_18f	ACT GCA CTG CAC TGC ACT GC
T2_5'_19r	GAC AGA ATG AAT CAG GAT ATG C
T2_5'_20r	CAG AGT TAG TTT GAA GCC AAG C
T2_3'_21f	TTG AGG TTG GAC TTT GAA CAG G
T2_3'_23f	GTC TAT GTA TGC ATA TCT GTA GG
T2_3'_24f	GTG ACG ATG TGT TGA CAG TGG
T2_3'_25f	TAC TAG CTT CCC ACT CCA TGC
T2_3'_26r	CTC ACA CAC TCA AGC CAA ACC
T2_3'_27r	ATG ACA CAG TCT GTG AGA TGG
T2_3'_28r	GAC AGA CAT GGA GAC ACA TCC
T2_3'_29r	CGG AAA GAC AGT GCT TAG CAC

Primer zur Sequenzierung der Hilfsvektoren

pBS_HV-seq_for	CTG TTG GGA AGG GCG ATC G
pBS_HV-seq_rev	GTG AGT TAG CTC ACT CAT TAG G

Primer für Southern Blots

5'-So_TPCN2_f	CGG TGC ATG TGT GTA TTC TC
5'-So_TPCN2_r	TCC ATC TAT ACA CAC ACA AGG
3'-So_TPCN2_f	CCA GAG TTG GTT GTT CAG AAC
3'-So_TPCN2_r	CCG TGA GCT TCC ATC ATG AGC
5'-So_T2neu_for	CAT GTG TGG CTT AGT GTG AGG
5'-So_T2neu_rev	CTA TTG AGC CAG GAA GCA TCC
3'-So_T2neu_for	CAA AGA GGT AAG TAG GTC TGG
3'-So_T2neu_rev	CTG AGT CAT GCC TGG CAA GG

Primer für Test-PCRs der Stammzellklone

T2-33f	TCA GAC ATT ACA GAC TCA GAC C
NeoSeqRev	TTT GTC ACG TCC TGC ACG AC
T2-35f	ACT GAA GGC TCT TTA CTA TTG C
T2-36r	GAT GAG ACC TTG TCA AGA TCG

6.2 Peptidsequenzen für die Herstellung polyklonaler Antikörper

Antigen	Aminosäuresequenz
TPCN1	CAAQQ PPGSR QRSQT VT
TPCN2	CDILE EPKEE ELMEK LHKHP

6.3 Verwendete Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Spendertier	Verdünnung	Hersteller
anti-TPCN1	Kaninchen	1:1000 Western Blot	selbst hergestellt
anti-TPCN2	Kaninchen	1:1000 Western Blot 1:1000 Immuncytochemie	selbst hergestellt
anti-Myc	Maus	1:1000 Western Blot 1:1000 Immuncytochemie 1:200 CoIP	Cell Signaling
anti-GFP	Maus	1:2000 Western Blot 1:500 Immuncytochemie	Clontech
anti GST	Maus	1:500 CoIP	Amersham
anti-HA	Maus	1:1000 Immuncytochemie	Cell Signaling
anti-Lamp1	Kaninchen	1:250-1:1000 Immuncytochemie	Abcam
anti-Calnexin	Ziege	1:25 – 1:200 Immuncytochemie	Santa Cruz Biotech.

Sekundärantikörper

Antikörper	Spendertier	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
anti-mouse	Esel	HRP	1:2000-1:5000	Amersham
anti-rabbit	Esel	HRP	1:2000-1:5000	Amersham
anti-rabbit	Esel	AMCA	1:100	Jackson ImmunoResearch
anti-goat	Esel	Cy2	1:200	Jackson ImmunoResearch
anti-mouse	Esel	Cy2	1:200	Jackson ImmunoResearch
anti-rabbit	Esel	Cy3	1:400	Jackson ImmunoResearch
anti-mouse	Ziege	Cy5	1:400	Jackson ImmunoResearch

6.4 Sequenzen der aus Maus-Gehirn-cDNA klonierten Ionenkanäle

6.4.1 Sequenz des VGCNL1

Die im Rahmen dieser Arbeit klonierte cDNA-Sequenz stimmt exakt mit der in der Gene-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.org>) abgelegten Sequenz unter der Acession Number NM_177393 (*Mus musculus sodium leak channel, non-selective (Nalcn), mRNA*) überein.

6.4.2 Sequenz des TPCN1

```

1      ATGGCTGTAAGTTTAGATGACGATGTGCCGCTCATCCTGACCTGGACGAGGCTGAGAGT
1      M A V S L D D D V P L I L T L D E A E S

61     GCTCCGCTGCCTCCTTCGAACAGCCTGGGCCAAGAGCAGCTGCCAGCAAAAATGGGGGC
21     A P L P P S N S L G Q E Q L P S K N G G

121    AGCCACAGCATCCACAACCTCCCAGGTCCCCAGTCTGGTCTCCGGAGCGGACAGCCCCCCC
41     S H S I H N S Q V P S L V S G A D S P P

181    TCCAGTCCCACCGACACAACCTGGGAGATGAATTATCAAGAGGCGGCAATCTACCTCCAG
61     S S P T G H N W E M N Y Q E A A I Y L Q

241    GAAGGTCAGAACAACGACAAGTTCTTACCCACCCCAAGGATGCCAGAGCGCTGGCGGCC
81     E G Q N N D K F F T H P K D A R A L A A

301    TACCTCTTCGTCCACAACCACTTCTTCTACATGATGGAGCTGCTCACGGCCCTGCTCCTG
101    Y L F V H N H F F Y M M E L L T A L L L

361    CTGCTGCTGTCGCTGTGCGAGTCCCCCGCTGTCCCCGTGCTCAAGCTGCACACTTACGTC
121    L L L S L C E S P A V P V L K L H T Y V

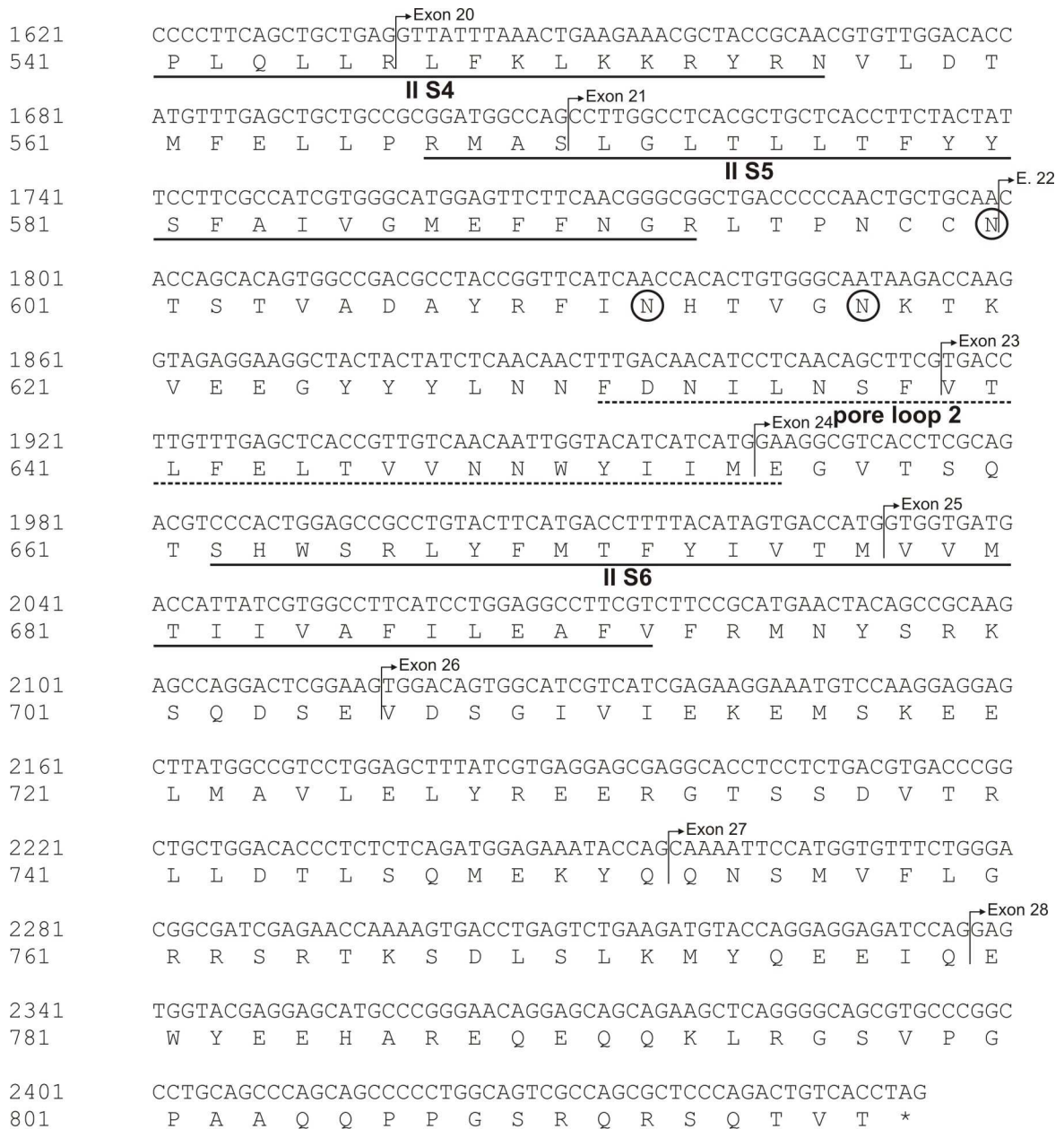
421    CACGCCACGCTGGAACCTTTTGCCCTCATGGTGGTGGTATTTGAACTCTGCATGAAATTG
141    H A T L E L F A L M V V V F E L C M K L

