

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



**Analyse der Regulation des Ca_v1.2-L-Typ-
Kalziumkanals durch Proteinkinasen in vitro und in
transgenen Mäusen**

**Toni Lemke
aus Rüsselsheim**

2007

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn PD Dr. Sven Moosmang betreut und von Herrn Prof. Dr. Martin Biel vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 26.10.2007



Toni Lemke

Dissertation eingereicht am	26.10.2007
1. Gutachter	Herr PD Dr. Sven Moosmang
2. Gutachter	Herr Prof. Dr. Martin Biel
Mündliche Prüfung am	20.12.2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
1.1	Spannungsaktivierte Kalziumkanäle.....	9
1.2	Regulation des kardialen L-Typ-Kalziumkanals.....	13
1.2.1	Regulation durch Proteinkinase A.....	13
1.2.2	Regulation durch Proteinkinase C.....	15
1.2.3	Kalziumabhängige Inaktivierung und Fazilitierung.....	16
1.3	Zielsetzung.....	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Molekularbiologische Methoden.....	18
2.1.1	Verwendete Plasmide.....	18
2.1.2	Kultivierung von E.coli.....	18
2.1.3	Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	20
2.1.4	Transformation von E.coli.....	20
2.1.5	Alkalische Lyse (Minipräp bzw. Maxipräp).....	21
2.1.6	DNS-Fällung.....	22
2.1.7	Restriktionsverdau.....	22
2.1.8	Dephosphorylierung.....	23
2.1.9	Ligation.....	23
2.1.10	Elektrophoretische Auftrennung von DNS.....	23
2.1.11	Elektroelution.....	24
2.1.12	DNS-Isolierung aus Mausgewebe.....	24
2.1.13	Quantitative DNS-Bestimmung.....	25
2.1.14	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	25
2.1.15	Sequenzierung von DNS.....	25
2.1.16	Cre-vermittelte Rekombination.....	26
2.1.17	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
2.1.17.1	Verwendete Polymerasen.....	26
2.1.17.2	Herstellung von Oligonukleotid-Primern.....	29
2.1.17.3	Overlap-PCR.....	29
2.1.18	Southern-Blot.....	30
2.1.18.1	Lösungen.....	30
2.1.18.2	Gellauf.....	31
2.1.18.3	Blotting.....	31
2.1.18.4	Herstellung einer ³² P-markierten Sonde.....	32
2.1.18.5	Hybridisierung.....	32
2.2	Proteinanalyse.....	33
2.2.1	Proteingewinnung aus Gewebe.....	33
2.2.2	Quantitative Proteinbestimmung.....	33
2.2.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE.....	34
2.2.4	Western-Blot.....	35
2.2.5	Membranpräparation.....	36
2.2.6	Co-Immunpräzipitation.....	37
2.2.7	GST-Fusionsproteine.....	37
2.2.8	Phosphorylierungen.....	38
2.2.8.1	Phosphorylierung mit PKA.....	38
2.2.8.2	Phosphorylierung mit PKC.....	39
2.3	Erzeugung genetisch veränderter Mäuse.....	40
2.3.1	Kultivierung embryonaler Stammzellen.....	40
	Nährmedien und Zusätze.....	41

2.3.1.1	Präparation von Feederzellen	42
2.3.1.2	Ernten, Bestrahlen und Einfrieren von Feederzellen	42
2.3.1.3	Auftauen von Feederzellen.....	43
2.3.1.4	Auftauen und Aussäen von ES-Zellen.....	43
2.3.1.5	Splitten von ES-Zellkulturen	43
2.3.1.6	Anlegen von Gefrierkulturen.....	44
2.3.2	Primäres Zell-Targeting	44
2.3.2.1	Vorbereitung des Targeting-Vektors.....	44
2.3.2.2	Elektroporation	45
2.3.2.3	Positivselektion mit G418	45
2.3.2.4	Isolierung von Zellklonen.....	45
2.3.2.5	Einfrieren und Splitten der isolierten Zellklone	46
2.3.2.6	Screening	46
2.3.3	Sekundäres Zell-Targeting	47
2.3.3.1	Auftauen und Kultivierung positiver ES-Zellklone	47
2.3.3.2	Vorbereitung des pIC-Cre Plasmids	47
2.3.3.3	Elektroporation	47
2.3.3.4	Negativselektion mit Ganciclovir.....	47
2.3.4	Blastozysten-Injektion.....	48
2.3.4.1	Vorbereitung der ES-Zellen	48
2.3.4.2	Blastozysten-Gewinnung.....	48
2.3.4.3	Leihmütter	48
2.3.4.4	Injektion	48
2.3.4.5	Implantation der injizierten Blastozysten in Leihmütter.....	49
2.3.5	Testen von Chimären auf Keimbahngängigkeit.....	50
2.3.5.1	Haltung und Zucht der Mäuse	50
2.4	Untersuchung genetisch veränderter Mäuse	51
2.4.1	Myozytenpräparation	51
2.4.2	Elektrophysiologie	51
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Phosphorylierungen.....	53
3.1.1	GST-Fusionsproteine Ca _v 1.2.....	53
3.1.1.1	PKA	54
3.1.1.2	PKC α	54
3.1.1.3	PKC ϵ	55
3.1.1.4	PKC ζ	55
3.1.2	GST-Fusionsproteine Ca _v β _{2a}	56
3.1.3	Co-Immunpräzipitation	57
3.2	Spezifischer Antikörper pS1928.....	58
3.3	Generierung von Mäusen mit einer Ca _v 1.2-S1928A-Mutation.....	58
3.3.1	Strategie des Gen-Targetings.....	59
3.3.2	Intronanalyse	59
3.3.3	Konstruktion des Targeting-Vektors	60
3.3.4	Funktionsüberprüfung der loxP-Sequenzen	61
3.3.5	Primäres ES-Zell-Targeting	62
3.3.6	Screening	63
3.3.6.1	5'-Sonde	63
3.3.6.2	Neo-Sonde	64
3.3.6.3	PCR.....	65
3.3.6.4	Sequenzierung	65

3.3.7	Sekundäres ES-Zell-Targeting	66
3.3.8	Screening mit PCR	67
3.3.9	Blastozysten-Injektion.....	68
3.4	Untersuchung der Mäuse	69
3.4.1	Genotypisierung	69
3.4.2	Geburtsstatistik.....	70
3.4.3	Proteinanalyse.....	70
3.4.3.1	Herz.....	71
3.4.3.2	Hirn.....	71
3.4.4	Phosphorylierung.....	72
3.4.5	Elektrophysiologie	73
4	Diskussion	76
4.1	Phosphorylierungsexperimente	76
4.2	Vektorkonstruktion und Targeting für die Ca _v 1.2 S1928A-Mauslinie	78
4.3	Untersuchung der S1928A-Mäuse.....	79
4.4	Ausblick	81
5	Zusammenfassung	82
6	Anhang	84
6.1	Verwendete Oligonukleotid-Primer	84
6.2	Verwendete Restriktionsenzyme	86
6.3	Verwendete Antikörper	87
6.4	Sequenzabweichung CACNA1C zwischen Exon 45 und 46.....	87
7	Literaturverzeichnis.....	88
	Danksagung.....	94
	Lebenslauf	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Kalziumkanals.....	10
Abbildung 1-2 Phylogenetischer Stammbaum der spannungsaktivierten Kalziumkanäle	11
Abbildung 1-3 Schematische Darstellung des β -AR-cAMP-PKA Signalwegs	13
Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der PKC-Aktivierung	15
Abbildung 2-1 Aufbau eines Southern-Blots	31
Abbildung 2-2 Injektion von ES-Zellen in eine Blastozyste	49
Abbildung 3-1 Schema GST-Fusionsproteine.....	53
Abbildung 3-2 Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen mit PKAc.....	54
Abbildung 3-3 Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen mit PKC α	55
Abbildung 3-4 Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen mit PKC ϵ	55
Abbildung 3-5 Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen mit PKC ζ	56
Abbildung 3-6 Phosphorylierung der GST β_{2a} -Untereinheit mit PKAc.....	57
Abbildung 3-7 Phosphorylierung eines Ca $_v$ 1.2-Co-Immunpräzipitats mit PKAc.....	57
Abbildung 3-8 Antikörper pS1928	58
Abbildung 3-9 Strategie des Gen-Targetings	59
Abbildung 3-10 Fertiger Targeting-Vektor.....	61
Abbildung 3-11 PCR-Strategie zur Funktionsüberprüfung der Cre-vermittelten Rekombination.....	62
Abbildung 3-12 5'-Southern Strategie.....	64
Abbildung 3-13 Neo-Southern Strategie	65
Abbildung 3-14 PCR-Screening Strategie.....	65
Abbildung 3-15 Strategie zur Trennung von Wildtyp- und mutiertem Allel	66
Abbildung 3-16 Positive Klone des sekundären Targetings.....	67
Abbildung 3-17 Wurf der CD1-Ammenmutter mit Chimäre L5594	68
Abbildung 3-18 Charakterisierung der S1928A-Mäuse.....	70
Abbildung 3-19 Proteinanalyse Herzgewebe S1928A-Mäuse.....	71
Abbildung 3-20 Proteinanalyse Hirngewebe S1928A-Mäuse.....	72
Abbildung 3-21 Analyse S1928A-Mäuse mit anti-pS1928.....	72
Abbildung 3-22 Phosphorylierung S1928A-Mäuse	73
Abbildung 3-23 Elektrophysiologische Untersuchungen an S1928A-Myozyten	75

Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin, bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cpm	Zähler pro Minute, counts per minute
d	Tag
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
ddNTP	2',3'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
HRP	Meerrettichperoxidase, horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasen
KI	knock-in
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
loxP	Erkennungssequenz der CRE-Rekombinase, locus of crossover (x) of Phage P
MCS	Multiple Klonierungsstelle, multiple cloning site
NaCl	Natriumchlorid
Na-Acetat	Natriumacetat
neo	Neomycinresistenz-Gen
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gel
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute, rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Borat-NaCl-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit, Einheit
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration sind ein wichtiger Regulationsmechanismus zellulärer Vorgänge (Berridge, 2004). Die Kalziumkonzentration im Zellinneren kann durch eine Vielzahl ineinandergreifender Mechanismen reguliert werden. Grundlegend lassen sich diese Prozesse in „An“- und „Aus“-Mechanismen unterteilen, je nachdem, ob sie die zytosolische Kalziumkonzentration erhöhen oder erniedrigen. Zu den „An“-Mechanismen zählt der Kalziumeinstrom in den Intrazellularraum durch Kanäle der Plasmamembran und des Endoplasmatischen und Sarkoplasmatischen Retikulums (ER und SR). Durch Ca^{2+} -ATPasen in der Plasmamembran, im ER und im SR kann Kalzium aus dem Zytosol der Zelle hinausbefördert werden. Ein weiterer „Aus“-Mechanismus sind Ionenaustauscher, die mit Hilfe eines Gradienten die Energie aufbringen, um Kalzium aus der Zelle zu transportieren, zum Beispiel der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Bootman et al., 2001).

1.1 Spannungsaktivierte Kalziumkanäle

Spannungsabhängige Kalziumkanäle in der Plasmamembran ermöglichen einen kontrollierten Einstrom von Kalziumionen in die Zelle und sind somit wesentlich an der Kontrolle der intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt. Zu den kalziumabhängigen Regulationsmechanismen zählen zum Beispiel die Kontraktion der Muskulatur, die Synthese und Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen, die Expression von Genen und die Regulation von Enzymaktivitäten. Die spannungsabhängigen Kalziumkanäle lassen sich unterteilen in hochspannungsaktivierte (high voltage activated, HVA) und niederspannungsaktivierte (low voltage activated, LVA) Kalziumkanäle. Obwohl die Aktivität der spannungsabhängigen Kanäle hauptsächlich durch das Membranpotenzial reguliert wird, gibt es noch eine Vielzahl anderer Modulationsmechanismen, etwa durch Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, Hormone, Toxine und Pharmaka (Hofmann et al., 1999).

Spannungsaktivierte Kalziumkanäle werden durch mehrere Untereinheiten gebildet. Die porenbildende α_1 -Untereinheit ist ein Transmembranprotein, das sich aus vier homologen Domänen zusammensetzt, die wiederum aus jeweils sechs Transmembransegmenten bestehen (**Abbildung 1-1**). Positiv geladene Aminosäuren in den S4-Segmenten bilden den Spannungssensor, und auch der Selektivitätsfilter wird durch ein bestimmtes Aminosäuremuster in der α_1 -Untereinheit bestimmt. Wei-

tere Untereinheiten sind die intrazelluläre β -Untereinheit und die extrazelluläre α_2 -Untereinheit, die über Disulfidbrücken mit der δ -Untereinheit verbunden ist. Die aus vier Transmembransegmenten bestehende γ -Untereinheit wurde nur in einigen Geweben mit dem Kalziumkanal assoziiert gefunden. Diese Hilfsuntereinheiten können die Öffnungseigenschaften und Expression des Kalziumkanals beeinflussen (Bers, 2002; Bodi et al., 2005; Kamp and Hell, 2000).

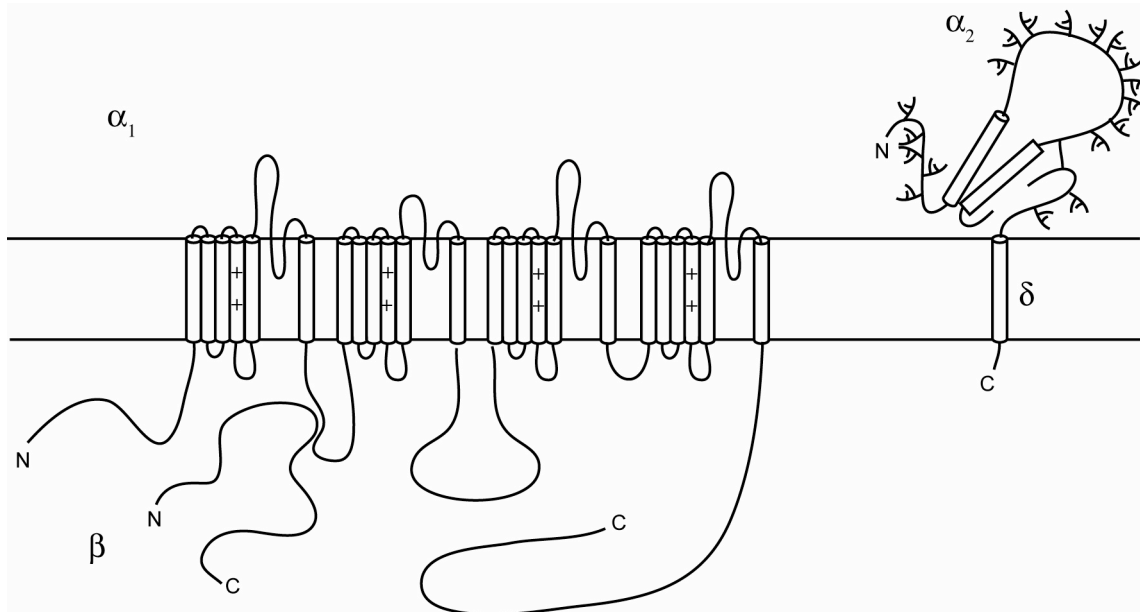


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Kalziumkanals mit den beteiligten Untereinheiten α_1 , β und $\alpha_2\delta$

Die Unterteilung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle geschieht über die verschiedenen α_1 -Untereinheiten in drei strukturell und funktionell ähnliche Gruppen Ca_v1, Ca_v2 und Ca_v3 (Ertel et al., 2000). **Abbildung 1-2** kann entnommen werden, wie hoch die Sequenzhomologie der einzelnen Untereinheiten ist und zu welcher Gruppe sie dementsprechend gezählt werden.

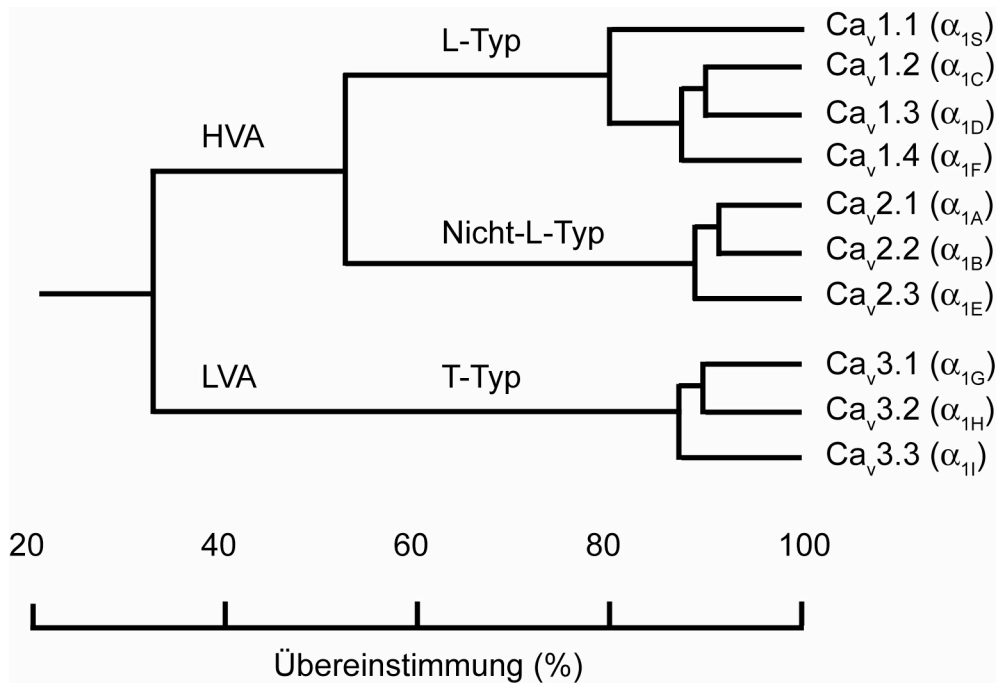


Abbildung 1-2 Phylogenetischer Stammbaum der spannungsaktivierten Kalziumkanäle

Die LVA-Kalziumkanäle lassen sich sowohl strukturell als auch in ihren elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften klar von den HVA-Kalziumkanälen abgrenzen (Hofmann et al., 1999; Moosmang et al., 2005; Yaari et al., 1987). LVA-Kanäle werden wegen ihrer transienten Kinetik auch als T-Typ-Kalziumkanäle bezeichnet. Sie öffnen bei viel negativeren Membranpotenzialen als die HVA-Kanäle und inaktivieren sehr schnell wieder. Die HVA-Kanäle lassen sich in L-Typ-Kanäle („long lasting“) und Nicht-L-Typ-Kanäle unterteilen (Hofmann et al., 1999; Nowycky et al., 1985; Perez-Reyes, 2003; Striessnig, 1999). **Tabelle 1-A** gibt einen Überblick über die Einteilung und das Vorkommen der verschiedenen spannungsabhängigen Kalziumkanäle.