```

IS1

IS2

481 CGGTGGCTGGGCTTCCACACGTTTCGTCGGGCACAAACGTACCATGGTCAAGACGTC^{Exon 6}CGTC
 161 R W L G F H T F V R H K R T M V K T S V
I S3
 541 CTCGTGGTGCAGTTCATCGAGGCCATTGTGGTGTGGTTCGGCAGACGTCCCACGTGCGG
 181 L V V Q F I E A I V V L V R Q T S H V R
 601 GTGACCCGGGCACTACGCTGCATTTTCTGGTGGACTGTCGCTACTGTGGCGGTGTACGG
 201 V T R A L R C I F L V D C R Y C G G V R
I S4
 661 ^{Exon 7}CGCAACCTGCGGCAGATCTTCCAGTCTCTCCCACCCTTCATGGACATCCTCCTGTTGCTG
 221 R N L R Q I F Q S L P P F M D I L L L L
I S5
 721 CTCTTCTTTATGATCATCTTTGCCATCCTCGGTTTCTACTTATTCTCCACAAATCCTTCC
 241 L F F M I I F A I L G F Y L F S T N P S
Exon 9
 781 GACCCCTACTTCAGCACCCCTGGAGAACAGCATCGTCAACCTGTTTCGTTCTCCTGACCACA
 261 D P Y F S T L E N S I V N L F V L L T T
pore loop 1
 841 GCCAACTTTCCAGATGTCATGATGCCCTCCTACTCCCGGAACCCCTGGTCTGCGTCTTC
 281 A N F P D V M M P S Y S R N P W S C V F
Exon 11
 901 TTCATTGTATACCTCTCCATTGAGCTGTACTTCATCATGAACCTGCTCCGGCCGTGGTG
 301 F I V Y L S I E L Y F I M N L L L A V V
I S6
 961 TTCGACACCTTCAACGACATTGAAAAGCACAAGTTCAAGTCTTTGCTGCTGCACAAACGG
 321 F D T F N D I E K H K F K S L L L H K R
Exon 12
 1021 ACCGCCATCCAGCATGCCTACGGCCTGCTTGCCAGCCAACGGAGGCCGGCTGGCATCTCC
 341 T A I Q H A Y G L L A S Q R R P A G I S
 1081 TACAGGCAGTTCGAAGGCTTAATGCGCTTCTACAAGCCCCGGATGAGTGCAAGGGAACGG
 361 Y R Q F E G L M R F Y K P R M S A R E R
Exon 13
 1141 TTCCTGACTTTCAAGGCCCTGAACCAGAGCAACACGCCTCTGCTCAGCCTGAAGGACTTC
 381 F L T F K A L N Q S N T P L L S L K D F
Exon 14
 1201 TATGATATTTACGAAGTCGCTGCTCTGCAGTGGAAGGCAAAGAGAAACAGACAGCATTGG
 401 Y D I Y E V A A L Q W K A K R N R Q H W
Exon 15
 1261 TTTGATGAGCTCCCCGGACAGCCTTCTCATCTTCAAAGGGATTAACATCCTTGTGAAT
 421 F D E L P R T A F L I F K G I N I L V N
Exon 16
 1321 TCCAAGGCCTTCCAGTATTTTCATGTA^{Exon 16}CTTGGTGGTGGCTGTCAACGGTGTCTGGATCCTG
 441 S K A F Q Y F M Y L V V A V N G V W I L
II S1
 1381 GTGGAGACATTCATGTTGAAAGGTGGGAATTTACCTCAAAGCATGTGCCCTGGAGTTAC
 461 V E T F M L K G G N F T S K H V P W S Y
Exon 18
 1441 CTCGTGTTTCTTACCA^{Exon 18}TCTATGGAGTTGAACTGTTTCATGAAGGTGGCTGGCCTGGGCCCT
 481 L V F L T I Y G V E L F M K V A G L G P
II S2
 1501 GTGGAGTACCTGTCCTCTGGATGGAACCTGTTTCGATTTCTCGGTCACGGCATTGCGCTTC
 501 V E Y L S S G W N L F D F S V T A F A F
II S3
 1561 CTGGGACTGCTCGCACTGACGCTCAACATGGAACCCCTTCTATTTTCATTGTGGTCTGCGT
 521 L G L L A L T L N M E P F Y F I V V L R



Die waagerechten Linien kennzeichnen die Transmembransegmente, die gepunkteten Linien kennzeichnen die *Pore Loops* und die Kreise markieren die Glycosylierungsstellen. Die Exongrenzen sind ebenfalls eingezeichnet.

6.4.3 Sequenz des TPCN2

```

1      ATGGCGGCAGAAAGAGCAGCCCCTTCTGGGCCGGGACCGAGGCAGTGGCCAGGTCCACTCC
1      M A A E E Q P L L G R D R G S G Q V H S
61     |
      |Exon 2
      |
61     GGTGCTGCAGCCGATCAGGAGCTCTGCATAGACCAGGCTGTGGTCTTCATTGAAGACGCC
21     G A A A D Q E L C I D Q A V V F I E D A
121    |
      |Exon 3
      |
121    ATAAAGTACCGCTCCATCTACCACCGCATGGATGCTGGTTCATTGTGGCTTTACCGCTGG
41     I K Y R S I Y H R M D A G S L W L Y R W
181    |
      |Exon 4
      |
181    TATTACTCGAACGTCTGCCAACGTGTGCTGGGCTTCATCATTTCCTGATCCTGATCTTG
61     Y Y S N V C Q R V L G F I I F L I L I L
      |
      |IS1
241    GCTTTTGTGGAGGTCCCATCTTCCTTCACAAAGACTGCAGATGTGCGCTACCGTTCCCAG
81     A F V E V P S S F T K T A D V R Y R S Q
301    |
      |
301    CCCTGGCAGCCGCCCTGTGGCCTGACCGAGACGATCGAGGCGTTCTGCTTGCTTGCCCTC
101    P W Q P P C G L T E T I E A F C L L A F
      |
      |IS2
361    CTGGTTGACCTCTCTGTGAAGGGCTACTTGGTTGGGCAGGCCAGTTGCAGCAGAACCTG
121    L V D L S V K G Y L V G Q A Q L Q Q N L
421    |
      |
421    TGGCTGCTGGCCTACTTTATGGTGTGGTGTGTCTGTGGTGGACTGGATCGTTTCGCTG
141    W L L A Y F M V L V V S V V D W I V S L
      |
      |IS3
481    AGCCTTGCTTGTGAGGAGCCCCTGCGGATGCGCCGGCTGCTCCGCCCTTCTTCCTGCTG
161    S L A C E E P L R M R R L L R P F F L L
      |
      |IS4
541    CAGAATTCCTCCATGATGAAGAAGACCCCTGAAGTGTATACGGTGGTTCGCTACCAGAAATG
181    Q N S S M M K K T L K C I R W S L P E M
601    |
      |Exon 7
      |
601    GCCAGTGTTCGGGCTGCTGCTGGCCATCCACCTGTGTCTCTTCACCATCATTTGGGATGCTG
201    A S V G L L L A I H L C L F T I I G M L
661    |
      |Exon 8
      |
661    CTGTTACCATTTGGTGAGAAGGATGAAGCACAGGACCAGGAGAGGCTGGCCTACTTCCGG
221    L F T I G E K D E A Q D Q E R L A Y F R
721    |
      |
721    AACCTTCCAGAAGCACTGACCTCACTCCTAGTGCTGCTGACGACTTCCAACAACCCTGAT
241    N L P E A L T S L L V L L T T S N N P D
      |
      |pore loop 1
781    GTGATGATCCCTGCGTATACTCAGAACC GGCCCTTTGCTCTCTTCTTCATAGTCTTCACC
261    V M I P A Y T Q N R A F A L F F I V F T
841    |
      |Exon 10
      |
841    TTGATAGGAAGCTTGTCTTCTGATGAACCTGCTGACAGCCATCATCTATAATCAGTTCCGT
281    L I G S L F L M N L L T A I I Y N Q F R
901    |
      |Exon 11
      |
901    GGCTACCTAATGAAATCTCTACAGACCTCACTGTTCCGGCGGCGACTGGGGGCCCGTGCA
301    G Y L M K S L Q T S L F R R R L G A R A
961    |
      |
961    GCCTACGAAGTCCTCGCTCCAGGGCCGGCCAGCTGGAACCACCCCTGAGTTAGTTGGG
321    A Y E V L A S R A G P A G T T P E L V G
1021  |
      |
1021  GTGAATCCTGAGACCTTCTGCCAGTGCTTCAGAAAACGCAGCTGAACAAAACCCACAAA
341  V N P E T F L P V L Q K T Q L N K T H K

```

1081 CAAGCCATTATGCAGAAAGGTGCAGTCCTATGAAGGCCGCCCAATGCTGGCTGATGAGTTC
 361 Q A I M Q | K V Q S Y E G R P M L A D E F

1141 CAGAAACTCTTCGATGAGGTTGACAAAGGTTTGGCCAAAGAGCGCCCGCTGAAGCCCCAA
 381 Q K L F D E V D K G L A K E | R P L K P Q

1201 TACCAGTCTCCATTTCTGCAGACTGCCAGTTCATCTTTAGCCACCACACTACTTCGACTAC
 401 Y Q S P F L Q T A Q F I F S H H Y F D Y

1261 CTGGGGAACCTCGTCGCTCTGGGAAACCTCTTGTCTATTTGTGTGTTCCCTGGTGTGGAC
 421 L G N L V A L G N L L S I C | V F L V L D

II S1

1321 TCAGACCTGCTGCCTGGGGAACGTGATGACTTTGTCCTGGGGATTCTTGACTACATCTTC
 441 S D L L P G E R D D F V L G | I L D Y I F

1381 ATCTTGTACTACCTGCTGGAGCTGCTGTTTAAAGGTGTTTCGCGCTGGGCCCTGCCAGGCTAC
 461 I L Y Y L L E L L F K V F A L G L P G Y

II S2

1441 CTGTCTACCATAGCAATGTGTTTGTATGGCCTCCTCACCATCATCCTGCTGGTTTCGGAG
 481 L S Y H S N V F D G L L T I I L L | V S E

II S3

1501 ATTTGCACCCTGGCTGTATACCGATTGCCGCACTCAGGATGGAAGCCAGAGCAGTATGGC
 501 I C T L A V Y R L P H S G W | K P E Q Y G

1561 CCACTGTCGCTCTGGGACATGACACGACTGATGAACACACTGATTGTGTTTCGCTTCCTG
 521 P L S L W D M T R L M N T L I V F R F L

II S4

1621 CGCATCATCCCCAACATAAAGCCCAATGGCTGAGGTAGCCAACACCATCCTGGGCCTAATC
 541 R I I P N I K | P M A E V A N T I L G L I

1681 CCTAACTTGAGGGCATTGTTGGTGGGATCCTGGTGTGGCATACTATGTGTTTGCATGATC
 561 P N L R A F G G I L V | V A Y Y F A M I

II S5

1741 GGGATCAACCTGTTCCGAGGTGTCATCGTCCCTCCTGGAAACAGCAGCCTGGTTCCCGAC
 581 G I N L F R G V I V P P G (N) S S L V P D

1801 AACAACTCAGCTGTATGTGGAAGCTTTGAGCAGCTAGGTTACTGGCCCAACAACTTTGAC
 601 (N) N S A V C G S F E Q L G Y W P N N F D

1861 GACTTTGCTGCTGCTTTGATCACACTGTGGAACGTGATGGTGGTGAACAATTGGCAGGTG
 621 D F A A A L I T L W N V M V V N N W Q V

pore loop 2

1921 ATCCTGGAAGCCTATAAGCGCTACGCAGGCCCGTGGTCAATGGTGTATTTTGTGCTATGG
 641 I L E A Y K R Y A G P W S M V Y F V L W

1981 TGGCTGGTGTCTCTGTTATCTGGATCAACCTGTTTCTGGCTCTTCTTCTGGAGAACTTT
 661 W L V S S V I W I N L F L A L L L E N F

II S6

2041 CTCCACAGATGGGACCCTCAAGGTCATAAGCAGCTCCTTGTGGGACCAAGCAGATGTCT
 681 L H R W D P Q G H K Q L L V G T K Q M S

2101 GTGGAGCTCATGTTTCAGGGATATCCTAGAAGAGCCCAAGGAGGAGGAAGTATGGAGAAG
 701 V E L M F R D I L E E P K E E E L M E K

2161 CTACACAAACACCCACACTTGCATCTGTGCAGGTGA
 721 L H K H P H L H L C R *

6.5 Vergleich der murinen TPCN-Kanal-Sequenzen mit der Sequenz des TPCN1 aus *Arabidopsis thaliana*

mTPCN2MAAEEQPLIGRD.RGSGQ...VHSGAAADQELCID	31
mTPCN1	MAVSLDDDDVPLILTLDEAESAPLPSPNSLGOEQ...LPKNGGSHSINHNS	47
araTPCN1MEDPLIGRDSLGGGTDVRVRRSEAITHTGTFPQ	32
<hr/>		
mTPCN2	QAVVFIEDA.....IKYRSIYHRMDAGSLWLWRWYYSNVCQR	68
mTPCN1	QVPSLVSGADSPSSPTGHNWEMNYQEAAIYLQEGQNNDKFFTHPKDARA	97
araTPCN1	KAAALVVDLAEDG.....IGLPVEILDQSSFGEASARYFYFIFTRLDL	72
<hr/>		
I S1		
mTPCN2	VLGFIIFLILILIAFVEMPSFTKTADVRYRS.....QPWQPPCGLTET	111
mTPCN1	LAAYLFVHNHFFYMMELLTALLLLLSLCEP...AVPVLKLFHTYVHAT	143
araTPCN1	IWSLNYFALLFLNFFEQPLWCEKNPKPSCKDRDY YYLGELPYLTNAESII	122
<hr/>		
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> I S2 I S3 </div>		
mTPCN2	IEAFCLLAFVLVDLSVKGYLVGQAQLQONLWLLAYFMVLVVSVDWIVLSLS	161
mTPCN1	LELFAIMVVVFELCMKLRWLGFTFRHRKRTMVKTSVLVVOFIEAIVMLV	193
araTPCN1	YEVITLAILLVHTFFPISYEGSRIFWTSRLNLVKVACVVILFVDVLVDFL	172
<hr/>		
I S4		
mTPCN2	LACEEP.....LRMRLLRPFFLLQN..SSMMKKTCLKCIRWSLPEMASVG	204
mTPCN1	RQTSH.....VRVTRALRCIFLVDCRYCGGVRRNLROIFQSLPFPMDIL	237
araTPCN1	YLSPLAFDFLFPRIAPYVRVLIIFILS..IRELRDTLVLLSGMLGTYLNIL	220
<hr/>		
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> I S5 pore loop 1 </div>		
mTPCN2	LLLAIHLCIFTIIGMLLFTIGEKEAQDQERLAYFRNLPEALTSLLVLLT	254
mTPCN1	LLLLFFMIIEFALGFYLFSTNPSD.....PYFSTLENSIVNLFVLLT	279
araTPCN1	ALWMLFLLFASWIAFVMFEDTQQG.....LTVETSYGATLYQMFILFT	263
<hr/>		
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> * I S6 </div>		
mTPCN2	TSNNPDVMI PAYTONRAFALFFIVETLIGSLFLMNLITAIYNOFRGYLM	304
mTPCN1	TANFPDVMMPYSYRNPNWSCVFFIVYLSIELYFIMNLLLAVVFDIEFNDIEK	329
araTPCN1	TSNNPDVMI PAYKSSRWSSVFFVLYVLIGVYFVTNLILAVVYDSEKEQLA	313
<hr/>		
mTPCN2	KSLQTSLSFRRLGARAAEVLASRAGPAGTTPELVGVNPEFTFLPVLQKTQ	354
mTPCN1	HKFKSLLHKKRTAIQHAYGLLASORRPAGISYRQFEG...LMRFYKPR	374
araTPCN1	KQVSGMDQMKRMLKAFGLIDSPKNGE..IDKNQCIKLFEQLTNYRTLEK	362
<hr/>		
EF-Hand 1		
mTPCN2	LNKTHKQATMQRVQSYEGRPMLADEFOKLFDEVDKGLAKERPLKPYQSP	404
mTPCN1	MSARERFLTEKALNQSNTPLLSLKDFYDIYEVAALQWKAKR.NRQHWFEDE	423
araTPCN1	ISKTEFGLIEDELDDTRDFKINKDEFADLCOAIALRFOKEE..VESLFEH	410
<hr/>		
EF-Hand 2		

		II S1	
mTPCN2	FLOTAQFIIFS ^h HHYFDYLG ^h N.LVALGNLLSICV...FLVLDSDLLPG.ERD		449
mTPCN1	LPRTAFLIFKGINILVNSK.AFCQYFMYLVVAVNGVWILVETFMKGGNFT		472
araTPCN1	FPOIYHSALSQQLRAFVVRSPNEGYAISEFILIINFIAVVVETILLDIESSA		460
		II S2 II S3	
mTPCN2	DFVLGILDYIFILYILLELLFKVVFALGLPGYLSYHSNVFDGLLTIILLVS		499
mTPCN1	SKHVPWSYLVFLTIYGVLELFMKVAGLGPVEYLSGGWNLFD.....FSVT		516
araTPCN1	QKPWQVAEEFVFGWIYVLEMALKIYTYGFENYWREGANRED.....FLVT		504
		II S4	
mTPCN2	EICTLAVYRILPHSGWKPEQYGPLSLWDMTRLMNTLIVFRFLRITIPNIKPM		549
mTPCN1	AFAFLGLLALTLN.....MEPFYFIVVLRPLQLLRLEFKLKRY		554
araTPCN1	WVIVIGETATFITP...DENTFFSNGEWIRYLLLRMLRLIRLLMIVORY		551
		II S5	
mTPCN2	AEVANTILGLIPNLRAFGGILVVAYYVFAMIGINLFRGVIVP.PGNSSLV		598
mTPCN1	RNVLDIMFELLPRMASLGLTLLTFYYSFAIVGMEFFNGRLTPNCCNTSTV		604
araTPCN1	RAFIATFITLIPSLMPYLGTFICVLCIYCSIGVQVFGGLVNA..GNKKLF		599
		pore loop 2 *	
mTPCN2	PDNNSAVCG.....SFEQLGYWPNNFDDFAAALITLWNVMVNNWQVIL		642
mTPCN1	ADAYRFINHTVGNKTKVEEGYYYLNNFDNIINSFVTLFELTVVNNWYIIM		654
araTPCN1	ET.....ELAEDDYLLFNENDYPNGMVTLFNLLVMGNWQVVM		636
		II S6	
mTPCN2	EAYKRYAG.PWSMVYFVLWLLVSSVIWINLFLALLLENFLHRWDPQGHKQ		691
mTPCN1	EGVTSQTS.HWSRLYFMTFYIVTMVMT.IIVAFILLEAFVFRMYSRKSQ		702
araTPCN1	ESYKDLTGFWWSITYFVSEFYVITILLLLNLVVAFLVLEAFFTELDLEEEK		686
mTPCN2	LLVGTKQMSVELMFR.....DILEEPKEEE.....LMEK ^h LH		722
mTPCN1	DSEVD ^h SGIVIEKEMSKHEELMAVLELYREERGTS ^h SDVTRLLDTLSQMEKYQ		752
araTPCN1	CQGQDSQEK ^h RNRRS.....AGSKSRSQR.....VDTLLH		716
mTPCN2	KHPHLHL ^h CR.....		731
mTPCN1	QNSMVF ^h LGRRSRTKSDLSLKMYQEEIQEWYEEHAREQEQQKLRGSVPGPA		802
araTPCN1	HMLGDEL ^h SKPECSTSDT.....		733
mTPCN2		731
mTPCN1	AQQPPGSRQRSQTVT		817
araTPCN1		733

Die Umrahmungen zeigen Sequenzabschnitte mit mindestens 50% Übereinstimmung, die waagerechten Linien kennzeichnen die Transmembransegmente und die gepunkteten Linien markieren die *Pore Loops*. Sequenzmotive für N-Glycosylierungen sind dunkelgrau und putative ER-Rückhaltesignale in der TPCN2-Sequenz sind hellgrau hervorgehoben.