Tabelle 1-A Klassifizierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle. DHP: Dihydropyridine; PAA: Phenylalkylamine; BTZ: Benzothiazepine

Bezeichnungen				Gewebeverteilung	Blocker	Literaturangabe
HVA	Ca _v 1.1	α _{1S}	L-Typ	Skelettmuskel	DHP PAA BTZ	(Tanabe et al., 1987)
	Ca _v 1.2	α _{1C}	L-Typ	Herz, glatter Muskel, Hirn, Pankreas		(Biel et al., 1990; Mikami et al., 1989; Snutch et al., 1991)
	Ca _v 1.3	α _{1D}	L-Typ	Hirn, Pancreas, Niere, Ovar, Cochlea		(Seino et al., 1992)
	Ca _v 1.4	α _{1F}	L-Typ	Retina	D-cis-Diltiazem, DHP	(Strom et al., 1998)
HVA	Ca _v 2.1	α _{1A}	P/Q-Typ	Hirn, Cochlea, Glandula pituitaria	ω-Agatoxin	(Mori et al., 1991; Starr et al., 1991)
	Ca _v 2.2	α _{1B}	N-Typ	Hirn, peripheres Nervensystem	ω-Conotoxin	(Dubel et al., 1992; Williams et al., 1992)
	Ca _v 2.3	α _{1E}	R-Typ	Hirn, Cochlea, Retina, Herz, Glandula pituitaria	SNX-482	(Niidome et al., 1992)
LVA	Ca _v 3.1	α _{1G}	T-Typ	Hirn, Herz, peripheres Nervensystem	Mibefradil	(Perez-Reyes, 1998)
	Ca _v 3.2	α _{1H}	T-Typ	Hirn, Herz		(Cribbs et al., 1998)
	Ca _v 3.3	α _{1I}	T-Typ	Hirn		(Lee et al., 1999)

Vier der zehn bekannten spannungsabhängigen Kalziumkanäle sind L-Typ-Kalziumkanäle. L-Typ-Kalziumkanäle werden in verschiedenen Geweben exprimiert und haben somit unterschiedliche Funktionen. Allen gemein ist das recht hohe Schwellenpotenzial zwischen -50mV (z.B. Ca_v1.3) und -30mV (z.B. Ca_v1.2) und die Inhibition durch spezifische Blocker wie Dihydropyridine, Phenylalkylamine und Benzothiazepine (Catterall, 2000; van der Heyden et al., 2005). Die Inaktivierungskinetik ist ähnlich.

Die überaus bedeutende Rolle des Ca_v1.2 im kardiovaskulären System zeigte sich durch eine gendefiziente Mauslinie. Die Ausschaltung des Gens für den Ca_v1.2 (*CACNA1C*) führte zu embryonaler Letalität. Es wurden konditionale Mauslinien generiert, durch die eine zeit- und gewebeabhängige Ausschaltung des *CACNA1C*-Gens möglich wurde (Seisenberger et al., 2000). Dadurch konnten gewebe-

spezifische Phänotypen untersucht werden, etwa in glatten Muskelzellen (Moosmang et al., 2003), im Pankreas (Schulla et al., 2003) oder im zentralen Nervensystem (Moosmang et al., 2005).

1.2 Regulation des kardialen L-Typ-Kalziumkanals

L-Typ-Kalziumkanäle werden durch eine Vielzahl von Neurotransmittern, Hormonen und Zytokinen reguliert. Die Aktivierung von Kinasen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren führt zu einer Modulation der Kanalaktivität und auch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nimmt Einfluss auf den Kanal.

1.2.1 Regulation durch Proteinkinase A

Schon seit vielen Jahren ist bekannt, dass die Stimulation von β -Adrenozeptoren zu einem vermehrten Kalziumeinstrom durch kardiale L-Typ-Kalziumkanäle führt. Dieser Kalziumeinstrom führt zu einer Erhöhung der Kontraktilität, der Herzfrequenz und der Amplitude des kardialen Aktionspotentials. β -Adrenozeptoren sind G_s -Protein-gekoppelte Rezeptoren, die die Adenylatcyclase aktivieren. Im Gegensatz dazu gibt es auch G_i -Protein-gekoppelte Rezeptoren, etwa die M_2 -Rezeptoren, die die Adenylatcyclase inhibieren. Eine Stimulation der Adenylatcyclase führt zu einer intrazellulären cAMP-Erhöhung. cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA), woraufhin die katalytische Untereinheit abdissoziiert und Zielproteine phosphorylieren kann (Kamp and Hell, 2000). Der Mechanismus dieses Signalwegs kann **Abbildung 1-3** entnommen werden.

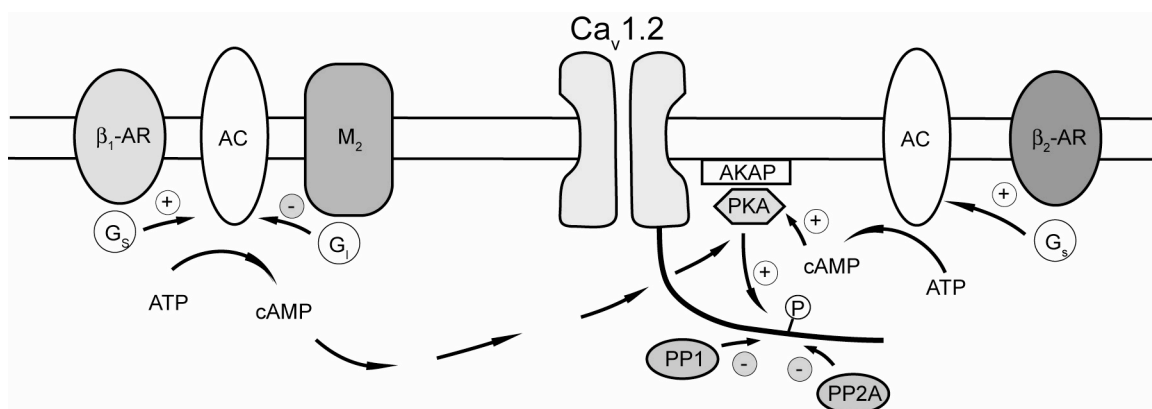


Abbildung 1-3 Schematische Darstellung des β -AR-cAMP-PKA Signalwegs. Durch β -adrenerge Stimulation wird die Adenylatcyclase (AC) aktiviert, die ATP in cAMP umwandelt. Daraufhin wird die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aktiviert. Diese phosphoryliert spezifische Erkennungssequenzen, hier den C-Terminus von $Ca_v1.2$. Durch A-Kinase-Ankerproteine (AKAP) wird die PKA an $Ca_v1.2$ gebunden. Phosphatasen (PP1, PP2A) können die Aminosäure wieder dephosphorylieren. β_1 -Adrenozeptoren führen zu einer intrazellulären cAMP-Erhöhung, wohingegen β_2 -Adrenozeptoren zu einem lokal sehr begrenztem cAMP-Anstieg führen können.

Für die PKA ist eine Konsensussequenz der Phosphorylierungsstelle bekannt (R-R/K-X-S/T), die auf viele Zielproteine der PKA zutrifft (Kennelly and Krebs, 1991). Es werden aber nicht alle Proteine, die diese Sequenz enthalten, auch wirklich von der PKA phosphoryliert. Das liegt zum Teil daran, dass die PKA erst durch sogenannte Ankerproteine (AKAPs) zu ihrem Zielprotein hingeführt wird. Durch eine Vielzahl unterschiedlicher AKAPs ist eine intrazelluläre Lokalisierung der PKA an verschiedenen Orten möglich und somit eine gezielte Antwort auf eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung (Colledge and Scott, 1999).

Werden isolierte kardiale Myozyten mit cAMP oder der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKAc) inkubiert, ergibt sich eine Beeinflussung des Kalziumstroms in ähnlicher Weise wie durch β -adrenerge Stimulation (Osterrieder et al., 1982; Trautwein et al., 1982). Die Aktivierung des β -AR-cAMP-PKA Signalwegs führt zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des $Ca_v1.2$ und so zu einer Erhöhung des kardialen L-Typ Kalziumstroms (I_{CaL}) (Catterall, 2000; Kamp and Hell, 2000; van der Heyden et al., 2005).

Bis jetzt ist bekannt, dass eine Phosphorylierung durch die PKA den I_{CaL} erhöht. Am naheliegendsten wäre die Vermutung, dass $Ca_v1.2$ direkt von der PKA phosphoryliert wird. Tatsächlich gibt es einige Konsensussequenzen für die PKA im $Ca_v1.2$. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass nur eine einzige Aminosäure im $Ca_v1.2$ (Serin 1928) von der PKA phosphoryliert wird (Davare and Hell, 2003; De Jongh et al., 1996; Hall et al., 2006). Dieses Serin 1928 befindet sich weit hinten im C-Terminus von $Ca_v1.2$. In einigen Laboren wurde eine Trunkierung des Kanals am C-Terminus festgestellt, so dass eine lange und eine kurze Form des $Ca_v1.2$ detektierbar ist, wobei nur die lange Form Serin 1928 als Phosphorylierungsstelle enthält (Catterall, 2000; De Jongh et al., 1996). Auch die β -Untereinheit des Kalziumkanals wird von der PKA phosphoryliert. Es wurden drei Serine identifiziert, die von PKA phosphoryliert werden (Gerhardstein et al., 1999).

Um den molekularen Mechanismus der PKA-induzierten Aktivierung des kardialen Kalziumkanals aufzuklären, wurden etliche elektrophysiologische Untersuchungen an mit $Ca_v1.2$ transfizierten Zellen durchgeführt, die zu teils widersprüchlichen Ergebnissen führten (Sculptoreanu et al., 1993; Zong et al., 1995). Ein großes Problem stellt die Reproduzierbarkeit der Stromerhöhung durch PKA in heterologen Expressionssystemen dar. So ist die Antwort auf β -adrenerge Stimulation durch die Co-Expression der β -Untereinheit sowie AKAP zwar vorhanden, fällt aber sehr viel

schwächer als bei nativen Kardiomyozyten aus (Gao et al., 1997). Es scheinen also noch andere, unbekannte Mechanismen eine Rolle in der Regulation von kardialen Kalziumkanälen zu spielen, die bisher nicht in heterologen Expressionssystemen reproduziert werden konnten.

Dennoch wurde mit Hilfe von Expressionssystemen versucht, die Rolle von Serin 1928 im PKA-Signalweg aufzuklären. Einerseits konnte gezeigt werden, dass die Mutation der einzigen PKA-Phosphorylierungsstelle im $Ca_v1.2$ (S1928A) sowohl die Phosphorylierung als auch die Regulation durch die PKA verhinderte (Gao et al., 1997; Gui et al., 2006; Oliveria et al., 2007). Andererseits wurde kürzlich jedoch gezeigt, dass mindestens 70% der β -adrenergen Regulation von I_{CaL} nicht über die Phosphorylierung von Serin 1928 abläuft (Ganesan et al., 2006). Diese widersprüchlichen Ergebnisse zeigen die Unzulänglichkeiten heterologer Expressionssysteme. Eine endgültige Klärung, inwieweit die Phosphorylierung von Serin 1928 zu einer Erhöhung des I_{CaL} beiträgt, lässt sich nur durch ein Mausmodell erlangen.

1.2.2 Regulation durch Proteinkinase C

Die Proteinkinase C (PKC) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die über G_q -Proteingekoppelte-Rezeptoren aktiviert wird. Der Mechanismus der Aktivierung kann **Abbildung 1-4** entnommen werden.

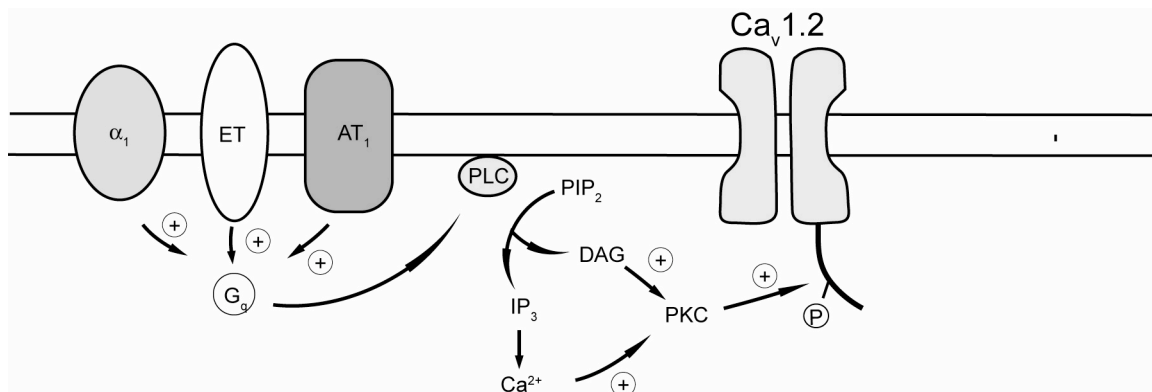


Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der PKC-Aktivierung. Durch G_q -Protein-gekoppelte Rezeptoren wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, die Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP_2) zu Diacylglycerol (DAG) sowie Inositoltriphosphat (IP_3) hydrolysiert. IP_3 führt durch Bindung an IP_3 -Rezeptoren zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung. Die PKC wird durch DAG, Ca^{2+} sowie Phosphatidylserin (PS) aktiviert und phosphoryliert den $Ca_v1.2$.

Es sind bisher 11 Isoformen der PKC bekannt, die sich in drei Gruppen einteilen lassen. Die konventionellen PKCs (cPKC), die neuen PKCs (nPKC) und die atypischen PKCs (aPKCs). Diese drei Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur und Regulierung. Die Substratproteine der PKC sind vielfältig, PKC phosphoryliert viel

weniger spezifisch als zum Beispiel die PKA. Eine große Rolle in der Regulierung der PKC-Funktion spielt höchstwahrscheinlich die intrazelluläre Verteilung von sowohl PKC als auch Substrat (Newton, 1995).

Der Einfluss der PKC auf den I_{CaL} war lange unklar. Es gab Experimente, die eine Erhöhung des Stroms zeigten und solche, die eine Erniedrigung nahe legten. Der N-Terminus des $Ca_v1.2$ scheint eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung durch die PKC zu spielen (Blumenstein et al., 2002; Shistik et al., 1999). Es wurden sowohl die α_1 - als auch die β -Untereinheit als Substratproteine der PKC identifiziert (Puri et al., 1997). Eine neuere Arbeit zeigt, dass Serin 1928 im $Ca_v1.2$ von der PKC phosphoryliert wird (Yang et al., 2005). Inwieweit diese Phosphorylierung zu einer Modulation des Kalziumstroms führt muss noch untersucht werden.

1.2.3 Kalziumabhängige Inaktivierung und Fazilitierung

Die Aktivität von L-Typ-Kalziumkanälen wird auch durch Kalzium selbst reguliert. So gibt es neben der spannungsabhängigen Inaktivierung auch einen Mechanismus der kalziumabhängigen Inaktivierung. Dafür ist das kalziumbindende Protein Calmodulin (CaM) als Sensor notwendig. Calmodulin ist gleichzeitig für die Fazilitierung des Kalziumkanals verantwortlich, wobei durch mehrere aufeinanderfolgende Depolarisierungen oder einen starken depolarisierenden Präpuls die Dauer der Kanalöffnung und die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht wird. Der genaue molekulare Mechanismus ist bisher nicht bekannt. Allerdings ist die Bindung von Calmodulin an ein IQ-Motiv im C-Terminus des $Ca_v1.2$ für diese Prozesse essenziell (Halling et al., 2005). Die Kalzium/Calmodulin abhängige Kinase II (CaMKII) scheint für die Fazilitierung eine kritische Rolle zu spielen. Es sind zwei Phosphorylierungsstellen der CaMKII im C-Terminus des $Ca_v1.2$ identifiziert worden (Lee et al., 2006).

1.3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollen die Phosphorylierungsstellen für verschiedene Kinasen im kardialen L-Typ-Kalziumkanal untersucht werden. Zur Eingrenzung bzw. Identifizierung dieser Phosphorylierungsstellen werden GST-Fusionsproteine der α_1 - und der β_{2a} -Untereinheit generiert und in Phosphorylierungsexperimenten charakterisiert.

Es soll eine Mauslinie generiert werden, in der die Phosphorylierungsstelle Serin 1928 im Carboxyterminus des $Ca_v1.2$ durch ein nicht phosphorylierbares Alanin ersetzt ist. Es gibt viele Hinweise auf eine kritische Rolle dieser Phosphorylierungsstelle in der Regulation der Kanalaktivität durch Proteinkinase A sowie Proteinkinase C. Bis jetzt konnten Experimente zur Regulation des $Ca_v1.2$ nur in heterologen Expressionssystemen durchgeführt werden, was zu unbefriedigenden und teils widersprüchlichen Ergebnissen führte. Grund dafür ist, dass nicht alle ineinandergreifenden Mechanismen bekannt sind und somit auch nicht vollständig reproduziert werden konnten. Ziel ist es deshalb, durch Gen-Targeting die S1928A-Mutation in das Mausgenom einzuführen und eine langfristige Mauslinie zu etablieren, der die entscheidende Phosphorylierungsstelle im $Ca_v1.2$ fehlt. Dadurch ist es dann möglich, Versuche in nativen, untransfizierten Zellen durchzuführen, in denen das vollständige Regulationssystem vorhanden ist.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Verwendete Plasmide

pBluescript II KS + (Stratagene)

Das pBluescript II KS Plasmid wurde zur Subklonierung und Sequenzierung von DNS-Fragmenten verwendet. Dieses Plasmid besitzt ein Ampicillinresistenzgen (Amp) und eine multiple Klonierungsstelle (MCS) mit einer großen Auswahl an Restriktionsschnittstellen. Außerdem trägt das Plasmid den *E. coli* Replikationsursprung, der für eine hohe Kopienzahl sorgt da das Plasmid autonom repliziert werden kann.

pBSloxPneotkloxP

Das Plasmid stammt vom pBluescript II KS Vektor ab und enthält in der MCS zusätzlich ein Neomycinresistenzgen (*neo*) und das Thymidinkinasegen (*tk*) aus dem Herpes simplex Virus I als Selektionskassette. Diese Selektionskassette ist umgeben von zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen um eine Entfernung der Selektionskassette durch die Cre-Rekombinase zu ermöglichen.

pGEX-6P-1 (Upstate)

Das pGEX-6P-1 Plasmid ist ein Expressionsvektor zur Erzeugung von GST-Fusionsproteinen. Die Expression erfolgt unter dem tac Promoter, der erst durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) aktiviert wird. Da das pGEX-Plasmid ein internes lacI^q-Gen trägt bindet unter Normalbedingungen ein Repressorprotein an die Operator-Region des taq-Promotors. IPTG bindet als Induktor an den Repressor und die Transkription ist nicht mehr reprimiert. Ein Ampicillinresistenzgen ist auch auf diesem Plasmid vorhanden.

2.1.2 Kultivierung von *E.coli*

Verwendet wurden die Stämme XL1-Blue (Stratagene) bzw. BL21 bei der Expression von GST-Fusionsproteinen.

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte standardmäßig in mit Glucose angereichertem Luria-Bertani-Nährmedium (LB+). Zur Selektion von mit Plasmid transformierten Bakterienkolonien wurde dem Medium Ampicillin (Endkonzentration 100µg/mL) zugegeben. Die wässrigen Ampicillin-Stocks (50mg/mL) konnten bei -20°C gelagert werden. Zur kurzfristigen Aufbewahrung und um Einzelkolonien zu erhalten wurden Bakteriensuspensionen auf Ampicillin-Agarplatten (Ampicillin-Endkonzentration 50µg/mL, Zusatz nach dem Autoklavieren bei ca 50°C) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert, Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Die Agarplatten konnten bei 4°C mehrere Wochen gelagert werden, zur längeren Erhaltung eines Bakterienklons wurden Glycerolstocks angefertigt, wobei ein Teil einer Flüssigkultur 1:1 mit sterilem Glycerol 85% gemischt und bei -80°C gelagert wurde.

Zur Resuspension frisch transformierter Zellen nach der Elektroporation wurde SOC(+)-Medium verwendet, dieses wurde aus bei -20°C gelagertem SOC(-)-Medium durch Zugabe von 50µL MgCl (1M), 50µL MgSO₄ (1M) und 100µL Glucose (20%) hergestellt.

Die Kultur von BL21 Zellen zur Expression von GST-Fusionsproteinen erfolgte in 2x YTA Medium.

LB-Medium + Glucose	
Pepton	10g
Hefeextrakt	5g
NaCl	5g
Glucose	1g
H ₂ O	ad 1000mL
pH 7,2 - 7,5	

SOC(-)	
Trypton	2g
Hefeextrakt	0,5g
NaCl 5M	0,2mL
KCl 1M	0,25mL
H ₂ O	ad 1000mL

LB Agar + Glucose	
Pepton	10g
Hefeextrakt	5g
NaCl	5g
Glucose	1g
Agar	15g
H ₂ O	ad 1000mL
pH 7,2 - 7,5	

2x YTA	
Trypton	16g
Hefeextrakt	10g
NaCl	5g
H ₂ O	ad 1000mL
pH 7,0	
Nach dem Autoklavieren: Ampicillin 50mg/mL	2mL

Alle Nährmedien wurden nach Herstellung autoklaviert.