6.6 Sequenz des TPCN2-Targetingvektors

BssH II **Not I** **→ Start der TK-Kassette**
 1 **CGCGCGCGCGCGCGG**TCTAGAATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCT
 61 GGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCT
 121 CGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTC
 181 GCGCCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCGCCCCGAGCTCGCGTCG
 241 TGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACC
 301 GCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTC
 361 GCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTC
 421 AGGGGCGGGGCGGGCGCCGAAGGTCTCCGGAGGCCCCGGCATTCTGCACGCTTCAAAG
 481 CGCAGCTCTGCCGCGCTGTCTCCTCTTCCATCTCCGGGCCCTTTCGACCAGGCTGCGC
 541 GTTCTCGCGCCATAGCAACCGAGCTACGGCGTTGCGCCCTCGCCGGCAGCAAGAAGCCA
 601 CGGAAGTCCGCCCCGAGCAGAAAAATGCCACGCTACTGCGGGTTTATATAGACGGTCCCC
 661 ACGGGATGGGGAAAACCACCACCACGCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTCGCGCGACGATA
 721 TCGTCTACGTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGTGTGGGGGCTTCCGAGACAATCG
 781 CGAACATCTACACCACACAACACCGCCTCGACCAGGGTGAGATATCGGCCGGGGACGCGG
 841 CGGTGGTAATGACAAGCGCCAGATAACAATGGGCATGCCTTATGCCGTGACCGACGCCG
 901 TTCTGGCTCCTCATATCGGGGGGAGGCTGGGAGCTCACATGCCCCGCCCGGGCCCTCA
 961 CCCTCATCTTCGACCGCCATCCCATCGCCGCCCTCCTGTGCTACCCGGCCGCGCGGTACC
 1021 TTATGGGCAGCATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTTCGTGGCCCTCATCCCGCCGACCT
 1081 TGCCCCGCACCAACATCGTGCTTGGGGCCCTTCCGGAGGACAGACACATCGACCGCCTGG
 1141 CCAAACGCCAGCGCCCCGGCGAGCGGCTGGACCTGGCTATGCTGGCTGCGATTCCGCCGG
 1201 TTTACGGGCTACTTGGCAATACGGTGCGGTATCTGCAAGTGCAGGCGGGTTCGTGGCGGGAGG
 1261 ACTGGGGACAGCTTTCGGGGACGGCCGTGCCGCCCCAGGGTGCCGAGCCCCAGAGCAACG
 1321 CGGGCCCACGACCCCATATCGGGGACACGTTATTTACCCGTTTTCGGGGCCCCGAGTTGC
 1381 TGGCCCCAACGGCGACCTGTATAACGTGTTTGCCTGGGCCCTTGGACGCTTTGGCCAAAC
 1441 GCCTCCGTTCCATGCACGTCTTTATCTTGATTACGACCAATCGCCCGCCGGCTGCCGGG
 1501 ACGCCCTGTGCAACTTACCTCCGGGATGGTCCAGACCACGTACCACCCCCGGCTCCA
 1561 TACCGACGATATGCGACCTGGCGCGCAGTTTGCCCGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAA
 1621 ACACGGAAGGATAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAAT
 1681 AAAACGCACGGGTGTTGGGTGCTTTGTTTCATAAAACGCGGGTTTCGGTCCCAGGGCTGGCA
 1741 CTCTGTGATACCCCCACCGAGACCCCATTTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTTCTTCTTTTC
 1801 CCCACCCACCCCCCAAGTTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTGGGGGCGGC
 1861 AGGCCCTGCCATAGCCACTGGCCCCGTGGGTTAGGGACGGGGTCCCCCATGGGGAATGGT
 1921 TTATGGTTTCGTGGGGTTATTATTTTGGGCGTTGCGTGGGGTCAGGTCCACGACCCAAGC

 1981 TCTAGAAGTAGTGATCATCGAATTCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGA**SCGG**

Hind III **→ Start der 5'-Homologie, Fragment 1**
 2041 **CCGCAAGCTT**CATCCACTGTGACAGCTCTGACCACAATGCCATGCTTCCTCAAAGCACT
 2101 CAGAACCTTGGGAGGTAGTAATGGGCAGAGAGGCAGGAACAGGTTGGTTTGGCCTTCACA
 2161 GATCTGCTAGGGTATGCTGGGAAGGTGGGTGCACTGGTGGGAATTGAATAGAGGGTCTAA
 2221 CAGTAGTGCAGGGGACTTAGTGGAACCCAGAAGGGTGATGGGAAGTAACACTTGGGGCCC
 2281 TAGAGAAGCTGCAGAGCTGGCTTGTCTCTTATCACCAGCCTGTAGCCTCCCCTAGACCCGACTG
 2341 CAGCCAGTGTATAGCTCTCTCTTATCACCAGCCTGTAGCCTCCCCTAGACCCGACTG
 2401 GGAGCTGCTGGGGATGCATGGGTGGTGGGACCCAGCAGAGGCTGACGGGAGATGGAGGCA
 2461 TCGTTCCATGCTGTTTGTATGCTTTATCTCCTATGTCCACTCAGGACAGTGTAAAGTGCA
 2521 CCTCTCGTGAAGGTGCAGCTCCTCTCTGATTGAGGAAGAAGTGCCCATGCCTTCTCTGG
 2581 AAGAGGAAGAGAATGGTTGTATAGCCATCATTTCTTACTCATGCTTCCTAAGGGTCTCTC
 2641 GGCTGGCCACCAACCATACTGCACCAAGGATGCTTGTGTAGTGCCAGGGAGACAGACAA
 2701 GGGAAAGAGGCTCTCAAGATGCACAAAACAGAGTCTATCCAGTGAATGAGTCACAGCCAC
 2761 AGAGCAGTCTGCTGTCTAACTAGTTTTTATAACATCCCCTTATAGCCCCGTGCTGTCCCT
 2821 GTGCCCTTGTAGCTGGCTAGGTTTGTTCATGGTGACCAAGACCTTTACCCCTAGATGTGGG
 2881 TCCTCTGCCTGGTTTTGGTTTTGTTTTGTTGTTGTTATTTGTTGTTTGTCTTTGCTTTTT
 2941 TTTTTGTTTGTGTTTTTTTTTGTGTTGTTTTTCAAGACCGGGTTTTCTCTATAGCC
 3001 CTGGCTGTCTGGAACCTCATTTTGTAGACCAGGCTGGCCTTGAACCTCAGAAATCCGCCCTG
 3061 CCTCTCTTTGCTTTTTTAAATACAAGAATGTTGTGTCATCCCTTGCCAGGGCCTATGGGT

3121 CTTGTGCACACTGGTACATGTTCTACAGCTGAGTCACTCTTCACAGCCGGAGTCTTCCC
 3181 TAGAGGTCCCTTAGTGCCCTGTCTTCTGAACTTGGGTATTCTCCCTTTAGACAAG
 3241 TTTGGATCCCACCTGGTGGGGCCAGTGTGTGCTTGGTGGCCCTGCCTTTGGAAATGG
 3301 ATACTTCAGACTAATAGAGCCTAGCATGTGGGAACAGTAAAAAAGTGAGACCCTTCCTG
 3361 CAGGCCTCAGATCTGACGGCCTCCCTACATGAAGGTTCCCTCTGCCTTCTGAGGTGGTGGG
 3421 AATTGCTACTGAGTCAATTTCCAAGTTCAGGGCAGTGGTGCCTGACGAGACACTGTGGA
 3481 CAGCAGGATGGAACATGGCTACGTGGAGAGGACACGGTGTGTTTTGTCACCAGGGGTGAT
 3541 GTAGGGCCTTGTGCTGGGCTCTGATTCTGCATGGTGAATGTGTGCTTGGCCCCAGTTAGA
 3601 GCCTTTACTCCTGTCTTGGTGGCCATGTGCTGTGTAGCTGAGGTCAGAGGCTCAGCATTT
 3661 GTAGGACCCACTGAGTTGATATGCTGATTAACACTTCTGGGCCCAAGCATTTCTGTGCC
 3721 TGTTTTGGAGGGCCTGTCCATGTACGTTCCAAAATCCCTTGTTCCTCAATCCTCCACATC
 3781 TCTGCATAACACTTTCTGCTCTCAGGAATCAGGTCCAGTTAGCAGGACCCCTGCCTGCCA
 3841 CCTCTCTCTGAGGGACTTTTTTACCTAAGGATGTCATGCCACAAGAAGTCTATCTCTGAT
 3901 TAGGTTGCTATGTCACCCAGAACCCTCTGCAGCTAGCAGGACCCTCTGAAGCACTCCACA
 3961 GGTGCTAGGTGTCTTGTATGGGGAAGACCAGACTCCTGGGGTGCAGCTTTGGTTCCCTATCC
 4021 AGTGAAGTCCCTCCTGACGGAGTGACACGGGGTCTGCCAGGCCCTGGTGTCTGTGACACCT
 4081 CCCCACCCCTGCCTGGGTGCTTACCTCCACTCTGAGATTTGGGCTGTGATTCTCAATGTG
 4141 GTATGTGGACAGCCTTGGAGATAGTCACATGGATGTACCTTCTCTCATCCTTAGTCTGTG
 4201 CACTGATAGGCCCAAGCAGCCAGCAGGACTATAAGTAGTTGTTATGTCCCTGTGTGTCAG
 4261 GCAGGAAGTGGTCCAGGCTCCTGGAGGGATAATGACTGTCAGGAGGGCTAGGGAACCTTG
 4321 GGATTCTGGGCTGCTACTGTGGGTGGTATATGGTGTCTGGGGAGCTGAGGGCACTGATC
 4381 TCTCAGTCATGAGAGCCAGGCAGGGCATCTGGAGTTGGGCCAGAGCCCTGAGCACTTTTC
 4441 TGATTGATGCCATTCCCTGTGCTTCAATCTGTTTCTGGCTGTTCTGGGGTCTTCTG
 4501 TATGAGCAGCCTAGGAGGACCAACAAACCCCTCAGAAGGGTCCCTTAGGAGCCTGTGAT
 4561 GTGTTGGTGTGGTATGCCCTTACACCAGGTGCTAGAAAAGAGGCTTCCAATAGATAATAT
 4621 CAATCTGACAGGTGCTATGATGGACAGGAAGCCAGGACAGTGAGTAGTGATTAGGGAGGC
 4681 ATTAGGCCAAGGTACGAGAAAAGCCGTGAGCTGTCAACAGTGTAACCCCTGGGCTCAGGA
 4741 TGGCTGGAGTGGTGGACAGGGACTACTTCTTCTCCAGGTTCTGGAATCCCTGGAAGAAA
 4801 GATATGAATGGTCCCTGGCCAGTGCACAGTTTCTATTTGTTGTCTTTAGCCCCTGCGGAT
 4861 GCGCCGGCTGCTCCGCCCTTCTTCTGCTGCAGAAATCCTCCATGATGAAGAAGACCCT
 4921 GAAGTGTATACGGTGGTCTGCTACCAGAAAATGGCCAGGTGAGCACGGGGCCTGGAAGCTGC
 4981 AAGCCAGGCCAGTCCAGAGGATGGTATGGTTGGGGCAGCTGAAAAAGTAGCTTTTATTC
 5041 ACTTGATGTAATTGTGATGTCAGAGGCTTACCGCTGAATAAGCTCATACTTTCTAGTTCT
 5101 TTCTGAACTCAAGCTGGTTCAACTCAGCTGTTCTGATTCAAACCTTCTCCAAGCTGACT
 5161 GATTCAAACCTTGCTTCTCTCAGCTTCTCACTGAATAACATTGCTTGGCTTCAAACCTA
 5221 CTGGTAATTTGTTCTAATCTTCTGGCTCCTTATTAATCTGGCTTCAAATGGCCCCGTGAT
 5281 CTGCACTGAATGGCATGAACTCACAAAGGAACTCAGCTCCACCGCATGGCACTGCACCTGC
 5341 ACTGCCCTGACCCCACTGACTGAGTGTGCTCAGCTCCAATGCACCTGCACCTGCACCTGCC
 5401 CCCCAGCTGACTGAGTGTGCTCAGCTCCACTGCACCTGCACCTGCACCTGCCCCCCAGCTGAC
 5461 TGAGTGTGCTCAGCTCCACTGCATTGCACCTGCACCTGCATCCCCAGCTGACTGAGTGTGCTC
 5521 AGCTCCACTGTACTGCACCTGCACCTGCATCCCCAGCTGACTGAGTGTGCTCAGCTCCACTAC
 5581 ACTGCACCTCACTGCACCTGACTGACTTATTCTCTCCCTGATCCACCTTTAACCCGCCTCT
 5641 CCTGTGTCTTCCCATGAGAGTTGGGCATATCCTGATTCAATCTGTCAAATCTTTCTCAGA
 5701 TTCATCACTTTATCTACCCCTTAATTAATTAGATGTCACCTTCAAACATGACTGCTTCCCT
 5761 TCTATAAACTAAGTTTACGGACATTTGTTTAGGATTAAGGTGTGTGTTAAGGGTGTGTCT
 5821 GCATTCCAGCCAGAGGACCATGTTGCTGAATTAATAATCTTCTCCAGGCAGCCCTCTGG
 5881 ATACTCCAGTCCAGCATCCTTACGGGGTTCAGCGGGCAGTGTGGGATCCTGATCAGAC
 5941 TTGTTTACAGATTACAGACTCAGACCTCCATGCCTAATCCAGATGGCTCGTTTCTGACT
 6001 TGTTTCTCCATGGTTGTCTGTACAGCTTTCAGTTTCAGTTCCCTTACACTGTGTGAAGCT