2.1.3 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Um elektrokompetente Zellen zu erhalten ließ man eine XL1-blue Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,7 wachsen und zentrifugierte ab. Das Bakterienpellet wurde mehrfach mit Wasser und 10% Glycerol gewaschen, dann in 10% Glycerol resuspendiert und als 50 μ L-Aliquots bei -80°C gelagert.

Chemisch kompetente Zellen erhielt man, indem man eine 100mL XL1-blue Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,3 wachsen ließ. Das Zellpellet wurde in 15mL TSS resuspendiert und Aliquots à 450 μ L bei -80°C gelagert.

TSS (Transformation-Storage-Solution)	
PEG 3350 40%	50mL
MgCl ₂ 1M	10mL
DMSO	10mL
LB+	ad 200mL

2.1.4 Transformation von E.coli

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNS in Bakterienzellen. Durch Zugabe eines Antibiotikums kann man gezielt die Zellen selektionieren, bei denen durch Transformation des entsprechenden Plasmids eine Resistenz vorliegt.

Transformation in chemisch kompetente Zellen

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, zu dem DNS-Ansatz pipettiert und 30min auf Eis inkubiert. Zur Erholung der Zellen wurde der Ansatz mit 2,6mL LB+-Medium versetzt und 1h bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf A-Platten (150 μ L direkt) bzw. B-Platten (Zellen 5min bei 3500rpm abzentrifugieren und in 150 μ L LB+-Medium resuspendieren) ausplattiert und über Nacht bebrütet.

Elektroporation

Die Zellmembran von Bakterien wird durch Anlegen einer hohen Spannung für DNS durchlässig. Diese Methode ist effektiver als die Transformation von chemisch kompetenten Zellen.

Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser der Firma BioRad mit folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt: 2,5kV, 25 μ F und 200 Ω . Die elektrokompetenten Zellen wurden im Eisbad aufgetaut, auf den DNS-Ansatz gegeben und vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wurde 1min auf Eis inkubiert, in eine sterile Elektroporationsküvette überführt und der Elektroporationspuls appliziert. Nach sofortiger Zugabe von 1mL SOC(+)-Medium wurden die Zellen in einem sterilen Zentrifugenröhrchen 1h bei 37°C und 225rpm geschüttelt und anschließend auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert (A- und B-Platten).

2.1.5 Alkalische Lyse (Minipräp bzw. Maxipräp)

Zur Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterienzellen wurde das Prinzip der alkalischen Lyse angewandt. Dabei werden die Bakterien in NaOH/SDS lysiert, wobei DNS und Proteine denaturieren. RNase A verdaut freigesetzte RNS. Bei der Neutralisation mit Kaliumacetat renaturiert die kleine Plasmid-DNS wieder und geht in Lösung, wohingegen die genomische Bakterien-DNS zusammen mit Zelltrümmern, Salzen und SDS abgetrennt werden kann. Für die schnelle Analyse einzelner Zellklone nach einer Transformation wurde eine Minipräp durchgeführt, für die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab wurde das Maxi-Präparations-Kit der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers verwendet.

Minipräp

7mL LB+-Medium wurden mit 14 μ L Ampicillin (50mg/mL) versetzt und mit einem Zellklon angeimpft. Nachdem die Kultur bei 37°C und 225rpm über Nacht gewachsen war, wurde das Zellpellet bei 4°C in MP1-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von MP2-Puffer 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit MP3-Puffer 15min auf Eis stehen gelassen. Nach Zentrifugation wurde der klare Überstand in ein frisches Cap gegeben und die DNS mit Isopropanol gefällt (2.1.6).

MP1	
Tris	6,06g
EDTA*2H ₂ O	3,72g
RNase A	100mg
H ₂ O	ad 1000mL
pH 8,0	

MP2	
NaOH	8g
SDS 10%	100mL
H ₂ O	ad 1000mL

MP3	
Kaliumacetat H ₂ O pH 5,5	294,5g ad 1000mL

2.1.6 DNS-Fällung

DNS wurde zur Aufkonzentrierung oder Reinigung mit Ethanol gefällt. Dazu wurde eine wässrige DNS-Lösung mit 1/10 Volumenteilen NaCl (5M) oder Na-Acetat (3M) und 2,5 Volumenteilen konzentrierten Ethanol versetzt, 15min bei -80°C stehen gelassen und anschließend bei 15000rpm und 4°C 15min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet zweimal mit eiskaltem Ethanol 70% gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst. Alternativ ist eine Fällung mit Isopropanol möglich.

Sehr kleine Mengen DNS, zum Beispiel ein Ligationsansatz vor der Elektroporation, wurden zusammen mit 5µg tRNS durch Zugabe von 0,5 Volumenteilen Ammoniumacetat und 2 Volumenteilen konzentriertem Ethanol gefällt, 30min bei 15000rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet wie oben gewaschen und getrocknet.

2.1.7 Restriktionsverdau

Zur Überprüfung von Restriktionsschnittstellen oder um DNS-Stücke und Plasmide für eine Ligation vorzubereiten wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Verwendet wurden Restriktionsenzyme der Firma NEB in den entsprechenden mitgelieferten Puffern. Bei Mehrfachverdaus wurde ein Puffer gewählt in dem alle Enzyme eine zufriedenstellende Aktivität aufweisen (Angaben des Herstellers). Optional wurde dem Ansatz BSA in einer Endkonzentration von 100µg/mL zugegeben. Der Ansatz wurde bei der enzyspezifischen Temperatur (meist 37°C) 1-5h inkubiert.

Beispielansatz Restriktionsverdau	
DNS	2µL
10x NEB-Puffer	5µL
Enzym1	1µL
Enzym2	1µL
BSA 10x	5µL
H ₂ O	ad 50µL

2.1.8 Dephosphorylierung

Alkalische Phosphatase (AP) aus Kälberdarm spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen ab. Linearisierte Vektoren, die für eine Ligation bestimmt waren, wurden dieser Prozedur unterworfen um eine Religation zu verhindern. Dazu wurde direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau 1U AP zu dem Ansatz gegeben und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert.

2.1.9 Ligation

Ligationen wurden mit dem Quick Ligation Kit (NEB) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Quick T4 DNS Ligase katalysiert ATP-abhängig die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende. Für die Ligation wurden 50ng Vektor und ein 3-7facher molarer Überschuss an Insert-DNS eingesetzt.

2.1.10 Elektrophoretische Auftrennung von DNS

Um DNS-Fragmente der Größe nach aufzutrennen und sichtbar zu machen wurden standardmäßig Agarosegele verwendet. Je nach Größe der aufzutrennenden Stücke wurden 0,7%ige (>1000bp) bzw. 2%ige (200-1000bp) Agarosegele gegossen. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1xTBE in der Mikrowelle aufgeköcht, im Wasserbad auf ca. 60°C abgekühlt und 0,8µg/mL Ethidiumbromid (Stammlösung 10mg/mL, Quantum) zugegeben. Die DNS-Proben wurden mit Laufpuffer versetzt und zusammen mit einem Größenmarker (1kb DNA Ladder, Invitrogen) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese-Bedingungen waren 100-200mV für 30min bis mehrere Stunden, je nach Größe des Gels und der Kammer. Da Nukleinsäuren negativ geladen sind wandern sie stets zur Anode. Kleinere DNS-Fragmente können das Agarosenetz schneller durchdringen als größere, dadurch ist eine Größenauftrennung möglich. Durch Farbstoffe im Laufpuffer lässt sich der Verlauf der Elektrophorese beobachten. Die DNS-Banden konnten unter UV-Licht (302nm, BioRad Gel Doc 2000) sichtbar gemacht und fotografiert werden (Quantity One 4.1.1 Gel Doc).

Für kleinere DNS-Fragmente (<500bp) wurden 5%ige PAGE-Gele benutzt, die 15min bei 110mV, dann 45min bei 250mV laufen gelassen wurden. Die Gele wurden 20min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und zweimal 5min mit Wasser gewaschen um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen.

10x TBE	
Tris-HCl	540g
Borsäure	275g
EDTA*2H ₂ O	37,2g
H ₂ O	ad 1000mL

Auftragpuffer (6xdye)	
Ficoll Typ 400	18g
EDTA pH 8,0	0,5M
10x TBE	60mL
Bromphenolblau 50mg/mL	3mL
Xylencyanol FF 50mg/mL	3mL
H ₂ O	ad 100mL

PAGE-Gel 5%	
Rotiphorese-Gel 40, 29:1 (Acrylamid/N,N`-Bisacrylamid = 29:1, 40 %ige wässrige Lösung)	6,25mL
10xTBE	5mL
TEMED (N,N,N`,N`- Tetramethylethylendiamin)	58µL
APS	133µL
H ₂ O	ad 50mL

2.1.11 Elektroelution

Für präparative Zwecke wurden 0,7% Agarosegele verwendet, die entsprechenden Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und elektroeluiert. Dazu wurde das Gelstück in einen Dialyseschlauch gegeben, 300µL TBE-Puffer zugegeben und der Schlauch dicht mit Klammern verschlossen. Der Schlauch wurde in eine eisgekühlte Kammer mit TBE-Puffer gelegt und die DNS bei 145mA 1,5-3h lang eluiert. Danach wurde der Puffer aus dem Schlauch abpipettiert, der Schlauch mit 100µL TBE-Puffer gespült und die DNS präzipitiert (2.1.6).

Für kleinere DNS-Stücke (unter 500b) wurden präparative PAGE-Gele verwendet.

2.1.12 DNS-Isolierung aus Mausgewebe

Für Genotypisierungen oder Sequenzanalysen wurde DNS aus Maus-Zehen bzw. Mausschwänzchen isoliert. Dazu wurde das Gewebe mit 10µL 10x taq-Puffer und 1µL Proteinase K (20mg/mL) in einem 100µL-Ansatz über Nacht bei 55°C und 750rpm inkubiert. Um die Proteinase K zu inaktivieren wurde der Ansatz anschließend für 15min auf 95°C erhitzt und bei 4°C gelagert.

Für einen Southern-Blot wurde ca. 5mm Schwanzgewebe mit 500µL Lysepuffer (100mM Tris, pH 8, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl, 0,1mg/mL Proteinase K) bei 56°C und 300rpm über Nacht lysiert. Am folgenden Tag wurde abzentrifugiert

(10min bei 14000rpm) und der Überstand mit 500 μ L Isopropanol versetzt. Nach gutem Durchmischen war eine DNS-Flocke sichtbar, die mit einer angelartig zugeschmolzenen Pasteurpipette herausgefischt wurde. Die DNS wurde für 10-15sec an der Luft trocknen gelassen und anschließend in 200 μ L H₂O gelöst. Diese DNS-Lösung wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen (2.1.14), gefällt (2.1.6) und in 50 μ L H₂O gelöst.

2.1.13 Quantitative DNS-Bestimmung

Die wässrige DNS-Lösung wurde mit dem Nanodrop Spectrophotometer (peqlab) bei 260nm vermessen. Um die Reinheit der DNS-Lösung abzuschätzen kann der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt werden, er sollte über 1,8 liegen.

2.1.14 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Proteine aus einer wässrigen DNS-Lösung zu entfernen wurde die Lösung mit dem gleichen Volumenteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, Roth) versetzt, kräftig geschüttelt und bei 13000rpm 5min lang zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die DNS gefällt (2.1.6).

2.1.15 Sequenzierung von DNS

Sequenzanalysen erfolgten nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Die DNS-Fragmente wurden mit dem ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) synthetisiert und dabei durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) terminiert. Die DNS-Einsatzmengen betragen 0,5 μ g bei Plasmid-DNS aus einer Maxipräp bzw. 50-100ng bei gelgereinigten PCR-Produkten. Bei der Sequenzierung einer Minipräp wurde standardmäßig 1 μ L verwendet. Zur Analyse der Fragmente wurde der ABI Prism 310 Genetic Analyzer verwendet. Durch Kapillarelektrophorese werden die markierten DNS-Fragmente aufgetrennt und durch einen Laser detektiert.

Der Reaktionsansatz für die Synthese der Abbruchfragmente setzte sich aus 8 μ L Ready Reaction Mix, 3,2 μ L Primer (1 μ M), der entsprechenden Menge DNS-Lösung und Wasser ad 20 μ L zusammen.

Die Programmeinstellungen im Biometra T1 Thermocycler sahen folgendermaßen aus:

95°C	5min	
95°C	40s	} x35
50°C	40s	
60°C	4min	
20°C	5min	

Die Temperaturänderungen erfolgten mit einer Geschwindigkeit von 0,8°C/s.

Zur Aufreinigung des Sequenzierproduktes wurden Centri-Sep Columns (Princeton Separations) verwendet. Durch Gelfiltration werden große Moleküle (DNS-Fragmente größer als 16bp) von kleineren Fragmenten, Salzen und nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt. Dies erfolgte nach Herstellerangaben.

2.1.16 Cre-vermittelte Rekombination

Zur Überprüfung der Funktionalität der loxP-Sequenzen im Targeting-Vektor wurde die Cre-vermittelte Rekombination in vitro durchgeführt. Es wurde 1µL einer Maxipräp des Targeting-Vektors mit 1µL Cre-Rekombinase (NEB) in 5µL des dazugehörigen 10x Puffers in einem 50µL Ansatz 45min bei 37°C inkubiert. Zur Überprüfung der Rekombination wurde anschließend eine PCR durchgeführt.

2.1.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, bestimmte DNS-Fragmente aus einem Gemisch von Nukleinsäuren zu amplifizieren. Die Verwendung zweier gegenläufiger Oigonukleotid-Primer grenzt das zu amplifizierende Stück ein, eine hitzestabile Polymerase verlängert die DNS-Kette ausgehend von den Primern. Durch den zyklischen Ablauf und die Wiederholung der Reaktion (Denaturierung, Primeranlage, Polymerisation) kommt es zu einer Vervielfältigung des zwischen den Primern liegenden DNS-Fragments.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode zur Mutagenese und Konstruktion von Plasmiden sowie zur Genotypisierung von Mäusen und ES-Zellen verwendet.

2.1.17.1 *Verwendete Polymerasen*

Taq DNA Polymerase (GenScript)

Zur Genotypisierung von Mäusen und ES-Zellen wurde die Taq DNA Polymerase (GenScript) samt mitgeliefertem Puffer verwendet. Die DNS wurde wie unter 2.1.12 beschrieben vorbereitet.

Der Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Ansatz Taq DNA Polymerase	
Primer 1 10µM	1,25µL
Primer 2 10µM	1,25µL
10x Taq Puffer	2,5µL
dNTPs 1,25mM	4,0µL
Taq Polymerase	0,25µL
H ₂ O	14,75µL
DNS	1µL

Die Programme für die Polymerase-Kettenreaktion liefen im Biometra Thermocycler T1 oder UNO II mit folgenden Einstellungen ab:

94°C	1min	
94°C	30sec	} x40
56°C	40sec	
72°C	1min	
72°C	10min	

Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System (Roche)

Zur Amplifizierung von DNS-Stücken aus genomischer DNS, bei denen eine niedrige Fehlerrate essenziell war, zum Beispiel zur Konstruktion des Targeting-Vektors, wurde das Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System (Roche) genutzt. Durch die Anwesenheit eines thermostabilen Proteins mit Korrekturaktivität (proofreading) wird die Fehlerrate bei der Amplifizierung deutlich gesenkt.

Um Primerdimerbildungen oder Fehlhybridisierungen vorzubeugen wurde die Polymerase erst nach einem initialen Denaturierungsschritt zugegeben (hot start).

Ein Beispielansatz sieht folgendermaßen aus:

Ansatz Expand High Fidelity ^{PLUS} PCR System	
H ₂ O	26,5µL
Expand High Fidelity ^{PLUS} Reaction Buffer 5x	5,5µL
dNTPs 1,25mM	8µL
DNS	1µL
Primer 1 10µM	2µL
Primer 2 10µM	2µL

Bei 80°C zupipettieren:

Expand High Fidelity ^{PLUS} Reaction Buffer 5x	4,5µL
Expand High Fidelity ^{PLUS} Enzyme Blend (5U/µL)	0,5µL

Das Programm im Biometra Thermocycler T1:

95°C	2min	
80°C	PAUSE	
94°C	2min	
94°C	30sec	} x10; -1°C
68°C	30sec	
72°C	50sec	} x25
94°C	30sec	
62°C	30sec	
72°C	50sec	
72°C	7min	

Die Elongationszeit bei 72°C richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNS-Fragments (1min/kb), die Temperatur der Primeranlagerung nach den verwendeten Primern. Bei zwecks Mutagenese mutierten Primern lässt sich die optimale Anlagerungstemperatur gerade in den ersten Zyklen schwer abschätzen, daher wird durch Reduktion der Anlagerungstemperatur in den ersten 10 Zyklen um jeweils 1°C (touchdown) eine breite Temperaturspanne durchlaufen.

Phusion™ High Fidelity PCR Kit (Finnzymes)

Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase ist ein thermostabiles, schnell arbeitendes Enzym mit Korrekturaktivität. Diese Polymerase wurde ebenso wie das Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System für Amplifikationen eingesetzt, die eine möglichst geringe Fehlerrate aufzeigen sollten.

Ansatz Phusion™ High Fidelity	
H ₂ O	25,5µL
dNTPs 1,25mM	8µL
DNS	1µL
Primer 1 10µM	2,5µL
Primer 2 10µM	2,5µL

Bei 80°C zupipettieren:

5x Phusion HF Buffer	10µL
Phusion DNA Polymerase (2U/µL)	0,5µL

Das Programm im Biometra Thermocycler T1:

98°C	1min	
80°C	PAUSE	
98°C	30sec	
98°C	10sec	} x10; -1°C
68°C	20sec	
72°C	30sec	
98°C	10sec	} x25
62°C	20sec	
72°C	30sec	
72°C	7min	

Die Elongationszeit bei 72°C richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNS-Fragments (30sec/kb).

2.1.17.2 Herstellung von Oligonukleotid-Primern

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden mit Hilfe eines Computerprogramms erstellt (DNAMAN, Version 5.0) und über MWG Biotech bezogen. Zur Mutagenese wurden Mutationen im 5'-Ende des Primers eingebaut. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in einer entsprechenden Menge H₂O gelöst, so dass die Konzentration 10µM betrug. Die verwendeten Primer finden sich im Anhang (6.1).

2.1.17.3 Overlap-PCR

Bei der Overlap-PCR werden zwei überlappende DNS-Fragmente getrennt voneinander amplifiziert. Diese Fragmente sind jeweils am 3'-Ende komplementär zueinander. In diesem komplementären Bereich wird durch die Verwendung modifizierter Primer eine Mutation eingefügt. In einem zweiten Reaktionsschritt werden die beiden Fragmente zu einem einzigen Stück mit der gewünschten Mutation zusammengefügt. Dazu werden in einen Reaktionsansatz statt Ausgangs-DNS die beiden Fragmente gegeben, außerdem die an den äußeren 5'-Enden liegenden Primer. Die übrigen Bedingungen unterscheiden sich nicht von einer normalen PCR (2.1.17.1).

2.1.18 Southern-Blot

Mit Hilfe des Southern-Blots lassen sich einzelne DNS-Fragmente aus genomischer Gesamt-DNS identifizieren. Dazu erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der DNS-Fragmente, die anschließend auf eine Membran geblottet und immobilisiert werden. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde werden die DNS-Fragmente sichtbar gemacht, die eine zur Sonde komplementäre Region aufweisen (Southern, 1975).

2.1.18.1 Lösungen

5M NaCl	
NaCl	29,2g
H ₂ O	ad 100mL

0,5M EDTA pH 8,0	
Na ₂ EDTA*2 H ₂ O	93,05g
H ₂ O	ad 500mL
pH 8,0 mit NaOH einstellen	

1M Tris pH 8,0	
Tris	60,5g
H ₂ O	ad 500mL
pH 8,0 mit HCl _{konz} einstellen	

20% SDS	
SDS	100g
H ₂ O	ad 500mL

1M NaH ₂ PO ₄	
NaH ₂ PO ₄ *2 H ₂ O	156g
H ₂ O	ad 1000mL

1M Na ₂ HPO ₄	
Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	178g
H ₂ O	ad 1000mL

20x SSC	
NaCl	175g
Na ₃ Citrat*2 H ₂ O	88g
H ₂ O	ad 1000mL
pH 7,0 mit HCl _{konz} einstellen	

0,4M HCl	
HCl _{konz}	40mL
H ₂ O	ad 1000mL

0,5M NaOH / 1,5M NaCl	
NaOH	40g
NaCl	175,3g
H ₂ O	ad 2000mL

0,5M Tris / 3M NaCl	
Tris	121g
NaCl	351g
H ₂ O	ad 2000mL
pH 7,5 mit HCl _{konz} einstellen	

ssDNS 10mg/mL	
DNS from herring sperm (Sigma)	0,5g
H ₂ O	ad 50mL

10x TE	
Tris 1M pH 8,0	50mL
EDTA 0,5M pH 8,0	10mL
H ₂ O	ad 500mL

Church Puffer	
BSA	5g
H ₂ O	50mL
Na ₂ HPO ₄ 1M	193,5mL
NaH ₂ PO ₄ 1M	56,5mL
20% SDS	175mL
0,5M EDTA	1mL
ssDNS 10mg/mL (vor Gebrauch 10min bei 95°C denaturieren)	5mL
H ₂ O	ad 500mL

2.1.18.2 Gellauf

Genomische DNS oder DNS aus Stammzellen wurde über Nacht mit 20U eines Restriktionsenzym verdaut (PstI für die 5'-Sonde, XbaI für die Neo-Sonde) und anschließend auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Gele wurden unter UV-Licht mit angelegtem Lineal fotografiert. Zur Depurinierung wurden die Gele 15min in 0,4M HCl geschwenkt, wodurch es zu Strangbrüchen kommt. Nach 30-minütiger Denaturierung in 0,5M NaOH / 1,5M NaCl wurde 45min in 0,5M Tris / 3M NaCl, pH 7,5 neutralisiert.

2.1.18.3 Blotting

Um die DNS-Fragmente vom Gel (2.1.18.2) auf eine Hybond-N Membran (Amersham) zu transferieren wurde ein Blot folgendermaßen aufgebaut:

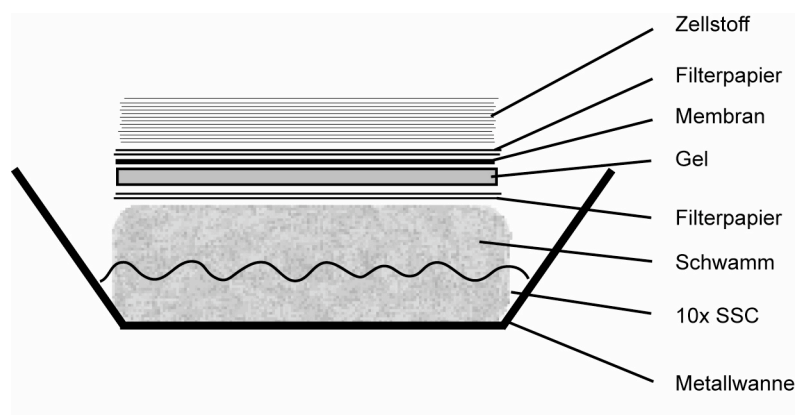


Abbildung 2-1 Aufbau eines Southern-Blots zum Transfer von DNS-Fragmenten auf eine Membran

Durch die obenaufliegenden Filterpapiere und die mit 10x SSC getränkten Schwämme entstehen Kapillarkräfte, wodurch die DNS-Fragmente auf die Membran übertragen werden. Am darauffolgenden Tag wurde der Blot abgebaut, die Geltaschen auf dem Blot mit Bleistift markiert und die Membran zur Immobilisierung der DNS mit UV-Licht bestrahlt (cross-linking) (UV-Stratalinker 1800, Stratagene) und anschließend 1-2h bei 80°C gebacken (Heraeus VTR5022).

2.1.18.4 Herstellung einer ^{32}P -markierten Sonde

Die Sonden für den Southern-Blot wurden durch PCR aus genomischer DNS amplifiziert und über eingefügte Restriktionsschnittstellen subkloniert. Vor der Markierungsreaktion wurden sie durch Restriktionsverdau aus dem Vektor geschnitten und mittels Elektroelution aufgereinigt. Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem Random Primed Labeling Kit von Roche. Eine Hexanukleotidmischung dient als Primer, Klenow-Enzym synthetisiert neue DNS-Stränge und baut dabei $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP mit ein. Es wurden pro Reaktionsansatz 100ng Sonde eingesetzt, wobei mit Wasser auf 8 μL ergänzt und die DNS unmittelbar vor der Labelingreaktion 10min bei 95°C denaturiert wurde. Der Labelingansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Labelingansatz	
DNS, denaturiert	8 μL
dXTP (dATP, dGTP, dTTP, je 0,5mM)	3 μL
Puffer No.6 ,10x	2 μL
$[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP 10mCi/mL (Hartmann)	6 μL
Klenow-Enzym	1 μL

Dieser Ansatz wurde 60min bei 37°C inkubiert und anschließend über eine NickTM Column (GE Healthcare) von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt, wobei genau nach Herstellerangaben vorgegangen wurde. Die Aktivität der Sonde wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

2.1.18.5 Hybridisierung

Die Membran mit den aufgeblotteten DNS-Fragmenten (2.1.18.3) wurde zunächst 4 Stunden lang bei 60°C in Church-Puffer prähybridisiert. Dazu wurde die Membran mit dem vorgewärmten Puffer in eine Schlauchfolie (Neolab) eingeschweißt und in einer Wanne im Wasserbad geschwenkt.

Zur Hybridisierung wurde die Sonde zunächst 10min aufgeköcht, kurz auf Eis gestellt und zu der entsprechenden Menge vorgewärmten Church-Puffers gegeben, so dass die Aktivität 5×10^6 cpm/mL entsprach. Die Membran wurde mit $0,125 \text{ mL/cm}^2$ Hybridisierungspuffer in eine neue Schlauchfolie eingeschweißt und über Nacht bei 60°C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran folgendermaßen gewaschen um überschüssige und unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen:

15min	2xSSC / 0,1%SDS	60°C
30min	0,4xSSC / 0,1%SDS	65°C
30min	0,4xSSC / 0,1%SDS	67°C
30min	0,4xSSC / 0,1%SDS	72°C

Nachdem die Membran luftgetrocknet war, wurde eine Phospho-Imager-Platte (BAS MP2025P, Fujifilm) über Nacht bis mehrere Tage aufgelegt und mit einem Phospho-Imager (BAS 1000, Fujix) ausgelesen.

2.2 Proteinanalyse

2.2.1 Proteingewinnung aus Gewebe

Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einer auf Trockeneis vorgekühlten Reibschale zermahlen. Das so erhaltene Pulver wurde mit 2% SDS / 50mM Tris, pH 7.4 (10mg Gewebe/100 μL) 10min gekocht, 10min bei 15000rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Das Lysat wurde bei -80°C gelagert.

2.2.2 Quantitative Proteinbestimmung

Zur Quantifizierung wurde der BCATM Protein Assay von Pierce verwendet, der sich die Biuret-Reaktion zunutze macht. Es wurde eine Standardreihe von 0,5-5 μg Protein (Albumin Fraktion V, Roth) in 50 μL mit 200 μL eine Gemischs aus BCATM Protein Assay Reagent I und II (50:1) bei 60°C 45-60min lang inkubiert. Danach wurden die Proben in einer Mikrotiterplatte bei 540nm vermessen (Titertek Multiskan MCC/340). Parallel dazu wurde verschiedene Verdünnungen der zu bestimmenden Proteinproben in Doppelbestimmungen vermessen. Anhand der Standardreihe wurde die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Um Proteingemische der Größe nach aufzutrennen, wurden SDS-Polyacrylamidgele nach dem diskontinuierlichen Lämmli-System verwendet. Dabei wird die Proteinprobe durch Zugabe von SDS und fünfminütiges Kochen denaturiert und es entstehen SDS-Protein-Komplexe, die sich nur noch in ihrer Größe unterscheiden, proteineigene Ladungen spielen so keine Rolle mehr (Laemmli, 1970).

Lösungen

10x TBS	
Tris	12,1g
NaCl	87,6g
H ₂ O	ad 1000mL
pH 8,2 mit HCl _{konz} einstellen	

1x TBST	
10x TBS	100mL
Tween 20	1mL
H ₂ O	ad 1000mL

4x Tris/SDS pH 8,8	
Tris	18,2g
SDS	0,4g
H ₂ O	ad 1000mL
pH 8,8 mit HCl _{konz} einstellen	

4x Tris/SDS pH 6,8	
Tris	6,04g
SDS	0,4g
H ₂ O	ad 100mL
pH 6,8 mit HCl _{konz} einstellen	

10% Trenngel	
Acrylamid/Bis-acrylamid 30 (29:1)	1,67mL
4x Tris/SDS pH 8,8	1,25mL
H ₂ O	2,08mL
20% APS	12,5µL
TEMED	5µL

12,5% Trenngel	
Acrylamid/Bis-acrylamid 30 (29:1)	2,08mL
4x Tris/SDS pH 8,8	1,25mL
H ₂ O	1,67mL
20% APS	12,5µL
TEMED	5µL

Sammelgel	
Acrylamid/Bis-acrylamid 30 (29:1)	325µL
4x Tris/SDS pH 6,8	625µL
H ₂ O	1,525mL
20% APS	6µL
TEMED	3µL

10x Elektrophoresepuffer	
Tris	30,2g
Glycin	144g
SDS	10g
H ₂ O	ad 1000mL

4x Probenpuffer (Lämmli)	
Tris, pH 6,7	200mM
DTT	200mM
SDS	5%
Bromphenolblau	0,04%
Glycerin	40%

Das Gießen der Gele und die anschließende Elektrophorese wurde in einer Mini Protan 3 Cell Gelkammer (Biorad) durchgeführt. Als Größenstandard wurde der Precision Plus Protein Standard (Biorad) mit aufgetragen. Die Gele wurden bei 50mV einlaufen gelassen und die Proteine anschließend bei 150mV aufgetrennt.

2.2.4 Western-Blot

Lösungen

Anodenpuffer 1	
Tris	36,3g
Methanol _{tech}	200mL
H ₂ O	ad 1000mL
pH 10,4 mit HCl _{konz} einstellen	

Kathodenpuffer	
g-Aminohexansäure	5,2g
Tris	3,03g
Methanol _{tech}	200mL
H ₂ O	ad 1000mL
pH 7,6 mit HCl _{konz} einstellen	

Anodenpuffer 2	
Tris	3,03g
Methanol _{tech}	200mL
H ₂ O	ad 1000mL
pH 10,4 mit HCl _{konz} einstellen	

Die Proteine wurden auf eine PVDF Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Dazu wurde die Membran kurz in Methanol eingeweicht und in Anodenpuffer 2 gewaschen. Drei Stück Filterpapier (in Anodenpuffer 1 eingeweicht) und zwei Stück Filterpapier (in Anodenpuffer 2 eingeweicht) wurden übereinandergelegt, darauf die vorbehandelte Membran aufgebracht und auf diese das Gel. Darauf kamen fünf Filterpapiere, die zuvor in Kathodenpuffer eingeweicht waren. Dieser Blotting-Stapel wurde auf die Anodenplatte gelegt (V20-SDB, Techne AG) und bei 0,8mA / cm² eine Stunde geblottet. Anschließend wurde die Membran 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockinglösung (5% Milchpulver in 1x TBST) geschüttelt. Die Membran wurde mit 1x TBST gewaschen und mit dem primären Antikörper in 1x TBST 1,5h in einem 50mL Röhrchen auf einem Taumelmischer (NeoLab) inkubiert. Nach drei zehnminütigen Waschschrinen mit 1x TBST wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für eine weitere Stunde auf dem Taumelmischer inkubiert. Der sekundäre Antikörper war entweder an Alkalische Phosphatase (AP) oder an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Nach erneutem Waschen (2x 5min in 1% Milchpulver in 1x TBST, 2x 10min in 1x TBST) konnte das nachzuweisende Protein je

nach verwendetem sekundärem Antikörper folgendermaßen sichtbar gemacht werden:

Alkalische Phosphatase

5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphat (BCIP) wird durch Alkalische Phosphatase hydrolysiert und bildet nach Oxidation mit Nitrotetrazolblau (NBT) einen blauen Farbstoff.

Zur Immundetektion wurde die NBT/BCIP Stock Solution von Roche nach Herstellerangaben verwendet.

Meerrettich-Peroxidase

Meerrettich-Peroxidase oxidiert in Anwesenheit von H_2O_2 Luminol wodurch es zu einer Lichtemission bei 428nm kommt. Diese Chemilumineszenz kann durch Schwärzung eines aufgelegten Films sichtbar gemacht werden.

Die Membran wurde mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent (Reagent1 und Reagent2 1:1) (Perkin Elmer) 1min inkubiert, in Klarsichtfolie eingeschlagen und ein Film (Hyperfilm ECL, Amersham) für 15sec bis 15min aufgelegt. Der Film wurde mit einer Entwicklermaschine (Curix 60, AGFA) entwickelt.

2.2.5 Membranpräparation

Um Membranproteine zu isolieren, wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einer auf Trockeneis vorgekühlten Reibschale pulverisiert. Da Proteine nach der Zellyse sehr schnell gespalten werden, wurden alle folgenden Arbeitsschritte zügig bei 4°C durchgeführt, sowie den Puffern ein Gemisch aus Proteaseinhibitoren zugesetzt (Protease Inhibitor Mixture 2 μ L/mL (Sigma), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Fluka) 200mM, Calpain Inhibitor I (Roche) 8 μ g/mL, Calpain Inhibitor II (Roche) 8 μ g/mL). Pro 100mg Gewebe wurde 1mL Lysepuffer (300mM Saccharose, 75mM NaCl, 20mM EDTA, 20mM EGTA, 10mM Tris/HCl pH7,4) zugegeben und mit einem Ultraturrax (Polytron PT 1200, Kinematica AG) auf Eis homogenisiert. Um größere Zellfragmente abzutrennen, wurde zweimal für 5min bei 4500rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde 30min bei 50000rpm und 4°C ultrazentrifugiert (L-80 Ultrazentrifuge, Beckmann) und das Pellet in Solubilisierungspuffer (1% Desoxycholat, 10mM EDTA, 10mM EGTA, 50mM Tris/HCl pH7,4) mit einem Potter (Typ RM4, Janke & Kunkel KG) resuspendiert. Durch einen zweiten

Untrazentrifugationsschritt (50000rpm für 30min bei 4°C) wurde nichtlösliches Material abgetrennt. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (2.2.2) und die Membranproteine bei -80°C gelagert.

2.2.6 Co-Immunpräzipitation

Die zur Co-Immunpräzipitation verwendete Protein A Sepharose (Sigma) wurde in 2mL PBS pro 250mg aufgenommen und mit 0,1% NaN₃ versetzt. Vor Benutzung wurden 100µL Sepharose dreimal mit 500µL 1x TBS / 1% Triton-X gewaschen.

Um Proteine abzutrennen, die unspezifisch an die Protein A Sepharose binden, wurden 200µL solubilisierte Membranproteine (ca 1-1,5mg Protein) (2.2.5) mit 100µL gewaschener Protein A Sepharose 1h bei 4°C präinkubiert. Der Überstand wurde 2,5h bei 4°C mit Ca_v1.2-Antikörper überkopfgeschüttelt (Rotator, NeoLab) und anschließend mit 100µL gewaschener Protein A Sepharose erneut für 1h bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Die Protein A Sepharose wurde dreimal mit 1x TBS / 1% Triton-X gewaschen und die interagierenden Proteine entweder für einen Western-Blot (2.2.4) mit 20 µL 4x Lämmli-Probenpuffer denaturiert (5min bei 95°C) oder sofort für eine Phosphorylierungsreaktion (2.2.8) weiterverwendet.

2.2.7 GST-Fusionsproteine

GST-Fusionsproteine wurden in Protease-defizienten BL21 Zellen exprimiert. Die für das jeweilige Protein kodierende DNS wurde aus cDNS (LK1, (Biel et al., 1990)) mittels PCR amplifiziert und in den pGEX-Vektor (2.1.1) inkloniert.

Zur Expression des jeweiligen Proteins wurden 100mL 2x YTA-Medium (2.1.2) mit 1mL einer Vorkultur (7mL 2x YTA, am Vorabend angeimpft und über Nacht wachsen gelassen) versetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 bei 37°C und 225rpm inkubiert (ca. 2h). Mit 100µL Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) (100mM) wurde die Expression in Gang gesetzt. Nach 3h bei 37°C und 225rpm wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (10min bei 5000rpm und 4°C), das Pellet mit 5mL eiskaltem STE (10mM Tris pH 8,0, 150mM NaCl, 1mM EDTA) gewaschen und schließlich in 5mL STE + 50µL Lysozym (10mg/mL) resuspendiert und 15min auf Eis stehen gelassen. Es wurden 760µL 10% Sarkosyl in STE zugegeben, gemischt und die Zellen dreimal 2-3 Sekunden mit Ultraschall lysiert. Nach Zugabe von 1150µL 10% Triton-X wurde 30min bei 4°C überkopfgeschüttelt und anschließend abzentrifugiert (10min bei 12000rpm und 4°C). Der Überstand wurde auf 4x40µL mit PBS gewaschene

Glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare) verteilt und 5min bei Raumtemperatur überkopfgeschüttelt. Die Glutathion Sepharose wurde dreimal mit 200 μ L PBS gewaschen und bis zur Verwendung in PBS bei 4°C gelagert.

2.2.8 Phosphorylierungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Co-Immünpräzipitate und GST-Fusionsproteine mit verschiedenen Proteinkinasen phosphoryliert.

2.2.8.1 Phosphorylierung mit PKA

Lösungen

Mg/ATP-Lösung 10mM	
MgCl ₂ 20mM	5mL
Na ₂ ATP 20mM	5mL
pH 7,4 mit NaOH einstellen	

[γ - ³² P]ATP-Lösung 100 μ M (1 μ Ci/ μ L)	
Mg/ATP-lösung 1mM	5 μ L
H ₂ O	40 μ L
[γ - ³² P]ATP 10mCi/mL (Hartmann)	5 μ L

2x PKA Phosphorylierungspuffer	
fer	
HEPES-NaOH pH 7,4	100mM
MgCl ₂	20mM
EGTA	1mM
DTT	1mM
Triton X-100	0.2%
pH 7,4 mit HCl _{konz} einstellen	

Um Co-Immünpräzipitate mit Proteinkinase A (PKA) zu phosphorylieren wurde dem Immünpräzipitat (2.2.6) cAMP zur Aktivierung der endogenen, am Immünkomplex haftenden PKA zugegeben. Die Protein A Sepharose wurde in 10 μ L 2x PKA Phosphorylierungspuffer resuspendiert, mit 10 μ M cAMP (2,8 μ L cAMP 25ng/ μ L, Sigma) versetzt und die Phosphorylierung durch Zugabe von 6.6 μ L [γ -³²P]ATP-Lösung 100 μ M (6.6 μ Ci/Reaktion) gestartet. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 5min mit 4x Lämmli gekocht und auf ein 10% SDS-PAGE aufgetragen (2.2.3). Die Proteine wurden auf eine Membran geblottet, (2.2.4), über Nacht eine Phosphoimagerplatte (Cyclone Storage Phosphor Screen, Packard) aufgelegt und mit einem Phospho-Imager (BAS 1000, Fujix) ausgelesen.