 6061 ATGCTGGCCCCGAAGCC **CTGCAG** **GGTACC** **CATATG** **ATAA**CTTCGTATAGCATAACATTATA

 Sal I Pst I → Start des zentralen Bereichs, Fragment 4
 6121 **CGAAGTTAT** **GTCGACCTGCAG**CTCTTGGAGCCTTCAACTCCCCAGATCCCTCCTAAGCCC
 6181 CCTTGGCTCCGGCCAGTGAAAATGTCACCCATGCCCTCCGTCTGCCTCCAGTCCCTTTCC
 6241 TGGTAGGCCACTTGGGTGACTTCTGCTGTCCAGCCAAAAGGATGGAAGTGACCTCTGT
 6301 CCTCTGTGTCTGGTCCATGGCATGTCCCTGGGGTGTGTCTTACCACAAATAGAGAAGT
 6361 CAGCAGGGGTAGGCGTGGCTTCAGGTCCCTGTCCCAGGGCTGAAAATCCTCAGGAGAGGA
 6421 GGGGACCCCTGTGCCATGCTTGGAGCCATGGGCAGGATGATGTCCACCTCTCTGGGGT

Exon 7

6481 TGGCCTGTGCTGTGTTGTGCTAAGCACTGTCTTTCCGCAGTGCCTGGGCTGCTGGCCAA
6541 TCCACCTGTGTCTCTTCACCATCATTTGGGATGCTGCTGTTTACCATTTGGTGGAGAAGGTAA
6601 GTGTGACCTTGGCTGGAGGTGGGGCTCACAGGCCTGCCTGCTCTCAAGTAGCCCGAGTAG
6661 CCACCTGTAACAGACCAGGAAGTGTGTGTCATGACCCCGCTTAAGCCCAGGGCCTGTCTTCC
6721 CATTGCTGGCGCCTTTGTCCACCCTGTTTTCTGAGCTGGCTGCCTCCTCCATGCAGGAGG
6781 GTTCCTTCACTGACGGTGGCTTGAAGGTTCCCTCAGCCAGGGCTGCCCTCCTGGCGCTTGT
6841 TCCAAGCCCCAGCAATCCTTGCTGAATTCCTGGCCGCTGACTCTGGCTGAAACCCTAGA
6901 ACTTATCGCCATGGGGAGGTGTCCACCTGCCATCTGTGGGGACATCTTCCTTGATTGTC
6961 CCTCTTTAGGTTCTGTCTCTCCTCACGTTTAAGGGCTATGTCCAGGCCAGGTCACCTGTCC
7021 TCCAGCCTGGGCCATCCTCTATCTCTGCATCTGCTGTGGGGTACAGCAAGTGTGGTCATG
7081 GCTGGGTTTTCTGAGAGTGAGGTGACATAATCAAGCTGTGCTGCCAGGATGGGGGAAGAA
7141 AAGATAGATAGTCTCAGTGTCTGTATGTGAGTATACATGTCTATGCATTAGTCTGTGTCT
7201 GGATGTGTCTCCATGTATATGTATGAGTGTTTTTGTGTCTCTCTCTATATATCTGAGTGT
7261 GTCTGTCTGTGTGCATGTCTTGGATATGCCTTGATGTCTGTAGATGGGTATATCTCTGTG
7321 TGCATGTCTGGATGTGTCTCCATGTCTGTCTGTCTTTATTTCCATGTCTTTGTGTGGT
7381 GTCTCTATGTTTGTGTTTATAGGTGTCTCCATGATGTATCCACTGAGTATTTGGGTCTAT
7441 GTATGCATATCTGTAGGGGGGTAGGGGCAGTGGTTGAACCGCTTGCCACACCCTTGAGAC
7501 CTCGGTGTGACTTCCCATGACCATGGCACTGCTCTTCTCAGAACCCTGGGTTAAGCAGGC
7561 AGAGTGGAGCCAGCAGTGGCCATAGCCTCAGCCTCAAGATGAGTGTGTGGATCTCACA

Pst I Erste FRT-Sequenz

7621 GTTGTGCTATATCCAGAGCTACTGGAAAGTTCCCTCCTGCAGGAAGTTCCCTATTCCTAGA
Xba I

→ Start der Neomycin-Resistenzkassette

7681 AAGTATAGGAACTTCTTAATTAAGTTTTTCGAGGGCCCCGTCAGGTC AATTCTACCGGGTA
7741 GGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACT
7801 TGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAA
7861 CCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCTTCGCGCCACCTTCTACTCCTCCCTAGTCAGGAAG
7921 TTCCCCCCCCGCCCCGAGCTCGCGTGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTC
7981 ACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGC
8041 AGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGGTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGG
8101 TCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCGAAGTCTCCGGA
8161 GGCCCCGCATTTCTGCACGCTTCAAAAAGCGCACGCTTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCCCTCA
8221 TCTCCGGGCTTTTCGACCTGCAGCCAATATGGGATCGGCCAATTGAACAAGATGGATTGCA
8281 CGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGAC
8341 AATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTT
8401 TGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATC
8461 TGCTGGCCAGCAGCGGGCGTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACCTGAAGCGGG
8521 AAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGGCGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACTTGC
8581 TCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCC
8641 GGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGAT
8701 GGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGC
8761 CGAACTGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGATGATCTCGTGTGACCCA
8821 TGGCGATGCCTGCTTGC CGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGA
8881 CTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATAT
8941 TGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGC
9001 TCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGGGGATCG
9061 ATCCGCTGTAAGTCTGCAGAAAATTGATGATCTATTAACAATAAAGATGTCCACTAAAAT
9121 GGAAGTTTTTCTGTGTCATACTTTGTTAAGAAGGGTGAGAACAGAGTACCTACATTTTGAA
9181 TGGAAGGATTGGAGCTACGGGGGTGGGGGTGGGGATTAGATAAATGCCTGCTCTTT
9241 ACTGAAGGCTCTTTACTATTGCTTTATGATAATGTTTCATAGTTGGATATCATAATTTAA
9301 ACAAGCAAAACCAATTAAGGGCCAGCTCATTCCTCCCACCTCATGATCTATAGATCTATA
9361 GATCTCTCGTGGGATCATTGTTTTTCTTGTGATCCCACCTTGTGGTTCTAAGTAAACGA