GST-Fusionsproteine (2.2.7) wurden durch die Zugabe von 5U PKAc (Sigma) phosphoryliert. Um die Spezifität der Phosphorylierung durch PKAc zu zeigen wurde einem Kontrollansatz PKI (Protein Kinase Inhibitor Fragment 5-24, Sigma) zugege-

ben. Die Glutathion Sepharose wurde in 10 μ L 2x PKA Phosphorylierungspuffer resuspendiert und mit 1 μ M PKI (1,3 μ L PKI 35ng/ μ L) bzw. 1,3 μ L H₂O und 5U PKAc (2 μ L PKAc 2,5U/ μ L) versetzt. Durch Zugabe von 6.6 μ L [γ -³²P]ATP-Lösung 100 μ M (6.6 μ Ci/Reaktion) wurde die Phosphorylierung gestartet (5min bei Raumtemperatur). Anschließend wurde der Ansatz mit 4x Lämmli 5min gekocht und ein Teil (3-10 μ L) auf ein 12,5% SDS-PAGE aufgetragen (2.2.3). Das Gel wurde geblottet, eine Phosphoimagerplatte (Cyclone Storage Phosphor screen, Packard) aufgelegt (eine Stunde bis über Nacht) und mit einem Phospho-Imager (BAS 1000, Fujix) ausgelesen.

2.2.8.2 Phosphorylierung mit PKC

Lösungen

10x PKC α -Puffer	
HEPES pH 7,4	200mM
MgCl ₂	100mM
CaCl ₂	1mM
ATP	5mM

PKC-Verdünnungspuffer	
HEPES pH 7,4	10mM
DTT	5mM
CHAPS	0,01%

10x Lipid-Mix	
Phosphatidylserin (Sigma)	1mg/mL
Diacylglycerol (Diolein, Sigma)	200 μ g/mL
HEPES pH 7,4	10mM
CHAPS	0,3%

2x PKC Phosphorylierungspuffer	
PKCx-Puffer 4x	50 μ L
Lipid-Mix 4x	50 μ L
Immer frisch ansetzen	

10x PKC ϵ und PKC ζ -Puffer	
HEPES pH 7,4	200mM
MgCl ₂	100mM
EGTA	1mM
ATP	5mM

Es wurden Phosphorylierungen an GST-Fusionsproteinen mit verschiedenen Isoformen der Proteinkinase C (PKC) durchgeführt. PKC α , PKC ϵ und PKC ζ wurden von Invitrogen bezogen und vor Gebrauch mit PKC-Verdünnungspuffer auf 20 μ g/mL verdünnt. Die Glutathion Sepharose wurde in 10 μ L 2x PKC Phosphorylierungspuffer (je nach Isoform der entsprechende Puffer) resuspendiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 2 μ L PKC-Verdünnung (20 μ g/mL) und 6.6 μ L [γ -³²P]ATP-Lösung 100 μ M

(6.6 μ Ci/Reaktion) (2.2.8.1) 15min bei 30°C phosphoryliert. Die Phosphorylierung mit PKC α konnte in einem Kontrollansatz mit einem spezifischen Inhibitor (Myristoylated Protein Kinase C Peptide Inhibitor, Promega) unterdrückt werden (100 μ M). Der Ansatz wurde mit 4x Lämmli 5min gekocht und ein Teil (3-10 μ L) auf ein 12,5% SDS-PAGE aufgetragen (2.2.3). Das Gel wurde geblottet, eine Phosphoimagerplatte (Cyclone Storage Phosphor screen, Packard) aufgelegt (eine Stunde bis über Nacht) und mit einem Phospho-Imager (BAS 1000, Fujix) ausgelesen.

2.3 Erzeugung genetisch veränderter Mäuse

2.3.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen werden. Um die Pluripotenz und somit die Keimbahngängigkeit der Zellen zu erhalten, wurde dem Nährmedium LIF (Leukämie-inhibierender-Faktor) zugegeben, außerdem wuchsen die Zellen stets auf einer Feederzellschicht (embryonale Fibroblasten). Dies hindert die Zellen am Ausdifferenzieren. Eine hohe Zelldichte und Passagenzahl kann sich ebenfalls negativ auf die Keimbahntransmission auswirken und sollte vermieden werden.

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert (HERAcell, Heraeus), das Medium wurde mindestens einmal täglich gewechselt. Hatten die Zellen eine Fläche von ca. 70% bewachsen wurden sie gesplittet. Kulturgefäße wurden von der Firma Sarstedt bezogen, die Medium-Volumina können der untenstehenden Tabelle entnommen werden.

Alle Arbeiten mit ES- und Feederzellen fanden unter einer Sterilbank (LaminAir HB2448, Heraeus) statt.

In dieser Arbeit wurden R1 ES-Zellen aus agouti-farbenen Mäusen verwendet (Nagy et al., 1993), die sich anfangs in der 11. bzw. 14. Passage befanden.

Tabelle 2-A Zellkulturgefäße

Kulturgefäß	Medium-Volumen	Trypsin / EDTA-Volumen
175 cm ² Flasche	20mL	5mL
75 cm ² Flasche	15mL	3mL
25 cm ² Flasche	5mL	2mL
55 cm ² Petrischale	10mL	2mL
6well Platte 54cm ²	3mL/Loch	1,5mL/Loch
24well Platte 55cm ²	1mL/Loch	500µL/Loch
96well Platte 31cm ²	200µL/Loch	40µL/Loch

Nährmedien und Zusätze

DMEM (Invitrogen)

Dulbecco's Modified Eagle Medium with High Glucose, Sodium Pyruvate and L-Glutamine

FCS (Gibco); Lot 40F2342K

Fötale Kälberserum; wurde 20min bei 60°C hitzeinaktiviert und in 50mL-Aliquots bei -20°C gelagert

Trypsin / EDTA 10x (Gibco)

Mit PBS auf 1x bzw. 2x verdünnen, sterilfiltrieren

LIF (Esgro™, Chemicon) 10⁷U/mL

Leukämie-inhibierender-Faktor, Arbeitslösung 5x10⁵U/mL: 1mL LIF 10⁷U/mL mit 19mL EF-Medium verdünnen, sterilfiltrieren und in Aliquots à 1mL bei 4°C lagern; Endkonzentration 1000U/mL

β-Mercaptoethanol (Sigma)

β-ME, Arbeitslösung 50mM: 73,5µL β-ME in 21mL PBS verdünnen, sterilfiltrieren und in Aliquots à 1mL bei -20°C lagern; Endkonzentration 0,1mM

Selektionszusatz G418 (Gibco)

Geneticin, G418-Sulfat, Arbeitslösung 40mg/mL, Aliquots à 5mL bei -20°C lagern; Endkonzentration 0,4mg/mL

Selektionszusatz Ganciclovir (Roche)

Cymeven i.v./ Ganciclovir-Na, Arbeitslösung 20mM, Aliquots à 50µL bei -20°C lagern; Endkonzentration 2µM

EF-Medium	
DMEM	450mL
FCS	50mL

ES-Medium	
DMEM	400mL
FCS	100mL
LIF 5×10^5 U/mL	1mL
β -ME 50mM	1mL

2.3.1.1 Präparation von Feederzellen

Embryonale Fibroblasten wurden aus Embryos am Tag 14,5 p.c. gewonnen. Die Feederzellen müssen den Einsatz von G418-haltigem Selektionsmedium überstehen. Deshalb wurden Mäuse mit Wildtypmäusen verpaart, die homozygot für ein Neomycinresistenzgen sind (CNG3 (-/-)), (Biel et al., 1999). Am folgenden Tag wurde auf einen Vaginalpfropf (Plug) geprüft und die positiven Weibchen auf Tag 0,5 p.c. bestimmt. Am Tag 14,5 p.c. wurden die schwangeren Weibchen getötet und in 80% Ethanol gebadet. Der Uterus wurde herauspräpariert und in eine Petrischale mit PBS gegeben. Die Embryos wurden aus dem Uterus entnommen und Kopf, Pfoten, Schwanz und die blutführenden inneren Organe (rot) entfernt. In ein 50mL Röhrchen (Falcon) wurde 1mL 1x Trypsin / EDTA pro Embryo vorgelegt und die zerkleinerten Embryos zugegeben. Nach 10min bei 37°C wurde mit immer kleineren Pipetten homogenisiert (10mL, 5mL, 2mL), dann wurde 2,5mL EF-Medium pro Embryo zugegeben und nochmals sehr gründlich suspendiert. Damit die Zelltrümmer absinken konnten, wurde das Röhrchen 10min stehen gelassen. Währenddessen wurden pro Embryo zwei 175cm²-Zellkulturflaschen vorbereitet, indem je 19mL EF-Medium vorgelegt wurde. Dazu wurde je 1mL der Feederzell-Suspension gegeben und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ wachsen gelassen. Nach Erreichen der Konfluenz (ca drei Tage) wurde nochmals drei Tage gewartet, bis die Zellen geerntet werden konnten.

2.3.1.2 Ernten, Bestrahlen und Einfrieren von Feederzellen

Zum Ernten der Feederzellen konnten jeweils fünf Kulturflaschen parallel bearbeitet werden. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 15mL PBS gewaschen, pro Flasche 4mL 1x Trypsin / EDTA zugegeben und 5min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit einer Pipette suspendiert, pro Flasche 6,5mL EF-Medium zugegeben und erneut gründlich suspendiert bis die Zellen vereinzelt waren. Jeweils 9mL der Zellsuspension wurden in ein 50mL-Röhrchen überführt, die Zellen aus bis zu fünf Flaschen konnten in einem Röhrchen vereinigt werden. Der Rest der Zellsuspension wurde in der Flasche belassen und mit 19mL EF-Medium aufgefüllt, ge-

schwenkt und erneut für 3-4 Tage wachsen gelassen (2. Passage). Nach dem Ab-ernten aller Flaschen wurden die Röhrchen 5min bei 1000rpm abzentrifugiert und jeweils zwei Zellpellets in 20mL EF-Medium vereinigt.

Die Zellen wurden absinken gelassen und mit 5000 Rad bestrahlt (Institut für Mikrobiologie, Rechts der Isar). Durch die Röntgenstrahlung werden die Zellen teilungsunfähig gemacht, so dass sie einen einschichtigen Zellrasen ausbilden auf dem die ES-Zellen wachsen können.

Nach der Bestrahlung wurden die Zellen 5min bei 1000rpm abzentrifugiert und alle Zellpellets zusammen in 15mL EF-Medium resuspendiert. Nach der Zugabe von 15mL EF-Medium + 20% DMSO wurden 1mL Aliquots auf Kryoröhrchen aufgeteilt und in einer Styroporbox bei -80°C langsam eingefroren. Gelagert wurden die Gefrierstocks in flüssigem Stickstoff.

Diese Prozedur wurde alle 3-4 Tage bis zur 5. Passage wiederholt.

2.3.1.3 Auftauen von Feederzellen

Feederzellen wurden einen Tag vor den ES-Zellen ausgesät. Dazu wurde ein Aliquot schnell im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 9mL EF-Medium versetzt. Die Zellen wurden für 5min bei 1000rpm abzentrifugiert, in dem benötigten Volumen EF-Medium resuspendiert und in eine entsprechende Zellkulturflasche gegeben. Ein Aliquot war je nach Passage für eine Fläche von $300\text{-}500\text{cm}^2$ ausreichend.

2.3.1.4 Auftauen und Aussäen von ES-Zellen

Ein ES-Zell-Gefrierstock wurde schnell im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und zusammen mit 9mL ES-Medium in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1000rpm für 5min wurde das Zellpellet in 1mL ES-Medium resuspendiert und in eine 25cm^2 Zellkulturflasche gegeben, die am Tag zuvor ausgesäte Feederzellen enthielt. Das Medium auf den Feederzellen wurde vor dem Aussäen der ES-Zellen zu ES-Medium gewechselt.

2.3.1.5 Splitten von ES-Zellkulturen

Zum Splitten von ES-Zellen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit der entsprechenden Menge 1x Trypsin / EDTA versetzt (**Tabelle 2-A**). Nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C wurden 1-2 Volumenteile ES-Medium zugegeben und die Zellen mit einer Pipette vereinzelt. Es wurde 5min bei 1000rpm zentrifugiert, das

Zellpellet in ES-Medium resuspendiert und auf das drei- bis sechsfache der abgeernteten Fläche ausgesät.

2.3.1.6 Anlegen von Gefrierkulturen

Um Gefrierstocks anzulegen wurden die 60-70% konfluent gewachsenen ES-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit der entsprechenden Menge 1x Trypsin / EDTA 5min bei 37°C inkubiert, mit 1-2 Volumenteilen ES-Medium versetzt, resuspendiert und 5min bei 1000rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in der gewünschten Menge Einfriermedium (ES-Medium mit 10% DMSO) resuspendiert und in 1mL-Aliquots in einer Styroporbox langsam bei -80°C eingefroren. Gelagert wurden die Gefrierstocks in flüssigem Stickstoff. Die Stocks wurden immer auf die Fläche ausgesät von der sie abgeerntet worden waren.

96well-Platten wurden nach dem Trypsinieren direkt mit 180µL Einfriermedium versetzt, suspendiert, mit Autoklavierband zugeklebt und für 1-3 Stunden bei -20°C eingefroren und anschließend für bis zu 3 Monate bei -80°C gelagert.

2.3.2 Primäres Zell-Targeting

Mit einem Targeting von chromosomaler DNS über homologe Rekombination in ES-Zellen lassen sich Mutationen gezielt ins Genom von Mäusen einführen. Ein Targeting-Vektor wird mittels Elektroporation in das Innere der ES-Zellen geschleust. Durch zweifaches crossing over homologer Bereiche kann nun der Targeting-Vektor gezielt ins Genom eingebaut werden (homologe Rekombination), zufällig in das Genom integrieren oder aber überhaupt nicht eingebaut werden. Der Targeting-Vektor trägt als Selektionsmarker ein Neomycinresistenzgen sowie ein Thymidinkinasegen. In Anwesenheit von G418 können nur solche Zellen überleben, die den Targeting-Vektor in das Genom aufgenommen haben und somit das Neomycinresistenzgen tragen (Positivselektion). Ob homologe Rekombination oder aber nur eine zufällige Integration stattgefunden hat, lässt sich mit einem Screening der isolierten Zellklone überprüfen.

2.3.2.1 Vorbereitung des Targeting-Vektors

Um den Targeting-Vektor für die Elektroporation und somit die homologe Rekombination vorzubereiten wurden 100µg Vektor mit 100U KpnI für 2 Stunden inkubiert (2.1.7). Um die Linearisierung zu überprüfen wurde 1µL einer 1:10-Verdünnung des Verdau-Ansatzes auf ein 0,7%iges Agarosegel aufgetragen. Der Ansatz wurde mit

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert (2.1.14) und die DNS gefällt (2.1.6). Die DNS wurde unter der Sterilbank trocknen gelassen, in 20 μ L sterilem H₂O gelöst und mit PBS auf 100 μ L ergänzt. Die DNS-Konzentration wurde bestimmt und der Ansatz 1:1 mit PBS verdünnt (Endkonzentration 0,5 μ g/ μ L).

2.3.2.2 Elektroporation

Am Abend vor der Elektroporation wurden Feederzellen auf 12 Petrischalen ausgesät (2.3.1.3). Für die Elektroporation wurde eine 75cm² Flasche bis zur 60-70%igen Konfluenz wachsen gelassen. Die Zellen wurden zweimal mit 15mL PBS gewaschen und mit 3mL 1x Trypsin / EDTA 5min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 4mL ES-Medium wurden die Zellen vereinzelt und in ein 15mL Röhrchen gegeben. Dieses Röhrchen wurde 5min bei 1000rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 900 μ L PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Elektroporationsküvette (25x4mm, peqlab) überführt und vorsichtig mit 100 μ L vorbereiteten Targeting-Vektor (2.3.2.1) gemischt (entspricht 50 μ g). Die Zellen wurden mit einem Gene PulserTM (BioRad) mit angeschlossenem Extender elektroporiert (0,23kV, 500 μ F) wobei sich eine Zeitkonstante von 5-7ms ergeben sollte. Die Küvette wurde 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen und die Zellen anschließend in ein 15mL Röhrchen transferiert. Nach Zugabe von 11mL ES-Medium wurde jeweils 1mL der Suspension in eine der vorbereiteten Petrischalen pipettiert.

2.3.2.3 Positivselektion mit G418

24 Stunden nach der Elektroporation wurden die ES-Zellen erstmals G418-haltigem Selektionsmedium ausgesetzt. Das Medium wurde mindestens einmal täglich, bei massivem Zellsterben auch zweimal täglich gewechselt.

2.3.2.4 Isolierung von Zellklonen

Nach 7-9 Tagen werden resistente Zellklone (gut erkennbar an ihren scharfen Umrissen) mit dem bloßen Auge sichtbar. Zur Isolierung dieser Klone (Picken) wurden Feederzellen auf 96well-Platten ausgesät. Unmittelbar vor dem Picken wurde auf einer 96well-Platte 30 μ L PBS pro Loch vorgelegt. Die Klone wurden unter einem Stereomikroskop (Zeiss) gepickt, das zuvor mit 80% Ethanol gereinigt und unter die Sterilbank gestellt worden war. Jeweils ein Klon wurde mit der Pipettenspitze umkreist, um ihn von der Feederzellschicht zu lösen, vorsichtig eingesaugt und in ein Loch der

vorbereiteten 96well-Platte mit PBS überführt. Waren alle 96 Löcher der Platte voll, wurde mit einer 8-Kanal-Pipette 30 μ L 2x Trypsin / EDTA pro Loch zugegeben, die Platte 5min bei 37°C inkubiert und die Klone mit der Pipette sehr ordentlich vereinzelte. Dann wurden 60 μ L ES-Medium (G418) zugegeben, nochmals suspendiert und davon 57 μ L auf je eine 96well-Platte aufgeteilt, so dass zwei identische Platten (A-Platte und B-Platte) entstanden.

Es wurde an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen gepickt.

2.3.2.5 Einfrieren und Splitten der isolierten Zellklone

Nach 2-3 Tagen (bei 70%iger Konfluenz) wurde die A-Platte zu Gefrierstocks verarbeitet (2.3.1.6), die B-Platte wurde auf drei 96well-Platten gesplittet (B-, C- und D-Platte für das Screening). Es wurden 150 μ L ES-Medium pro Loch auf der C- und D-Platte vorgelegt (ohne Feederzellen), die B-Platte zweimal mit 150 μ L PBS pro Loch gewaschen, mit 30 μ L 1x Trypsin / EDTA 5min bei 37°C inkubiert und die Zellen anschließend mit 120 μ L ES-Medium suspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden je 50 μ L auf die C- und D-Platte aufgeteilt, zu dem Rest auf der B-Platte wurde 150 μ L ES-Medium pro Loch gegeben. Da diese Platten für das Screening bestimmt waren, musste das Medium nicht mehr täglich gewechselt werden und es wurde gewartet bis die Zellen das Loch komplett bewachsen hatten (bis zu sechs Tage). Dann wurden die Platten zweimal mit 180 μ L PBS gewaschen und bei -20°C eingefroren.

2.3.2.6 Screening

Die Platten für das Screening wurden aufgetaut und die Zellen über Nacht bei 59°C mit 50 μ L Lysepuffer (10mM NaCl, 10mM EDTA, Tris 10mM, pH 7,5, 0,5% N-Laurylsarcosine, 0,25mg/mL Proteinase K) pro Loch lysiert. Um Verdunstungsverluste zu vermeiden, wurden die Platten mit Parafilm und Frischhaltefolie umwickelt und in einer dichten Plastikbox mit feuchten Tüchern verschlossen. Am folgenden Tag wurde in jedes Loch ein Gemisch aus Ethanol (10mL) und 5M NaCl (150 μ L) gegeben und die Platte mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die DNS fällt aus und haftet am Plastik, der Überstand wurde vorsichtig über eine Ecke abgeschüttet und die DNS zweimal mit 100 μ L 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen (etwa eine Stunde) wurde die DNS in 30 μ L H₂O gelöst und ent-

weder für einen Southern-Blot (2.1.18) einem Restriktionsverdau (2.1.7) unterzogen oder direkt für eine PCR-Reaktion eingesetzt.