Ende der Neo. ← Zweite FRT-Sequenz Nde I Xho I

9421 AGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCCTAGAAAGTATAGGAACTTCATATGCTCGAGAT
Xba I

Zweite LoxP-Sequenz Xba I → Start der 3'-Homologie

9481 AACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATCTAGAACTAGGTTTCTGCCCTTTGAAG

9541 GGGAAACCAGGCTGAGCAGGATGAGGCTTGTGTAATTGAGGGCGACATTCGCCACGATCT
9601 TGACAAGGTCTCATCGCCTGACCTCTGTCATCATTTGGGAGGCTGTGAGGACTGACCCATG
9661 CTGAGTTCCTTGTTCATTTCCAACCTTGCCACCCTGGCCTGGGGAAACAGGTTGAGAGCCT
9721 GTTGCATGTCCAGGCCAGCTTGGGGTCTCCAGACTTGTGCCCTCTGAGGACGCAGCACC
9781 CCACCTTGTCTGAGCCCCCTTCTGTAGGTGTTGCCTATAGCTAGCCTGCTTGCTATCCGCA
9841 TCCTGCTCACCACATTGGAGCTGGAGTTTGGCATGTGATTACACAGTGCCTTCATTCCCAT
9901 CTCACAGACTGTGTCATCAGGGCTGTGACGATGTGTTGACAGTGGGCTGGGTGGGAACCC
9961 AGGGCTCCCTCTGCTGCCACAGGCTCATGGCTCAGAAAGAGCCACACAGCCTGTGGAAGC
10021 AGTAGAATTTTTTTTTTAGGGTGTGCAAGAGACCTGCTGGGAGATGGGTGAGGCCTGGG
10081 GCTCCTGCTTTGGAGGCCTCTCATCGCCCTTAAGCCTCAGTGTCCCTTGTCTGTAAACTGA
10141 GGCAGGTGCATGCAGTCTGCTTTCTGTGTGTCAGTGTCTGCTGTTTACATTGCTGTCCAC
10201 ATTCTGGCTGGGTAGGCACAGGGTGGCTCCAGGGATAACACTGAGTTCAGGATTCCTGGAG
10261 CTGAGGTTTTCTTTGGGCAGATGCACTGCCCAAGTTTGTAAAGCACCATGTCAGGACTCT
10321 GCAGGAAGGTGAGAGGGTGGGAGCCAGGCATGGCTACCCTGCTGTCTGCTATGGTAAGG
10381 CACAGCTGTGTGGATAAAGCCTCTGAGTTCAGAGGGCCTCTGCTTCAGGAGCAGTGGGT
10441 CTCTCCCAGGAGTCCCATCCCACATCACTAGAAATACCCAGTGTGGCAGCCTTCTTGAGG
10501 CCATACTTTCCAGTCTGGGTCTTTGCCCTGCCCTGCCCCCTGGCTCTTCCTCACTGTGCAC
10561 ACAATGTCTGACAAGTGCCAGCCAAGGAGTCTGGCTGGTCCCTCCTATGGTTGCTTGGCT
10621 GCCAGGCTGCTGTGCTCCGCTAGGCTGGCTCAGGGTTTTACTGGGTCTGAATAGGCCAT
10681 TATGGTGGTAAGCCTGCTTAGATGCCTGCAGGCCAGAGTCCAGCCTGTCTAGTGGTGA
10741 GTACAGCAGAGCCTGCTGGGAAGTAATAGACAGATAGAGGGTGTGACCCACCCCTTGC
10801 TCTGTGGATGGTCCCTGGCTGAGGGACTGAATGGAGCTGCATTATATTAAGACCTCAGCTG
10861 GGAGACATAAGTCCAGATGGCTACCTCACTGCTCTCAGGATGAAGCAGCAGGACCAGGAG
10921 AGGCTGGCCTACTTCCGGAACCTCCAGAAGCACTGACCTCACTCCTAGTGTCTGCTGACG
10981 ACTTCCAACAACCCTGATGGTGCCTGTGGGGCTGGGAGGGGCAGGGAACCTGGCCTGGG
11041 ATGGCCGGTGGGGAGGCTGAGTGTGGTGTGGCTTGGAGTGTGTGAGCCCTTTTTCATTAGT
11101 ATGGGGATATGATACTAGCTTCCCACTCCATGCCTTTCCCTCACCCTTTGGCAGTTTTG
11161 GTCCCTTCCAGTCCCTTCTTTCTTTCTTCATTCCTTTATCATGTCACCTTTTTCTTTGG
11221 AGAACTGAAAGTGTCTGGTAGTTTTGTGGTGTGATGTGATGTTAGTCAGCAGTTCCTATGGT
11281 GACCTCTTTGGGGCTTAGCTACACTCCCGCTCACTGCCTGGGCCTGCTGTGAGGTGCTCG
11341 CCATTCAGGAGCATCAAGTGTGAGAGCTTCTGGTCTTAGCAGGCCATGGTTGGGTGCTA
11401 CCAGGTCCCTCCCAACTCTTCTCACATGGGCCGTGCCAGGATGGCAAGCCTACAGTCCCTC
11461 TGAGCTCTGCTGTGGCCAGCCACTGTGGCTATGCCATTTACCCTGGTCTTAGGTCTTCT
11521 CACAACCTTGGTGACCTATCTCTAGGGCAGCTTGGGATTTCCCAACCCAGAAGTGTGTTT
11581 AGCCTTACCCCGAGCCAGCCACTGTAGGAGAGCTGTGTGGCTTTGGGGCGTGGTCACAGG
11641 GAGGCCACCAGGGAAGGTATCCCAGGCAGTACTGTAAGGGTTTGAGGTTGGACTTTGAA
11701 CAGGAAGTTCTCAGTTGCTCTGTGAGGTCTGGTGGAGGGGGTCAGAATGGAACCGGGGT
11761 CAGCGGCTGCAGCGTATGTTAATCTCAGATTCTTTCTTTGTCTCAGTGATGATCCCTGC
11821 GTATACTCAGAACCGGGCCTTTGCTCTTCTTTCATAGTCTTACCTTGATAGGTAAGTG
11881 CCTGTGGGATTGTGTGCCACTGGGCAGCGCTCACCCATGCATGACAGGATCCCCATGTTT
11941 AGGAGTGGCTGGCTGTAGTCTGGTCCCTGCTTTCTAACTCTCCTAGGCTTGCTCTGTAAAC
12001 TTTGCCTCAGTCTACTCTCACCCCTGGAATTTCCCTTCCCAACTCCCTTTAACTGGACCT
12061 TGGCCTGTTCTCATCTTCTAGCTTTCTCTCATCCCCCAGACCTTTACCTTCACCTGACCT
12121 CTCAGAGAGTATATCCCCATCCTGTAATTTACCTCAGCCCGTCTTCTGTAGCTTCACC
12181 TCAGCATGCTCCCAACTTAGGGCTTCATCTCAGGTTGAACACCTATGACTTCATCTCAGT
12241 GTGCTCCCCACCCAGCTTCATCTTAGCATGCCCTCCCCACTCTCCCTTGGTGACATGT
12301 GACCTTGTATGGCCCTGTCTGATCTATCAGTGGCTAGGTATGCTTGACCTCACCCACCT
12361 CACCCCGTTGATGGACAAGGATGCAGGAGTCTGGAGGTTGGGTGTGTCCCCTGCTGTGAG
12421 GCAGAAGGGAACCTCTGTGAACTTGAAGTGTGGTCACTATCCCGTGTCTTAGCATTGTA
12481 CCCAGGCTTGTGAGACCTTTGAGCCTGGGGACAGTGTGGTCCCTGGCTGCTTCAGGCT
12541 CTGCTCCACTGTCTCTGGTCACTTCTATTGTTTTGTTTTTTGTTTTGTTTTCTTTTACAG
12601 GAAGCTTGTCTGATGAACTGCTGACAGCCATCATCTATAATCAGTTCCTGGCTACC
12661 TAATGGTGGACCCCTGTGTCACTGTGGGGCTATGCCAGAGCTAGCCTCAGAGGCCAGG
12721 CAAAGTAGGCCTTGTGACTACTGACCTGGTGGGAGGGGAAGCCAGTTGCCATCTTCTGT
12781 GGACCAGTTCAGAAACACTGTCTCTGCTATGGGCTGTTTCAGTAGCACAGGTGTTGCCAT
12841 GGTTACCCAGGGTTTTCTTCCCTGCCCTTCCATACCCAAGAGGAAAAACCTAGAGACCG
12901 CAACTTCTGGGGTGTCTGTTATACCTCCTAAATACACAGAGAGGAAATGTAGACCTTAGA

```

12961 GCAGTTGTTCTTAAACCTATGGGTACGACCCCTTGGGGGTGATGAACGACCTTTTTTGAAG
13021 GGAGTGCATATCAGTTATCCTGCATATCATATATTTACATTTAAAGTTCCCTAATGAAAGTA
13081 ATTTTATGGTTGGGGTCATCACAACATGAGAACTGTATTTAAAGGGCCACTGGGCTTCC
                                     Ende der 3'-Homologie ← Asc I BssH II → pBluescript
13141 TCCTTTGAGAACTGTCCCCTCTAGTGGTGTGACTGTCGGCGCGCGCGCGCTTTGGCGTAA
13201 TCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATA
13261 CGAGCCGGAAGCATAAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTA
13321 ATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAA
13381 TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCG
13441 CTCCTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAG
13501 GCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA
13561 GGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
13621 CGCCCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACA
13681 GGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCG
13741 ACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCT
13801 CATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGT
13861 GTGCACGAACCCCCCGTTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAG
13921 TCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
13981 AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACACGGCTAC
14041 ACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA
14101 GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTTGC
14161 AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG
14221 GGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTAAATG
14281 AAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCAAAGT
14341 ATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCA
14401 GCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACG
14461 ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCA
14521 CCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT
14581 CCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGT
14641 AGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCA
14701 CGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA
14761 TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGTCCTCCGATCGTTGTCAGA
14821 AGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACT
14881 GTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTTCTGA
14941 GAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCG
15001 CCACATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTCATTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTC
15061 TCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGA
15121 TCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAT
15181 GCCGCAAAAAGGGAAATAAGGGCGACACGGAAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTT
15241 CAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGT
15301 ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGGAAAAAGTCCACCTAAA
15361 TTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTT
15421 TTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAG
15481 GGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACG
15541 TCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAAT
15601 CAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAAATCGGAACCCATAAGGGAGCCCC
15661 GATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGA
15721 AAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGGTAACCACCACAC
15781 CCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACT
15841 GTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGAT
15901 GTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAATA
15961 CGACGGCCAGTGA

```

Folgende Sequenzabschnitte sind farbig gekennzeichnet: LoxP-Sequenzen (hellblau), FRT-Sequenzen (grün), Exon Nr. 7 (grau), Restriktionsschnittstellen für Southern-Blot Analysen (orange), sonstige relevante Restriktionsschnittstellen (gelb).