2.3.3 Sekundäres Zell-Targeting

Beim sekundären Zell-Targeting wird ein pIC-Cre-Plasmid (Gu et al., 1993) in die vom ersten Targeting positiven ES-Zellklone eingeschleust. Dieses Plasmid exprimiert die Cre-Rekombinase, wodurch die gefloخته Neo-Tk-Selektionskassette durch Rekombination aus dem Genom entfernt wird. Durch den Zusatz von Ganciclovir können nur die Zellen überleben, die kein Thymidinkinasegen mehr tragen, bei denen die Selektionskassette also durch Cre-vermittelte Rekombination entfernt wurde.

2.3.3.1 Auftauen und Kultivierung positiver ES-Zellklone

Die als positiv identifizierten Klone wurden aus den bei -80°C gelagerten A-Platten hochgezogen. Dazu wurden die Platten im Brutschrank aufgetaut, der entsprechende Klon suspendiert und in mit Feederzellen vorbereitete 24well-Platten transferiert. Bei 60-70% Konfluenz wurden die Zellklone in das nächstgrößere Gefäß passagiert (2.3.1.5) (6well, dann 25cm^2 , dann $2 \times 75\text{cm}^2$). Eine 75cm^2 -Flasche wurde elektroporiert, die zweite zu Gefrierstocks verarbeitet (2.3.1.6.).

2.3.3.2 Vorbereitung des pIC-Cre Plasmids

$40\mu\text{g}$ des zirkulären pIC-Cre-Plasmids wurde mit Na-Acetat und Ethanol gefällt (2.1.6), in $20\mu\text{L}$ H_2O gelöst und mit $80\mu\text{L}$ PBS versetzt.

2.3.3.3 Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte wie beim ersten Targeting (2.3.2.2), mit dem Unterschied dass die Zellen nach der Elektroporation in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Petrischalen ausgesät wurden. 11mL Zellsuspension wurde auf 6 Platten folgendermaßen aufgeteilt: 4mL , 3mL , 2mL , 1mL , $0,5\text{mL}$, $0,25\text{mL}$.

2.3.3.4 Negativselektion mit Ganciclovir

Die Selektion begann bei den dichteren Petrischalen (4mL , 3mL , 2mL) nach 48h, bei den restlichen Petrischalen nach 72h. Das Selektionsmedium enthielt $2\mu\text{M}$ Ganciclovir. Nach etwa sieben Tagen konnten die ersten Klone isoliert werden, die Vorgehensweise hierbei entsprach dem des ersten Targetings (2.3.2.4, 2.3.2.5, 2.3.2.6).

2.3.4 Blastozysten-Injektion

2.3.4.1 Vorbereitung der ES-Zellen

Die ES-Zellen für die Injektionen wurden aus den bei -80°C gelagerten A-Platten des zweiten Targetings bis zur 6well-Platte hochgezogen (2.3.3.1). Jeder Klon wurde in unterschiedlichen Konzentrationen auf 6well-Platten gesplittet um am Tag der Injektion immer ein ausreichend, aber nicht zu dicht bewachsenes Loch zur Verfügung zu haben.

Für die Injektion wurde der ausgewählte Klon trypsinisiert (2.3.1.5), das Zellpellet in $500\mu\text{L}$ ES-Medium resuspendiert und zum Abtrennen der toten Zellen 30min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden vorsichtig $375\mu\text{L}$ Überstand abgenommen und der Rest gut suspendiert.

2.3.4.2 Blastozysten-Gewinnung

Zur Gewinnung von Blastozysten wurde jeweils ein C57/Bl6-Männchen mit zwei Weibchen des gleichen Stammes über Nacht verpaart. Am folgenden Morgen wurde auf einen Vaginalpfropf geprüft und die positiven Weibchen auf Tag 0,5p.c. festgelegt. Am Tag 3,5p.c. wurden die Weibchen durch Genickbruch getötet, die Uteri entnommen und mit M2 Medium (Sigma) durchgespült. Die Blastozysten wurden mit einer Transferpipette (ID= $115\text{-}124\mu\text{m}$, BioMedical Instruments) eingesammelt und bis zur Injektion in M16 Medium (Sigma) bei 37°C und 5% CO_2 aufbewahrt (ca. 1h).

2.3.4.3 Leihmütter

Die CD1-Weibchen, die als Leihmütter dienen sollten, wurden über Nacht mit vasektomierten FVB/N Männchen verpaart und am nächsten Morgen auf einen Vaginalpfropf untersucht. Den Tieren wurden am gleichen Tag (Tag 0,5p.c.) die injizierten Blastozysten implantiert.

2.3.4.4 Injektion

Die Blastozysten-Injektionen erfolgten an einem Injektionsstand mit einem Mikromanipulator. Zunächst wurde die Injektionskammer vorbereitet, indem an der Rückseite eines Aluminiumrahmens ein Deckgläschen mit Vaseline befestigt wurde. Diese Injektionskammer wurde während der gesamten folgenden Prozedur auf 10°C gekühlt. In die Injektionskammer wurde M2 Medium gegeben und mit Mineralöl (embryo tested, Sigma) überschichtet. Mit einer Transferpipette wurden sowohl die Blastozysten

zysten (2.3.4.2) als auch die vorbereiteten ES-Zellen (2.3.4.1) in die Injektionskammer gelegt. Halte- und Injektionspipette wurden mit Hilfe eines Druckdosierers (Cell Tram Oil, Eppendorf) bedient. Zur Injektion wurde eine Blastozyste mit der Haltepipette (Sterile TransferTips® ES, Eppendorf) fixiert, wobei darauf zu achten war, dass die innere Zellmasse bei der Injektion nicht verletzt werden konnte und eine Einschnürung der Trophoblasten möglichst genau gegenüber der Haltepipette erkennbar war. Mit der Injektionspipette (Sterile VacuTips, Eppendorf) wurden 10-15 ES-Zellen perlschnurartig, das heißt ohne viel dazwischenliegendes Medium, eingesammelt und in die fixierte Blastozyste injiziert (**Abbildung 2-2**). Die Injektionspipette befindet sich auf der richtigen Höhe, wenn sowohl die Einschnürung als auch die Injektionspipette scharf fokussiert sind. Dann kann genau an der Einschnürung in die Blastozyste eingedrungen werden. Nach Beendigung der Injektionen wurden die injizierten Blastozysten mit einer Transferpipette eingesammelt und in M16 Medium bei 37°C und 5%CO₂ bis zur Reimplantation inkubiert (1-3h).

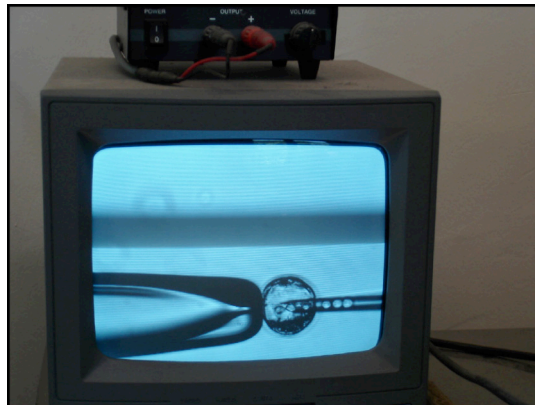


Abbildung 2-2 Injektion von ES-Zellen in eine Blastozyste. Links die Haltepipette, mit der die Blastozyste festgehalten wird, rechts die Injektionspipette mit den ES-Zellen

2.3.4.5 Implantation der injizierten Blastozysten in Leihmütter

Die Implantation von injizierten Blastozysten in die Ammenmütter wurde von PD Dr. Sven Moosmang durchgeführt. Die Tiere wurden narkotisiert (150µL einer Mischung aus 2,1mL NaCl 0,9%, 0,39mL Rompun, 0,39mL Ketavet, 0,12mL Ventranquil 1%), unter einem Stereomikroskop abgelegt und eine Flanke mit 80% Ethanol desinfiziert. Durch einen kleinen Schnitt wurden Ovar und Uterus zugänglich gemacht und mit einer Pinzette herausgezogen. Das Infundibulum wurde eröffnet und die injizierten Blastozysten mit einer Transferpipette eingebracht. Der Uterus wurde wieder in die

ursprüngliche Lage gebracht und die Wunde vernäht. Bis zum Erwachen verblieb die Maus unter einer Rotlichtlampe.

2.3.5 Testen von Chimären auf Keimbahngängigkeit

Unter den Nachkommen der Leihmütter befinden sich nach erfolgreicher Blastozysteninjektionen und Reimplantationen Chimären. Der Grad des Chimärismus kann aus dem Verhältnis von agouti-farbenem zu schwarzem Fell abgeschätzt werden. Chimäre Mäuse setzen sich aus Zellen zusammen, die aus den Blastozysten der schwarzen C57/Bl6 Spendertiere stammen und außerdem aus Zellen, die aus den injizierten ES-Zellen hervorgegangen sind. Die ES-Zellen wurden ursprünglich aus agouti-farbenen 129/Sv Mäusen gewonnen, deshalb spiegelt der Anteil brauner Fellfarbe den Anteil an beteiligten ES-Zellen wider.

Um nun zu testen, ob die genetisch modifizierten ES-Zellen auch zur Bildung von Keimzellen beitragen, das mutierte Allel also weitervererbt werden kann, wurden die Chimären mit schwarzen C57/Bl6 Mäusen verpaart. Da agouti dominant über schwarz vererbt wird kann ein Nachkomme mit schwarzem Fell das mutierte Gen nicht tragen. Agouti-farbene Nachkommen tragen dagegen ein Allel aus dem ES-Zell Genom, entweder das mutierte oder das Wildtyp-Allel. Diesbezüglich wurde eine Genotypisierung durchgeführt.

2.3.5.1 Haltung und Zucht der Mäuse

Die Mäuse wurden in einem dafür geeigneten Tierstall den Anforderungen nach in Makrolon Käfigen gehalten (bis zu fünf adulte Tiere in einem Typ II Käfig, bis zu 12 adulte Tiere oder zwei Weibchen mit ihren Würfen in einem Typ III Käfig). Als Einstreu wurden autoklavierte Späne (Altromin) verwendet, die bei Bedarf noch mit Nistmaterial („Nestlets“, Emsicon) ergänzt wurden. Die Fütterung („Zuchtdiät – Ratten und Mäuse“, Altromin 1314) und Wasserversorgung erfolgte *ad libitum*. Zur Zucht wurden i.d.R. jeweils zwei Weibchen im paarungsfähigen Alter (5-30 Wochen) zu einem Männchen (6 Wochen–1½ Jahre) gesetzt. Die Nachkommen wurden im Alter von 10-14 Tagen durch PCR Analyse (2.1.17) genotypisiert und mit 3-4 Wochen von der Mutter abgesetzt und Männchen und Weibchen getrennt.

Die Inzuchtstämme C57BL/6 (C57BL/6N CrI BR) und FVB/N (FVB/N CrI BR) sowie der Auszuchtstamm CD-1 [CrI:CD[®]-1(ICR) BR] wurden von der Firma Charles River, Sulzfeld bezogen. Die Vasektomie von FVB/N Männchen wurde von der Fa. Harlan Winkelmann durchgeführt.

2.4 Untersuchung genetisch veränderter Mäuse

2.4.1 Myozytenpräparation

Ventrikuläre Myozyten wurden aus den Herzen adulter Mäuse isoliert. Dabei wurde genau nach Vorschrift gearbeitet (AfCS Procedure Protocol PP00000125). Die Myozytenkultur wurde bei 37°C und 2% CO₂ inkubiert.

2.4.2 Elektrophysiologie

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

Es wurden Kalziumströme (I_{Ca}) an 1-24 Stunden vorher isolierten Myozyten (2.4.1) gemessen. Es wurden nur stäbchenförmige, die typische Streifung aufzeigende und kalziumtolerante Myozyten verwendet. Die Messungen wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt. Gemessen wurde in einer Kammer unter mikroskopischer Beobachtung, wobei die Zellen kontinuierlich mit Hilfe eines schnellen Lösungsaustauschers mit Bad- oder Testlösung gespült wurden. Die Ableitung erfolgte mit Hilfe einer Glasmikroelektrode (Patchpipette), die mit einem Verstärker (Patch Clamp EPC9 Gerät (HEKA, Lambrecht)) gekoppelt war. Die Datenerfassung erfolgte unter der Kontrolle der Pulse+Pulsefit Software v8.54 (KEKA; Lambrecht). Die Daten wurden mit 5kHz gefiltert. Leckströme wurden wenn nötig mit Hilfe der Software kompensiert.

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

Die Extrazellulärlösung enthielt 140mM Tetraethylammonium-Cl, 2mM MgCl₂, 1,8mM CaCl₂, 10mM HEPES und 10mM Glucose bei pH 7,4. Die Patchpipette (1–2MΩ) enthielt eine Intrazellulärlösung mit 135mM CsCl, 1mM MgCl₂, 5mM MgATP, 10mM

HEPES und 10mM BAPTA. Es wurden nur Messungen ausgewertet, die einen Widerstand von unter $6\text{M}\Omega$ aufzeigten. Kalziumströme wurden entweder durch wiederholte Depolarisierungspulse (200ms, 10mV) stimuliert oder durch eine Reihe von Depolarisierungspulsen bei verschiedenen Potenzialen (-40 bis $+80\text{mV}$ in 10mV Schritten) erreicht. Das Haltepotenzial betrug stets -40mV . Kalziumströme wurden als die Differenz zwischen dem größten Einwärtsstrom und dem Strom am Ende des Testpulses bestimmt. Um die Effekte von Isoproterenol und Forskolin auf den Kalziumstrom zu untersuchen wurden Messungen in Anwesenheit der Substanzen durchgeführt (100nM Isoproterenol bzw. $10\mu\text{M}$ Forskolin), wobei mit der Zugabe gewartet wurde, bis eine stabile Basislinie erreicht war.

3 Ergebnisse

3.1 Phosphorylierungen

Es wurden Phosphorylierungsexperimente mit Proteinkinase A (PKA) und verschiedenen Isoformen der Proteinkinase C (PKC) durchgeführt. Untersucht wurden Co-Immunpräzipitate sowie GST-Fusionsproteine. Anhand der Versuche konnten die Phosphorylierungsstellen der verschiedenen Kinasen in der α_1 - bzw. der β_2 -Untereinheit des kardialen L-Typ-Kalziumkanals eingegrenzt oder identifiziert werden.

3.1.1 GST-Fusionsproteine $Ca_v1.2$

Mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen wurde untersucht, an welchen Stellen der C-Terminus des $Ca_v1.2$ von verschiedenen Kinasen phosphoryliert wird. Mittels PCR wurden aus cDNS (LK1) (Biel et al., 1990; Welling et al., 1997) Teile des $Ca_v1.2$ C-Terminus amplifiziert und dabei über mutierte Primer Restriktionserkennungssequenzen für BamHI und XhoI an das PCR-Produkt angefügt. Über diese Restriktionsschnittstellen wurden die Fragmente in das pGEX-6P-1 Plasmid inkloniert und anschließend sequenziert, um die korrekte Basenabfolge sicherzustellen. Es wurden fünf Fragmente des Carboxyterminus für die Phosphorylierungsreaktionen verwendet (**Abbildung 3-1**). Die S1928A-Mutation wurde jeweils mit einer Overlap-PCR eingeführt. Die entsprechenden Primer sind im Anhang aufgeführt. Die GST-Fusionsproteine wurden in BL21-Zellen exprimiert und anschließend wie unter (2.2.8) beschrieben phosphoryliert.

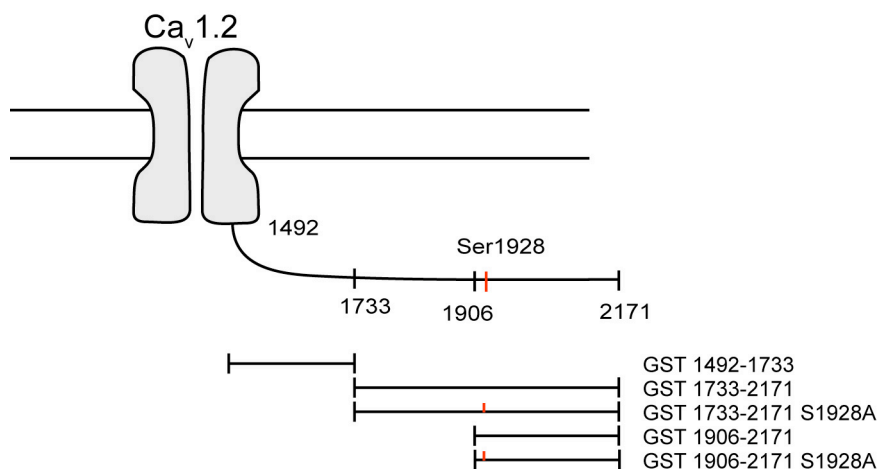


Abbildung 3-1 Schematische Darstellung des $Ca_v1.2$. Der Carboxyterminus beginnt an Aminosäure 1492 und endet an Aminosäure 2171. Die generierten GST-Fusionsproteine sind mit den jeweiligen Anteilen des C-Terminus dargestellt.

3.1.1.1 PKA

Nach der Phosphorylierung mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKAc) erscheint eine Bande für das GST-Fusionsprotein 1733-2171 im Autoradiogramm (**Abbildung 3-2**). Ist in diesem Protein Serin 1928 durch Alanin ersetzt, ist kein Phosphorylierungssignal mehr detektierbar. Da auch für das vordere Stück des C-Terminus (GST 1492-1733) kein Phosphorylierungssignal nachweisbar ist, ist gezeigt, dass Serin 1928 die einzige Phosphorylierungsstelle der PKA im $Ca_v1.2$ C-Terminus ist. Um die Spezifität der PKA-Phosphorylierung zu zeigen, wurde immer auch ein Ansatz mit PKI als spezifischem Inhibitor der PKA versetzt. In diesen Ansätzen wurde kein Phosphorylierungssignal detektiert. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit einem Antikörper gegen GST inkubiert. Der Immunoblot zeigt, dass in allen Ansätzen das entsprechende GST-Fusionsprotein enthalten war.

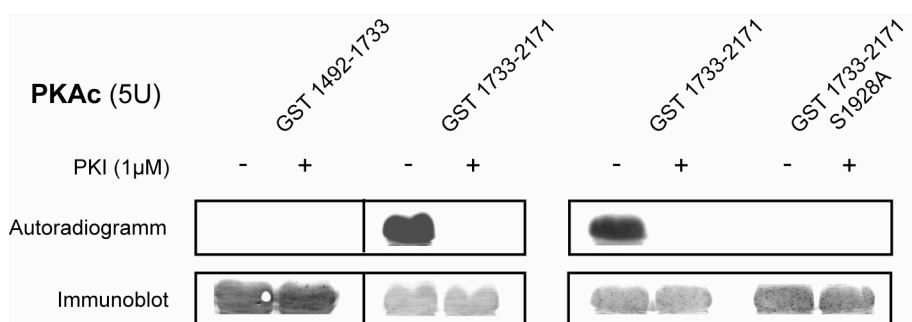


Abbildung 3-2 Phosphorylierung mit PKAc. Nur das Wildtyp-Fragment GST 1733-2171 wird phosphoryliert. Die Phosphorylierung wird durch PKI verhindert. Im Immunoblot mit anti-GST ist das Vorhandensein des entsprechenden GST-Fusionsproteins in allen Ansätzen gezeigt.

3.1.1.2 PKC α

PKC α ist eine konventionelle PKC (cPKC) und phosphoryliert das GST-Fusionsprotein 1733-2171. Die S1928A-Mutante wird deutlich weniger phosphoryliert als das Wildtyp-Protein, es ist aber noch ein leichtes Phosphorylierungssignal erkennbar, was auf eine weitere Phosphorylierungsstelle im hinteren Bereich des $Ca_v1.2$ -Carboxyterminus hindeutet. Die Phosphorylierung ist jeweils durch PKC-Inhibitor-Peptid hemmbar.

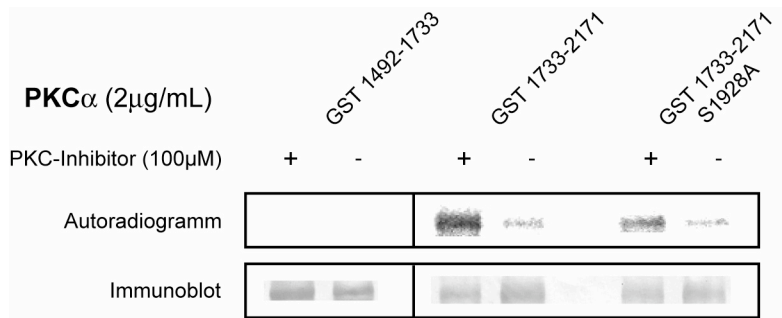


Abbildung 3-3 Phosphorylierung mit PKC α . Das Autoradiogramm zeigt eine Bande für das GST-Fusionsprotein 1733-2171. Das Signal für die S1928A-Mutante ist deutlich geringer. Das GST-Fusionsprotein 1492-1733 wird gar nicht phosphoryliert. Im Immunoblot ist die gleichmäßige Beladung der Membran über anti-GST gezeigt.

3.1.1.3 PKC ϵ

PKC ϵ wird zu den neuen PKCs gezählt (nPKCs). Die Phosphorylierung der GST-Fusionsproteine mit dieser Isoform der PKC führt zu einer Bande für das GST-Fusionsprotein 1733-2171 im Autoradiogramm. Fehlt Serin 1928 in diesem Protein, ist noch ein Phosphorylierungssignal detektierbar, jedoch schwächer als in dem Wildtypprotein. Serin 1928 scheint also unter anderem eine Phosphorylierungsstelle für die PKC ϵ zu sein.

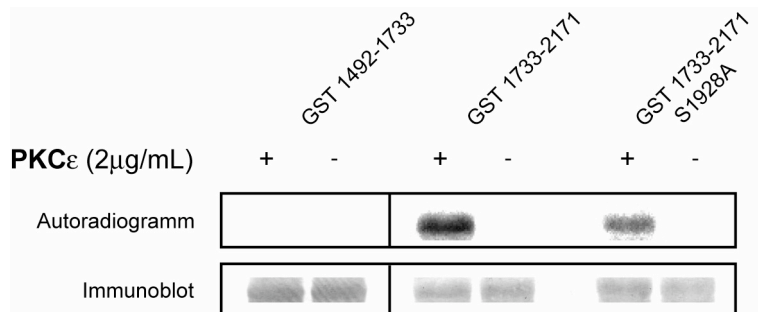


Abbildung 3-4 Phosphorylierung mit PKC ϵ . Das GST-Fusionsprotein 1733-2171 wird phosphoryliert, die S1928A-Mutante etwas weniger stark als das Wildtyp-Protein. Zur Ladekontrolle im Immunoblot diente anti-GST.

3.1.1.4 PKC ζ

Die PKC ζ ist eine atypische Proteinkinase C (aPKC). Sie phosphoryliert das GST-Fusionsprotein 1733-2171. Da noch ein leichtes Signal für die S1928A-Mutante erscheint, wurden die GST-Fusionsproteine 1906-2171 sowie die entsprechende S1928A-Mutante einer Phosphorylierung unterzogen. Es wird nur das Wildtypprotein phosphoryliert, für die Mutante erscheint kein Signal mehr. Die zusätzliche Phosphorylierungsstelle liegt demzufolge zwischen den Aminosäuren 1733 und 1906.

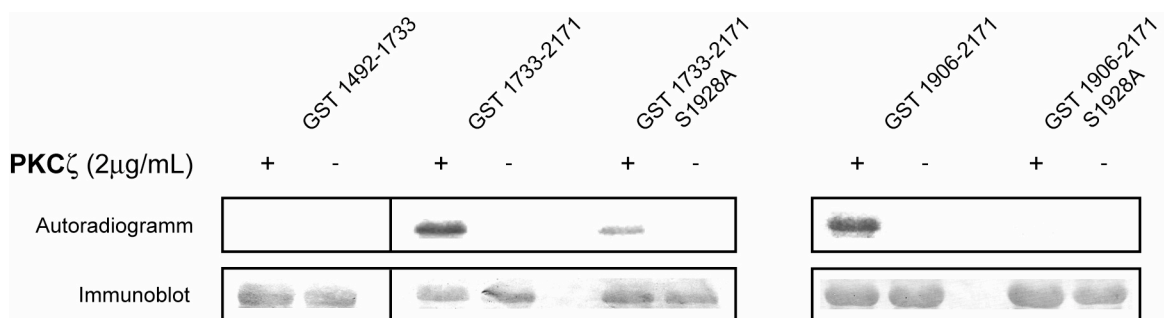


Abbildung 3-5 Phosphorylierung mit PKC ζ . Die GST-Fusionsproteine 1733-2171 sowie 1906-2171 werden phosphoryliert. Von den S1928A-Mutanten erscheint nur für das längere Protein 1733-2171 S1928A ein leichtes Signal. Für die Ladekontrollen wurden die Membranen mit anti-GST inkubiert.

3.1.2 GST-Fusionsproteine Ca $_v$ β_{2a}

Auch die im Herzen dominierende β_{2a} -Untereinheit des L-Typ-Kalziumkanals wird von der PKA phosphoryliert. Drei Serine sind als Phosphorylierungsstellen der PKA identifiziert worden (S460, S479, S480) (Bunemann et al., 1999; Gerhardstein et al., 1999). Um die Phosphorylierung der β_{2a} -Untereinheit durch die PKA zu überprüfen, wurden GST-Fusionsproteine ausgehend von cDNS (Hullin et al., 1992) generiert. Mittels PCR wurden über mutierte Primer Restriktionserkennungssequenzen für BamHI und NotI an das PCR-Produkt angefügt. Über diese Restriktionsschnittstellen wurden die Fragmente in das pGEX-6P-1 Plasmid inkloniert und anschließend sequenziert, um die korrekte Basenabfolge sicherzustellen. Die Mutationen (S460A bzw. S479/480A) wurden jeweils mit einer Overlap-PCR eingeführt. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt. Die GST-Fusionsproteine wurden in BL21-Zellen exprimiert und anschließend wie unter (2.2.8) beschrieben phosphoryliert.

Nach Phosphorylierung mit PKAc ist ein Signal für das Wildtyp-Fusionsprotein im Autoradiogramm zu erkennen (**Abbildung 3-6**). Die GST β_{2a} S479/480A-Mutante zeigt hingegen kaum noch ein Phosphorylierungssignal. Diese beiden Serine stellen also die hauptsächlichen Phosphorylierungsstellen der PKA in der β_{2a} -Untereinheit dar.

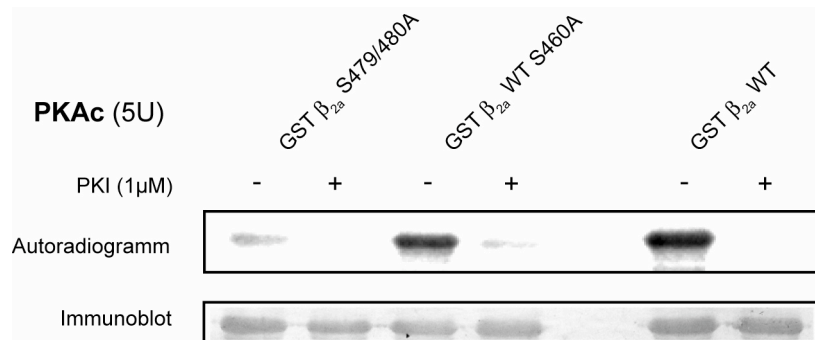


Abbildung 3-6 Phosphorylierung der GST β_{2a}-Untereinheit mit PKAc. Das Wildtyp-Protein wird phosphoryliert, die Phosphorylierung ist durch die Zugabe von PKI hemmbar. Für die S479/480A-Mutante erscheint nur ein leichtes Signal im Autoradiogramm. Der Immunoblot mit anti-GST zeigt die Beladung mit GST-Fusionsprotein.

3.1.3 Co-Immunpräzipitation

Wird eine Membranpräparation aus C57/Bl6-Mäuseherzen mit Ca_v1.2-Antikörper immunpräzipitiert, lässt sich Ca_v1.2 durch Zugabe von PKAc phosphorylieren (**Abbildung 3-7 a**). Die Phosphorylierung ist durch PKI hemmbar. Die Membran wurde nach dem Abklingen der radioaktiven Strahlung im Western-Blot mit Ca_v1.2-Antikörper sowie β₂-Antikörper inkubiert.

Auch durch die Zugabe von cAMP wird Ca_v1.2 phosphoryliert (**Abbildung 3-7 b**), da endogene PKA mit Ca_v1.2 co-immunpräzipitiert (3.4.3.1) und durch cAMP aktiviert werden kann.

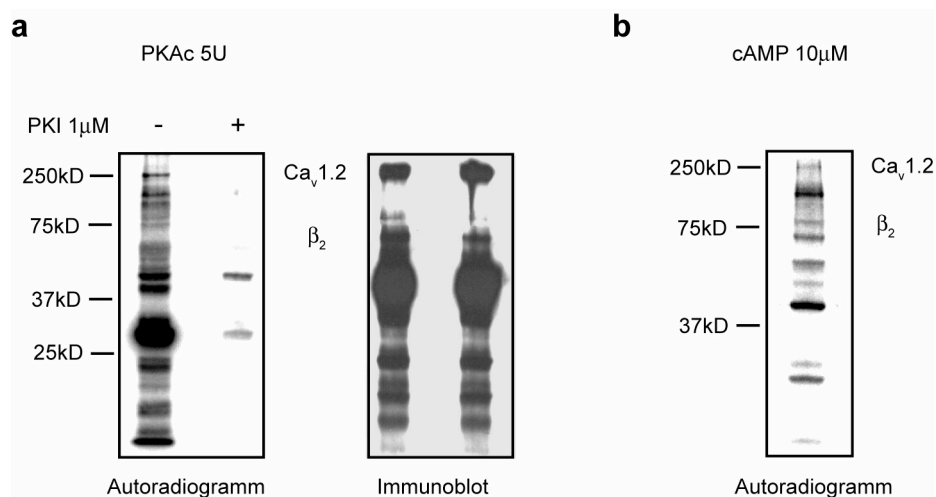


Abbildung 3-7 (a) Phosphorylierung eines Ca_v1.2-Co-Immunpräzipitats mit PKAc. Durch Zugabe von PKI ist die Phosphorylierung hemmbar. Der Immunoblot mit anti-Ca_v1.2 und anti-β₂ zeigt das Vorhandensein und die Laufhöhe der beiden Proteine auf der gleichen Membran. **(b)** Phosphorylierung eines Ca_v1.2-Co-Immunpräzipitats mit endogener PKA durch Zugabe von cAMP.

3.2 Spezifischer Antikörper pS1928

Es wurde ein Antikörper gegen das Peptid NH₂-LGRRApSFHLECLK-COOH von CovalAb angefertigt. Das Serin in diesem Peptid entspricht Serin 1928 in Ca_v1.2. Um die Spezifität des Antikörpers gegen das phosphorylierte Serin zu zeigen, wurden GST-Fusionsproteine mit PKAc phosphoryliert, die Phosphorylierung im Autoradiogramm detektiert und die Membran anschließend mit dem pS1928-Antikörper inkubiert. In **Abbildung 3-8** ist erkenntlich, dass ein Phosphorylierungssignal im Autoradiogramm sowie im Immunoblot nur bei dem GST-Fusionsprotein erscheint, das Serin 1928 trägt und mit PKAc inkubiert wurde (GST 1733-2171). Der Antikörper erkennt keine Bande wenn dieses Protein nicht mit PKAc phosphoryliert wurde und auch die S1928A-Mutante wird von dem Antikörper nicht erkannt. Die Spezifität für pS1928 scheint nach diesen Versuchen gegeben zu sein.

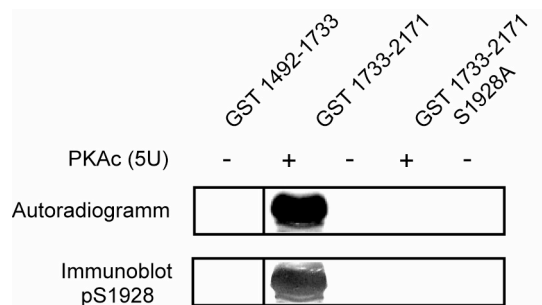


Abbildung 3-8 Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen mit PKAc. Das Autoradiogramm zeigt, dass nur GST 1733-2171 phosphoryliert wird. Die Ansätze ohne PKAc wurden mit 20µL 1xLämmli aufgekocht. Für den Immunoblot wurde mit anti-pS1928 inkubiert, der Antikörper zeigt nur ein Signal bei phosphoryliertem Serin 1928.

3.3 Generierung von Mäusen mit einer Ca_v1.2-S1928A-Mutation

Um die Funktion der S1928-Phosphorylierungsstelle in vivo aufklären zu können, wurde eine Knock-in Mauslinie erzeugt, die an Stelle des Serins 1928 ein Alanin trägt, so dass der Ca_v1.2 an dieser Stelle nicht mehr phosphoryliert werden kann.

Um eine Mauslinie mit der Ca_v1.2 S1928A-Mutation zu etablieren, wurde zunächst ein Targeting-Vektor konstruiert, der dann über Elektroporation in ES-Zellen eingeschleust wurde. Durch homologe Rekombination wurde die Sequenz des Targeting-Vektors in das Genom der ES-Zellen integriert und mittels Blastozysteninjektion eine neue Mauslinie erzeugt. Nur pluripotente ES-Zellen sind in der Lage die Keimbahn zu bilden, deshalb muss bei der Kultivierung der ES-Zellen besonders aufmerksam gearbeitet werden. Die Kulturbedingungen können dem Abschnitt (2.3.1) entnommen werden.

3.3.1 Strategie des Gen-Targetings

Es wurde ein Targeting-Vektor erstellt, der die S1928A-Mutation sowie einen langen homologen Bereich zum Zielgen trägt. Da eine homologe Rekombination nur in einem kleinen Teil der elektroporierten Zellen auftritt, wurde bei der Konstruktion des Targeting-Vektors eine Selektionskassette mit eingebaut, die sowohl eine Positivselektion über ein Neomycinresistenzgen als auch eine Negativselektion über ein Thymidinkinasegen erlaubt. Die Negativselektion ist bedeutend für das sekundäre ES-Zell-Targeting, bei dem die Selektionskassette aus dem Genom der ES-Zellen entfernt wird. Einen Überblick über die Targeting-Strategie gibt **Abbildung 3-9**.

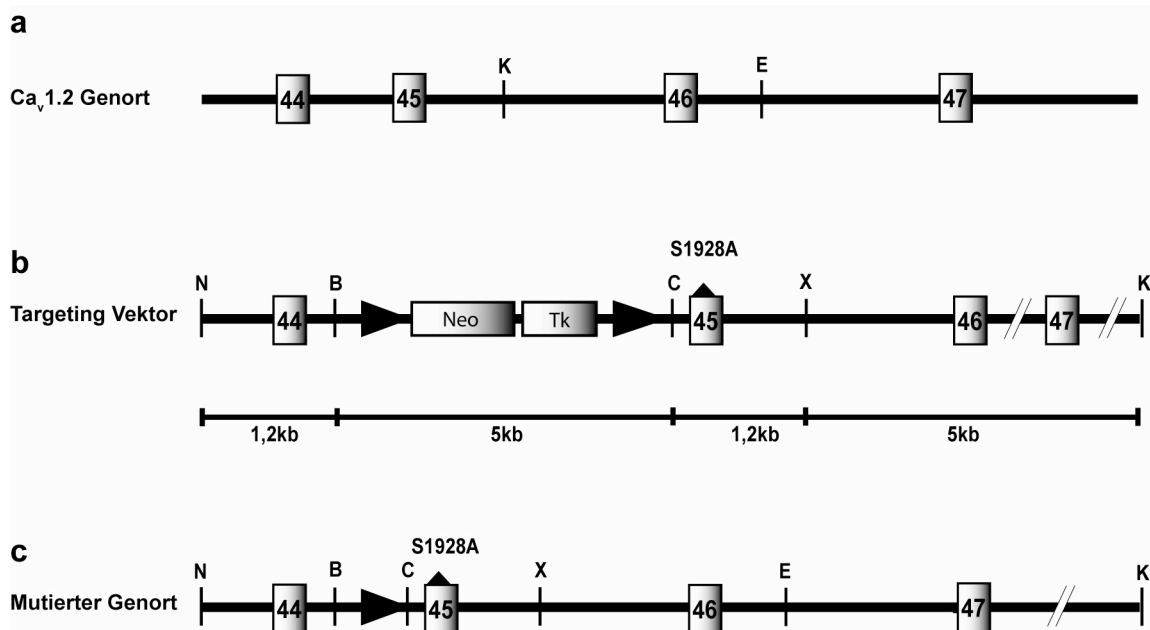


Abbildung 3-9 Strategie des Gen-Targetings (a) Wildtyp $Ca_v1.2$ Genort mit Exonen 44-47 (b) Targeting-Vektor mit S1928A-Mutation im Exon 45 und gefloxter Selektionskassette (c) Mutierter Genort nach homologer Rekombination und Cre-Vermittelter Rekombination. Kästchen: Exone 44-47; Schwarze Dreiecke: loxP-Sequenzen; NeoTk: Selektionskassette mit Neomycinresistenzgen und Thymidinkinasegen; K: KpnI; E: EcoRV; N: NotI; B: BamHI; C: Clal; X: XhoI

3.3.2 Intronanalyse

Um den Targeting-Vektor zu generieren, wurden einzelne Teilstücke mittels PCR aus genomischer ES-Zell-DNS amplifiziert. Diese DNS wurde aus der gleichen Zelllinie gewonnen, die auch später für die homologe Rekombination verwendet wurde. Als Sequenzvorlage diente die Ensembl Gene ID „ENSMUSG00000051331“. Zur Überprüfung dieser Sequenz wurde zunächst eine Intronanalyse des für den Targeting-Vektor relevanten Bereichs mit genomischer ES-Zell-DNS durchgeführt. Dazu wurden DNS-Fragmente von einem Exon zum nächsten amplifiziert (Exone 42-47) und mit jeweils zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Das durch die Re-

striktionsanalyse erhaltene Bandenmuster stimmte mit den errechneten Größen aus der Ensembl Gene ID überein (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Konstruktion des Targeting-Vektors

Der Targeting-Vektor wurde in mehreren Teilschritten zusammengebaut. Die einzelnen Fragmente wurden mittels PCR aus genomischer ES-Zell-DNS amplifiziert. Über mutierte Primer wurden Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingefügt, so dass die Stücke zunächst in das pBluescript II KS Plasmid subkloniert und später als Targeting-Vektor zusammengesetzt werden konnten. Mit einer Sequenzanalyse wurde die korrekte Basenabfolge der subklonierten DNS-Stücke überprüft um zufällige Mutationen, die bei der PCR entstanden sein könnten, auszuschließen. Bei der Sequenzanalyse zeigte sich, dass der intronische Bereich zwischen Exon 45 und Exon 46 nicht mit der Sequenz der Ensembl Gene ID übereinstimmte (Vergleich der Sequenzen siehe Anhang). Zur Klärung dieser Unstimmigkeiten wurde eine Sequenzanalyse von genomischer DNS aus 129/Sv-Mäusen durchgeführt. Auch hier ergab sich die abweichende Sequenz. Die ES-Zellen stammen aus 129/Sv-Mäusen, die Sequenz der Datenbank wurde anhand von DNS aus C57/Bl6-Mäusen erstellt. Die Unterschiede in der intronischen Sequenz zwischen Exon 45 und 46 ergeben sich also wahrscheinlich aus Unterschieden der beiden Mauslinien.