7 Literatur

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. **2000**, *The versatility and universality of calcium signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol.* *1*, 11-21.
- Biel M, Schneider A, Wahl C. **2002**, *Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation*. *Trends Cardiovasc Med.* *12*, 206-212.
- Bollag RJ, Waldman AS, Liskay RM. **1989**, *Homologous recombination in mammalian cells*. *Annu Rev Genet.* *23*, 199-225.
- Burgoyne RD, Weiss JL. **2001**, *The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins*. *Biochem J.* *353*, 1-12.
- Caramelo JJ, Parodi AJ. **2007**, *How sugars convey information on protein conformation in the endoplasmic reticulum*. *Semin Cell Dev Biol.* *18*, 732-742.
- Catterall WA. **2000**, *From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels*. *Neuron.* *26*, 13-25.
- Churchill GC, Okada Y, Thomas JM, Genazzani AA, Patel S, Galione A. **2002**, *NAADP mobilizes Ca(2+) from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs*. *Cell.* *111*, 703-708.
- Clapham DE. **2003**, *TRP channels as cellular sensors*. *Nature.* *426*, 517-524.
- Clapham DE, Garbers DL. **2005** *International Union of Pharmacology. Nomenclature and structure-function relationships of CatSper and two-pore channels*. *Pharmacol Rev.* *57*, 451-454.
- Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. **2001**, *The TRP ion channel family*. *Nat Rev Neurosci.* *2*, 387-396.
- Craven KB, Zagotta WN. **2006**, *CNG and HCN channels: two peas, one pod*. *Annu Rev Physiol.* *68*, 375-401.
- Davuluri RV., Grosse I., Zhang MQ. **2001**, *Computational identification of promoters and first exons in the human genome*, *Nature Genetics.* *29*, 412-417.
- Di Palma F, Belyantseva IA, Kim HJ, Vogt TF, 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*, 14994-14999.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. **1998**, *The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity*. *Science.* *280*, 69-77.
- Dreses-Werringloer U, Lambert JC, Vingtdeux V, Zhao H, Vais H, Siebert A, Jain A, Koppel J, Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Pasquier F, Galimberti D, Scarpini E, Mann D, Lendon C, Campion D, Amouyel P, Davies P, Foskett JK, Campagne F, Marambaud P. **2008**, *A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Aβ levels, and Alzheimer's disease risk*, *Cell.* *133*, 1149-1161.
- Eggermann E, Bayer L, Serafin M, Saint-Mleux B, Bernheim L, Machard D, Jones BE, Mühlethaler M. **2003**, *The wake-promoting hypocretin-orexin neurons are in an intrinsic state of membrane depolarization*. *J Neurosci.* *23*, 1557-1562.

- Endo M. **2006**, *Calcium ion as a second messenger with special reference to excitation-contraction coupling*. J Pharmacol Sci. 100, 519-524.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. **1987**, *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A. 84, 7413-7417.
- Fliegert R, Gasser A, Guse AH. **2007**, *Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers*. Biochem Soc Trans. 35, 109-114.
- Frengen E, Zhao B, Howe S, Weichenhan D, Osoegawa K, Gjernes E, Jessee J, Prydz H, Huxley C, de Jong PJ. **2000**, *Modular bacterial artificial chromosome vectors for transfer of large inserts into mammalian cells*. Genomics. 68, 118-126.
- Furuichi T, Cunningham KW, Muto S. **2001**, *A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca(2+) flux in Arabidopsis leaf cells*. Plant Cell Physiol 4, 900-905.
- Galione A. **2006**, *NAADP, a new intracellular messenger that mobilizes Ca²⁺ from acidic stores*. Biochem Soc Trans. 34, 922-926.
- Galione A, Petersen OH. **2005**, *The NAADP Receptor: New Receptors or New Regulation?* Mol. Interv. 5, 73-79.
- Genazzani AA, Galione A. **1996**, *Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate mobilizes Ca²⁺ from a thapsigargin-insensitive pool*. Biochem J. 315, 721-725.
- Gluzman Y. **1981**, *SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants*. Cell 23, 175-182.
- Goldin AL. **2001**, *Resurgence of sodium channel research*. Annu Rev Physiol. 63, 871-894.
- Goldin AL. **2002**, *Evolution of voltage-gated Na(+) channels*. J Exp Biol. 205, 575-584.
- Goldstein SA, Price LA, Rosenthal DN, Pausch MH. **1996**, *ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from Drosophila melanogaster by expression in Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 13256-13261.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. **1977**, *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol. 36, 59-74.
- Graham FL, van der Eb AJ. **1973**, *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. Virology. 52, 456-467.
- Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. **1994**, *Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting*. Science. 265, 103-106.
- Guse AH. **2004**, *Regulation of calcium signaling by the second messenger cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR)*. Curr Mol Med. 4, 239-248.
- Hashimoto K, Saito M, Matsuoka H, Iida K, Iida H. **2004**, *Functional analysis of a rice putative voltage-dependent Ca²⁺ channel, OsTPC1, expressed in yeast cells lacking its homologous gene CCH1*. Plant Cell Physiol. 45, 496-500.

- Heinemann SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S. **1992**, *Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations*. *Nature*. 356, 441-443.
- Helenius A, Aebi M. **2004**, *Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum*. *Annu Rev Biochem*. 73, 1019-1049.
- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. **1994** *Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity*. *Annu Rev Neurosci*. 17, 399-418.
- Howlett AR. (Ed.) **1999**, *Integrin Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Humana Press, Totowa. 129, Kap. 11, 153-187.
- Imai M, Taniguchi J, Tabei K. **1987**, *Function of thin loops of Henle*. *Kidney Int*. 31, 565-579.
- Ishibashi K, Suzuki M, Imai M. **2000** *Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channels*. *Biochem Biophys Res Commun*. 270, 370-376.
- Ishiura M, Hirose S, Uchida T, Hamada Y, Suzuki Y, Okada Y. **1982**, *Phage particle-mediated gene transfer to cultured mammalian cells*. *Mol Cell Biol*. 2, 607-616.
- Jamison RL. **1987**, *Short and long loop nephrons*. *Kidney Int*. 31, 597-605.
- Jan LY, Jan YN. **1997**, *Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes*. *Annu Rev Neurosci*. 20, 91-123.
- Jarvik JW, Telmer CA. **1998**, *Epitope tagging*. *Annu Rev Genet*. 32, 601-618.
- Jarvis SE, Zamponi GW. **2007**, *Trafficking and regulation of neuronal voltage-gated calcium channels*. *Curr Opin Cell Biol*. 19, 474-482.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. **2002**, *The open pore conformation of potassium channels*. *Nature*. 417, 523-526.
- Jospin M, Watanabe S, Joshi D, Young S, Hamming K, Thacker C, Snutch TP, Jorgensen EM, Schuske K. **2007**, *UNC-80 and the NCA ion channels contribute to endocytosis defects in synaptojanin mutants*. *Curr Biol*. 17, 1595-1600.
- Kadota Y, Furuichi T, Ogasawara Y, Goh T, Higashi K, Muto S, Kuchitsu K. **2004**, *Identification of putative voltage-dependent Ca²⁺-permeable channels involved in cryptogeiin-induced Ca²⁺ transients and defense responses in tobacco BY-2 cells*. *Biochem Biophys Res Commun*. 317, 823-830.
- Kawano T, Kadono T, Fumoto K, Lapeyrie F, Kuse M, Isobe M, Furuichi T, Muto S. **2004**, *Aluminum as a specific inhibitor of plant TPC1 Ca²⁺ channels*. *Biochem Biophys Res Commun*. 324, 40-45.
- Kozak M. **1991** *Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation*. *J Biol Chem*. 266, 19867-19870.
- Krishnan KS, Nash HA. **1990**, *A genetic study of the anesthetic response: mutants of Drosophila melanogaster altered in sensitivity to halothane*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87, 8632-8636.

- Kurusu T, Sakurai Y, Miyao A, Hirochika H, Kuchitsu K. **2004**, *Identification of a putative voltage-gated Ca²⁺-permeable channel (OsTPC1) involved in Ca²⁺ influx and regulation of growth and development in rice*. *Plant Cell Physiol.* 45, 693-702.
- Lear BC, Lin JM, Keath JR, McGill JJ, Raman IM, Allada R. **2005**, *The ion channel narrow abdomen is critical for neural output of the Drosophila circadian pacemaker*. *Neuron.* 48, 965-976.
- Lee HC, Aarhus R. **2000**, *Functional visualization of the separate but interacting calcium stores sensitive to NAADP and cyclic ADP-ribose*. *J Cell Sci.* 113, 4413-4420.
- Lee HC. **2004**, *Multiplicity of Ca²⁺ messengers and Ca²⁺ stores: a perspective from cyclic ADP-ribose and NAADP*. *Curr Mol Med.* 4, 227-237.
- Lee JH, Cribbs LL, Perez-Reyes E. **1999**, *Cloning of a novel four repeat protein related to voltage-gated sodium and calcium channels*. *FEBS Lett.* 445, 231-236.
- Lee JY., Yeh I., Yeon J., Tian B. **2007**, *PolyA_DB 2: mRNA polyadenylation sites in vertebrate genes*, *Nucleic Acids Res.* 35, 165-168.
- Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. **1996**, *TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure*. *EMBO J.* 15, 1004-1011.
- Lin C, Yu Y, Kadono T, Iwata M, Umemura K, Furuichi T, Kuse M, Isobe M, Yamamoto Y, Matsumoto H, Yoshizuka K, Kawano T. **2005**, *Action of aluminum, novel TPC1-type channel inhibitor, against salicylate-induced and cold-shock-induced calcium influx in tobacco BY-2 cells*. *Biochem Biophys Res Commun.* 332, 823-830.
- Lomsadze A, Ter-Hovhannisyan V, Chernoff Y, Borodovsky M. **2005**, *Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm*, *Nucleic Acids Res.* 33, 6494-6506.
- Lu B, Su Y, Das S, Liu J, Xia J, Ren D. **2007** *The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm*. *Cell.* 129, 371-383.
- Lu B, Su Y, Das S, Wang H, Wang Y, Liu J, Ren D. **2008**, *Peptide neurotransmitters activate a cation channel complex of NALCN and UNC-80*. *Nature.* Dec 17. [Epub ahead of print].
- Minor DL Jr. **2001**, *Potassium channels: life in the post-structural world*. *Curr Opin Struct Biol.* 11, 408-414.
- Mir B, Iyer S, Ramaswami M, Krishnan KS. **1997**, *A genetic and mosaic analysis of a locus involved in the anesthesia response of Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 147, 701-712.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. **2002**, *The TRP channels, a remarkably functional family*. *Cell.* 108, 595-598.
- Nash HA, Scott RL, Lear BC, Allada R. **2002**, *An unusual cation channel mediates photic control of locomotion in Drosophila*. *Curr Biol.* 12, 2152-2158.

- Nilius B, Voets T. **2005**, *TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels*. Pflugers Arch. 451, 1-10.
- Orban PC, Chui D, Marth JD. **1992**, *Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A. 89, 6861-6865.
- Osoegawa K, de Jong PJ, Frengen E, Ioannou PA. **2001**, *Construction of bacterial artificial chromosome (BAC/PAC) libraries*. Curr Protoc Mol Biol. Chapter 5:Unit 5.9.
- Osoegawa K, Tateno M, Woon PY, Frengen E, Mammoser AG, Catanese JJ, Hayashizaki Y, de Jong PJ. **2000**, *Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis*. Genome Res. 10, 116-128.
- Pantoja O, Gelli A, Blumwald E. **1992**, *Voltage-Dependent Calcium Channels in Plant Vacuoles*. Science. 255, 1567-1570.
- Paran N., Ori A., Haviv I., Shaul Y. **2000**, *A composite polyadenylation signal with TATA box function*, Mol Cell Biol. 20, 834-841.
- Peiter E, Maathuis FJ, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D. **2005** *The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement*. Nature 434, 404-408.
- Pottosin II, Schönknecht G. **2007**, *Vacuolar calcium channels*. J Exp Bot. 58, 1559-1569.
- Putnam NH, Srivastava M, Hellsten U, Dirks B, Chapman J, Salamov A, Terry A, Shapiro H, Lindquist E, Kapitonov VV, Jurka J, Genikhovich G, Grigoriev IV, Lucas SM, Steele RE, Finnerty JR, Technau U, Martindale MQ, Rokhsar DS. **2007**, *Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization*. Science. 317, 86-94.
- Rajewsky K, Gu H, Kühn R, Betz UA, Müller W, Roes J, Schwenk F. **1996**, *Conditional gene targeting*. J Clin Invest. 98, 600-603.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. **2006**, *An introduction to TRP channels*. Annu Rev Physiol. 68, 619-647.
- Ramsey IS, Moran MM, Chong JA, Clapham DE. **2006**, *A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain*. Nature. 440, 1213-1216.
- Ranf S, Wünnenberg P, Lee J, Becker D, Dunkel M, Hedrich R, Scheel D, Dietrich P. **2008**, *Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca²⁺ signals induced by abiotic and biotic stresses*. Plant J. 52, 287-299.
- Ren Z, Riley NJ, Garcia EP, Sanders JM, Swanson GT, Marshall J. **2003**, *Multiple trafficking signals regulate kainate receptor KA2 subunit surface expression*. J Neurosci. 23, 6608-6616.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE. **2001**, *A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility*. Nature. 413, 603-609.
- Robinson RB, Siegelbaum SA. **2003**, *Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function*. Annu Rev Physiol. 65, 453-480.

- Salamov A., Solovyev V. **2000**, *Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA*. Genome Res. *10*, 516-522.
- Sambrook J, Russell D. **2001**, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3 Lab edition.
- Sands Z, Grottesi A, Sansom MS. **2005**, *Voltage-gated ion channels*. Curr Biol. *15*, R44-47.
- Sands ZA, Grottesi A, Sansom MS. **2006**, *The intrinsic flexibility of the Kv voltage sensor and its implications for channel gating*. Biophys J. *90*, 1598-1606.
- Sasaki M, Takagi M, Okamura Y. **2006**, *A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel*. Science. *312*, 589-592.
- Sather WA, McCleskey EW. **2003**, *Permeation and selectivity in calcium channels*. Annu Rev Physiol. *65*, 133-159.
- Schulz I, Krause E. **2004**, *Inositol 1,4,5-trisphosphate and its co-players in the concert of Ca²⁺ signalling - new faces in the line up*. Curr Mol Med. *4*, 313-322.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. **1985**, *Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination*. Nature. *317*, 230-234.
- Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Jakobsdottir M, Steinberg S, Gudjonsson SA, Palsson A, Thorleifsson G, Pálsson S, Sigurgeirsson B, Thorisdottir K, Ragnarsson R, Benediksdottir KR, Aben KK, Vermeulen SH, Goldstein AM, Tucker MA, Kiemenev LA, Olafsson JH, Gulcher J, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. **2008**, *Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans*. Nat Genet. *40*, 835-837.
- Sun YM, Favre I, Schild L, Moczydlowski E. **1997**, *On the structural basis for size-selective permeation of organic cations through the voltage-gated sodium channel. Effect of alanine mutations at the DEKA locus on selectivity, inhibition by Ca²⁺ and H⁺, and molecular sieving*. J Gen Physiol. *110*, 693-715.
- Sun M, Goldin E, Stahl S, Falardeau JL, Kennedy JC, Acierno JS Jr, Bove C, Kaneski CR, Nagle J, Bromley MC, Colman M, Schiffmann R, Slaugenhaupt SA. **2000**, *Mucopolidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel*. Hum Mol Genet. *9*, 2471-2478.
- Swartz KJ. **2008**, *Sensing voltage across lipid membranes*. Nature. *456*, 891-897.
- Talavera K, Nilius B, Voets T. **2008**, *Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers*. Trends Neurosci. *31*, 287-295.
- Tang S, Mikala G, Bahinski A, Yatani A, Varadi G, Schwartz A. **1993**, *Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel*. J Biol Chem. *268*, 13026-13029.
- Thomas KR, Capecchi MR. **1987**, *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells*. Cell. *51*, 503-512.
- Tian B., Hu J., Zhang H., Lutz CS. **2005**, *A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes*, Nucleic Acids Res. *33*, 201-212.

- Verkhatsky A. **2005**, *Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons*. *Physiol Rev.* 85, 201-279.
- Wahl-Schott C, Baumann L, Cuny H, Eckert C, Griessmeier K, Biel M. **2006**, *Switching off calcium-dependent inactivation in L-type calcium channels by an autoinhibitory domain*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 15657-15662.
- Wahl-Schott C, Biel M. **2008**, *HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function*. *Cell Mol Life Sci.* Oct 27. [Epub ahead of print].
- Xu Y., Uberbacher, E. C. **1997**, *Automated gene identification in large-scale genomic sequences*, *J Comput Biol.* 4, 325-338.
- Yeh E, Ng S, Zhang M, Bouhours M, Wang Y, Wang M, Hung W, Aoyagi K, Melnik-Martinez K, Li M, Liu F, Schafer WR, Zhen M. **2008**, *A putative cation channel, NCA-1, and a novel protein, UNC-80, transmit neuronal activity in C. elegans*. *PLoS Biol.* 6, 552-567.
- Yu FH, Catterall, WA. **2004**, *The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis*, *Sci STKE* 253, re15.
- Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA. **2005**, *Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily*. *Pharmacol Rev.* 57, 387-395.
- Zagotta WN, Siegelbaum SA. **1996**, *Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels*. *Annu Rev Neurosci.* 19, 235-263.
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY. **1999**, *A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels*. *Neuron.* 22, 537-548.
- Zhang MQ. **2002**, *Computational prediction of eukaryotic protein-coding genes*, *Nat Rev Genet.* 3, 698-709.
- Zhang F, Jin S, Yi F, Li PL. **2008**, *TRP-ML1 Functions as a Lysosomal NAADP-Sensitive Ca(2+) Release Channel in Coronary Arterial Myocytes*. *J Cell Mol Med.* Aug 27. [Epub ahead of print].
- Zhang AY, Li PL. **2006**, *Vascular physiology of a Ca²⁺ mobilizing second messenger - cyclic ADP-ribose*. *J Cell Mol Med.* 10, 407-422.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Hartmut Cuny
Geburtstag	31. August 1979
Geburtsort	Darmstadt
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung:

1986 – 1990	Grundschule, Seeheim-Jugenheim
1990 – 1999	Gymnasium, Seeheim-Jugenheim
Juni 1999	Abschluss Abitur

Studium:

1999 – 2001	Grundstudium Biologie, Technische Universität Darmstadt
September 2001	Diplom-Biologen-Vorprüfung
2001 – 2004	Hauptstudium Biologie, Technische Universität Darmstadt
November 2003	Diplom-Biologen-Hauptprüfung
Dez. 2003 – Aug. 2004	Diplomarbeit

Wissenschaftliche Tätigkeit:

Feb. 2005 – Dez. 2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand Ludwig Maximilians Universität, München Department Pharmazie Lehrstuhl Pharmakologie für Naturwissenschaften Prof. Dr. Martin Biel
-----------------------	---

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Biel für die herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung des interessanten Forschungsthemas und für die allzeit freundliche Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Christian Wahl-Schott für die exzellente Betreuung und die vielen anregenden Diskussionen während meiner Arbeit sowie für die Übernahme des Koreferats.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. Markus Moser für die sachkundige Unterstützung beim Gantargeting und die wertvollen Ratschläge, Herrn Dr. Sven Moosmang für seine fundierte Hilfe bei den *in situ* Hybridisierungen, Herrn Prof. Dr. Marc Freichel für die Bereitstellung seiner Vektoren mit den Sequenzen der Neomycinresistenz- und TK-Kassette, Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer für die große Hilfsbereitschaft bei der Antiseren-Aufreinigung und Herrn Dr. Dirk Becker und seinen Mitarbeitern für die Expressionsstudien an Pflanzenzellen.

Katrin Rötzer und Melanie Gebhard danke ich für die tatkräftige und zuverlässige Unterstützung bei der Laborarbeit.

Ich danke außerdem Christian Gruner für den Einsatz und die Hilfe bei der Gewinnung der Stammzellklone, Kristina Gießmeier für die Bereitstellung ihrer HEK-Zellen und Michael Schieder für die gute Zusammenarbeit während der Endphase meiner Arbeit.

Für das gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Christian Wahl-Schott, bei Hana Rauschenbach und bei meinem Vater Dr. Eckehard Cuny.

Schließlich danke ich allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für die sehr angenehme, freundliche Atmosphäre bei der wissenschaftlichen Arbeit, aber auch für all das, was über den Laboralltag hinausging, wie z. B. das nette Beisammensein bei Grillfesten und gemeinsamen Abenden.