Die S1928A-Mutation wurde mit Hilfe einer Overlap-PCR generiert, wobei über mutierte Primer das Basentriplett TCC in GCC umgewandelt wurde. Außerdem wurde mit mutierten Primern eine KpnI-Schnittstelle im 3'-Arm durch eine XhoI-Schnittstelle ersetzt (GGTACC zu CTCGAG; Primer siehe Anhang).

Da der 3'-Arm sehr lang ist (6,2kb), wurde er in drei Teilstücken amplifiziert. Das vordere, Exon 45 und somit die Mutation umfassende 1,2kb große Stück, wurde direkt hinter der geflochtenen Selektionskassette über die Schnittstellen ClaI und XhoI in das pBSloxPneoTKloxP-Plasmid inkloniert.

Für den hinteren Teil des 3'-Arms wurden zwei überlappende PCR-Produkte amplifiziert. An das vordere Stück wurde am 5'-Ende eine XbaI sowie gleich dahinter eine XhoI-Schnittstelle angefügt. Das 3'-Ende wurde mit einer KpnI-Schnittstelle versehen. So konnte es zunächst über XbaI und KpnI in das pBluescript II KS Plasmid subkloniert werden. An das mit diesem Fragment überlappende Teilstück wurde am 5'-Ende eine XbaI, am 3'-Ende eine KpnI-Schnittstelle angefügt, so dass auch dieses Stück über XbaI und KpnI subkloniert werden konnte. Über eine gemeinsame EcoRV-Schnittstelle im überlappenden Bereich wurden die Teilstücke zusammenge-

fügt und der nun 5kb große hintere 3'-Arm mit den Exonen 46 und 47 über die Schnittstellen XhoI und KpnI an den vorderen Teil des 3'-Arm angefügt.

Zuletzt wurde der 1,2kb große, Exon 44 umspannende 5'-Arm über die Schnittstellen NotI und BamHI vor die Selektionskassette inkloniert.

Der fertige Targeting-Vektor war, das pBluescript II KS Plasmid mitgerechnet, 15,4kb lang. Durch Restriktionsanalyse und erneute Sequenzierung des Vektors wurde nochmals die korrekte Basenabfolge sichergestellt.

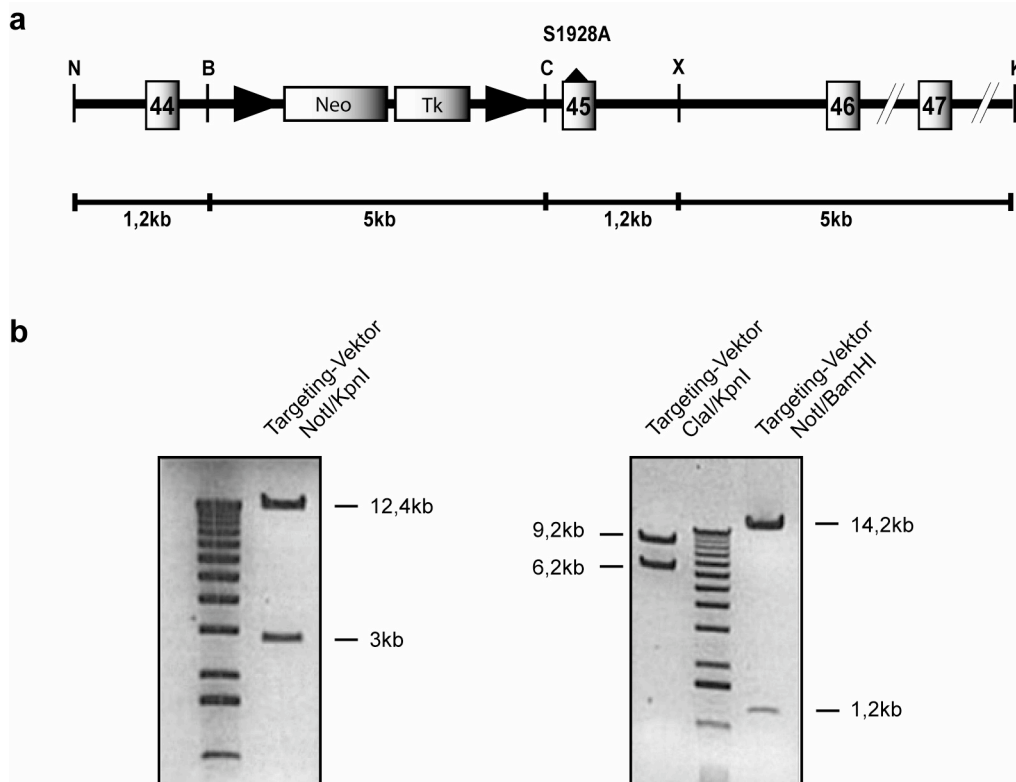


Abbildung 3-10 (a) Schematische Darstellung des Targeting-Vektors mit den durch mutierte Primer eingefügten Schnittstellen. N: NotI; B: BamHI; C: ClaI; X: XhoI; K: KpnI **(b)** Restriktionsanalyse des Targeting-Vektors. Es wurde mit jeweils zwei Restriktionsenzymen geschnitten. Der Restriktionsverdau mit NotI und KpnI schneidet den gesamten Targeting-Vektor aus dem pBluescript II KS Plasmid aus (mit der Selektionskassette). Die Kombination aus ClaI und KpnI schneidet den 3'-Arm aus und mit NotI und BamHI wird der 5'-Arm ausgeschnitten.

3.3.4 Funktionsüberprüfung der loxP-Sequenzen

Um auszuschließen, dass die loxP-Sequenzen im Targeting-Vektor trotz Sequenzanalyse fehlerhaft sind, wurde eine Funktionsüberprüfung der Cre-vermittelten Rekombination *in vitro* durchgeführt. Der Targeting-Vektor wurde mit Cre-Rekombinase inkubiert und eine 3-Primer-PCR sowohl mit diesem Ansatz als auch mit unbehandeltem Targeting-Vektor durchgeführt. Ohne Rekombinationsereignis bindet einer der Primer in der Selektionskassette, es entsteht ein 260b großes Amplifikat. Durch

Cre-vermittelte Rekombination fällt die Selektionskassette und eine loxP-Sequenz weg und es entsteht ein 535b großes PCR-Produkt. Wie in **Abbildung 3-11** erkennbar ist, entstand in dem mit Cre-Rekombinase behandelten Ansatz eine 535b große Bande, die Funktionalität der loxP-Sequenzen war also gegeben. Da die Cre-Rekombinase auch die Rückreaktion vermittelt, ist die Bande bei 260b noch vorhanden.

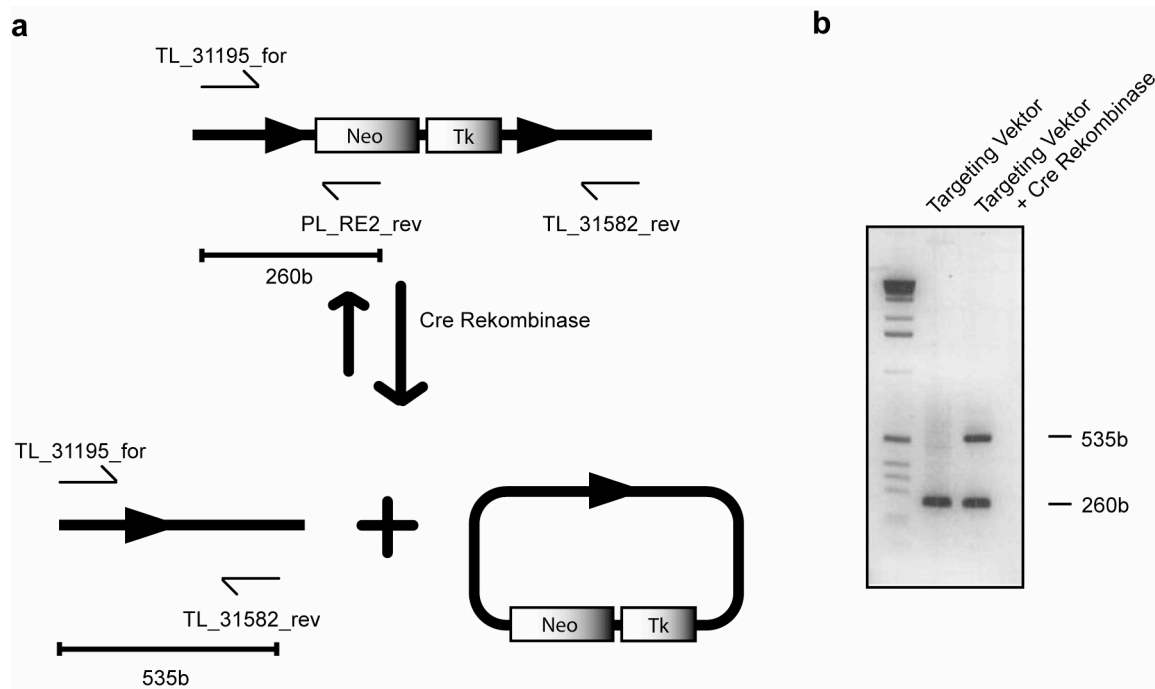


Abbildung 3-11 (a) PCR-Strategie zur Funktionsüberprüfung der Cre-vermittelten Rekombination mit den drei verwendeten Primern. Zwei gleichgerichtete loxP-Sequenzen flankieren den zu deletierenden Bereich, eine davon verbleibt nach Rekombination am Genort, die andere wird zusammen mit der dazwischenliegenden Sequenz entfernt **(b)** Bei mit Cre-Rekombinase behandelten Targeting-Vektor zeigt sich eine zusätzliche Bande bei 535b.

3.3.5 Primäres ES-Zell-Targeting

Das Primäre ES-Zell-Targeting wurde zweimal mit dem gleichen Targeting-Vektor durchgeführt, wobei Stammzellen der 14. bzw. 11. Passage verwendet wurden. Drei Tage und eine Passage nach dem Aussäen waren die Zellen dicht genug gewachsen, um elektroporiert werden zu können. Für die Elektroporation wurden 50 bzw. 35µg linearisierter Targeting-Vektor eingesetzt, die Zeitkonstante bei der Elektroporation betrug 6,3 bzw. 6,4ms. Nach 24h wurden die auf jeweils 12 Petrischalen aufgeteilten Zellen erstmals G418-haltigem Selektionsmedium ausgesetzt. Vier Tage darauf begannen die Zellen massiv abzusterben, das Medium wurde ab diesem Zeitpunkt zweimal täglich gewechselt. Am 9. Tag nach der Elektroporation wurden die

ersten Zellklone isoliert. Es wurden nur Klone gepickt, bei denen eine klare Umrandung gut zu erkennen war, Klone mit ausgefransten Rändern wurden nicht isoliert. Im Verlauf von neun bzw. vier Tagen wurden 362 bzw. 872 Klone isoliert. Die A-Platten wurden bei einer Konfluenz von 70% als Gefrierstocks bei -80°C gelagert. Die übrigen Platten wurden bei vollständiger Konfluenz bei -20°C gelagert oder die Zellen sofort lysiert um eine DNS-Analyse durchführen zu können.

3.3.6 Screening

Das Screening dient zur Identifikation von ES-Zellklonen, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat. Durch den Einsatz von G418-haltigem Selektionsmedium können nur solche Klone überleben, die einen Teil des Targeting-Vektors (die Selektionskassette mit dem Neomycinresistenzgen) in das Genom übernommen haben. Dies kann durch homologe Rekombination geschehen, der Targeting-Vektor kann aber auch zufällig an einer beliebigen Stelle in das Genom integrieren. Deshalb müssen alle isolierten Zellklone nicht nur auf das Vorhandensein des veränderten Genabschnitts untersucht werden, es muss auch überprüft werden, ob die Integration an der richtigen Stelle stattgefunden hat.

3.3.6.1 5'-Sonde

Die 0,4kb große 5'-Sonde wurde mittels PCR aus genomischer DNS amplifiziert. Über die durch die PCR angefügten Restriktionserkennungssequenzen NotI und BamHI konnte die Sonde im pBluescript II KS Plasmid subkloniert werden.

Alle 1234 isolierten Zellklone wurden zunächst mit der 5'-Sonde untersucht. Die DNS wurde mittels Restriktionsverdau mit PstI, Agarosegelelektrophorese und Southern-Blot-Hybridisierung, wie unter (2.1.18) beschrieben, analysiert. Es wurden große Agarosegele verwendet (500mL), so dass die DNS aus einer ganzen 96well-Platte auf ein Gel aufgetragen werden konnte. Die 5'-Sonde detektiert im Wildtyp ein 2,5kb großes DNS-Fragment. Durch eine zusätzliche Schnittstelle für PstI wird das durch die Sonde erkannte Fragment nach homologer Rekombination auf 1,5kb verkürzt. Da homologe Rekombination nur bei einem Allel auftritt, ist stets auch das Wildtyp-Allel vorhanden. Nach erfolgreicher Rekombination sollte also zusätzlich zur Wildtyp Bande auch die kleinere Bande des mutierten Allels zu erkennen sein. Auf dem beispielhaft gezeigtem Blot in **Abbildung 3-12** sind zwei negative Klone mit nur einer Bande bei 2,5kb gezeigt, die mittlere Spur zeigt einen positiven Klon mit der zusätzlichen

Bande bei 1,5kb. Diese zusätzliche Bande wurde bei insgesamt 14 der 1234 analysierten Klone detektiert.

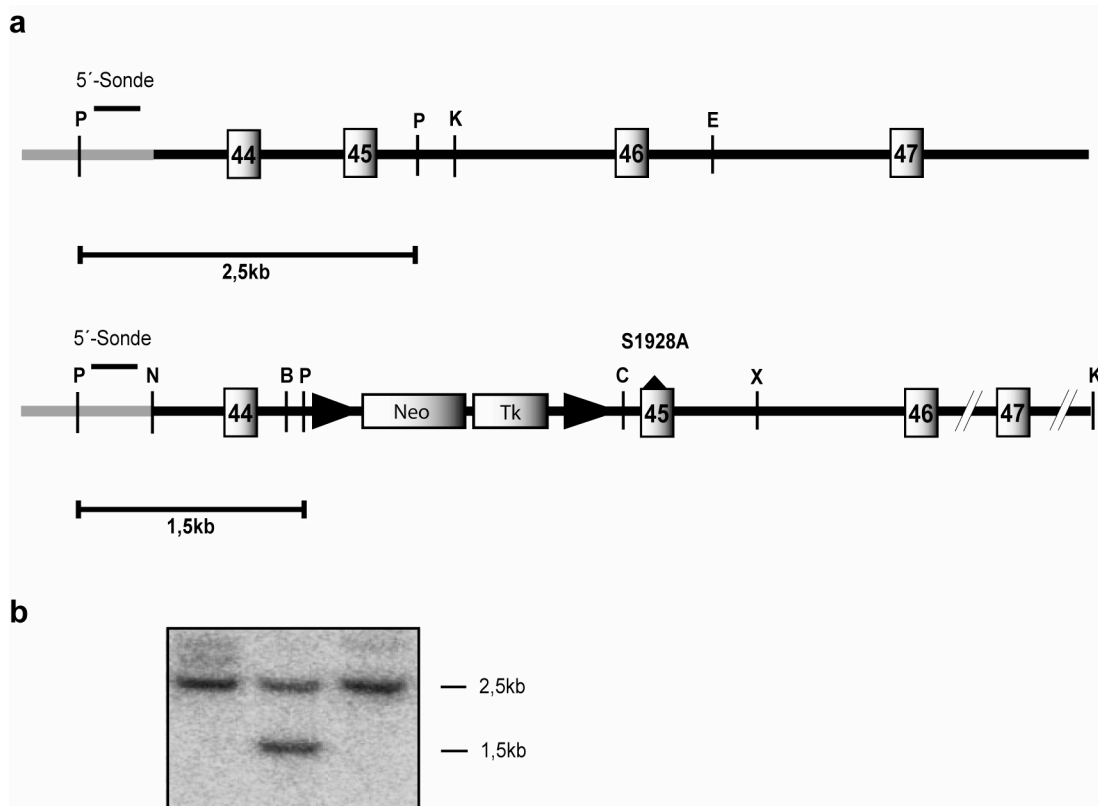


Abbildung 3-12 (a) 5'-Southern Strategie. Im Wildtyp (oben) erkennt die 5'-Sonde ein 2,5kb großes DNS-Fragment wenn mit PstI geschnitten wurde, nach erfolgter homologer Rekombination (unten) ist das DNS-Fragment durch eine zusätzliche PstI-Schnittstelle nur 1,5kb lang **(b)** Positiver Klon (mittlere Spur) mit der charakteristischen Doppelbande, umgeben von zwei negativen Klonen. P: PstI; N: NotI; B: BamHI; C: ClaI; X: XhoI; K: KpnI; grauer Abschnitt links: Bereich außerhalb des Targeting-Vektors

3.3.6.2 Neo-Sonde

Um auszuschließen, dass der Targeting-Vektor mehrfach ins Genom integriert hat, wurden die positiven Klone der 5'-Sonde zusätzlich mit einer Neo-Sonde hybridisiert. Die ES-Zell-DNS wurde einem Restriktionsverdau mit XbaI unterzogen. Das von der Neo-Sonde erkannte Fragment hatte eine Größe von 4kb und wurde bei nur einmaliger Integration als einzige Bande auf dem Blot sichtbar. In **Abbildung 3-13** ist die Analyse der beiden für das sekundäre Targeting verwendeten Klone gezeigt.

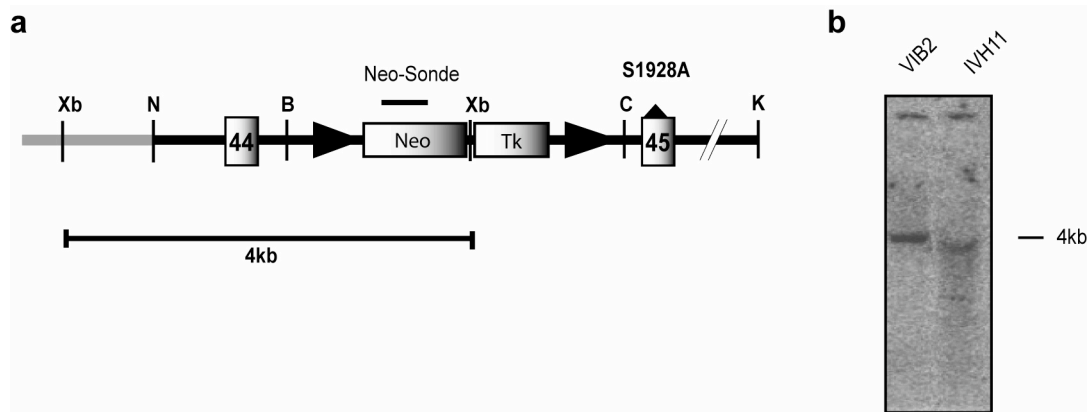


Abbildung 3-13 (a) Neo-Southern Strategie. Wird die ES-Zell-DNS mit XbaI geschnitten detektiert die Neo-Sonde ein 4kb großes DNS-Fragment **(b)** Die beiden für das sekundäre Targeting verwendeten ES-Zellklone zeigen nur die erwartete 4kb große Bande. Xb: XbaI; N: NotI; B: BamHI; C: ClaI; X: XhoI; K: KpnI; grauer Abschnitt links: Bereich außerhalb des Targeting-Vektors

3.3.6.3 PCR

Mit einem PCR-Screening wurde nochmals die homologe Rekombination bestätigt. Es wurde ein Primerpaar gewählt, bei dem der vorwärtsgerichtete Primer außerhalb des Targeting-Vektors bindet und der rückwärtsgerichtete Primer in der Neo-Kassette liegt. Auf diese Weise erhält man nur bei homologer Rekombination eine Bande bei 1,8kb, ist das Konstrukt an einer anderen Stelle zufällig ins Genom integriert, kann durch diese Primerpaarung kein PCR-Produkt entstehen.

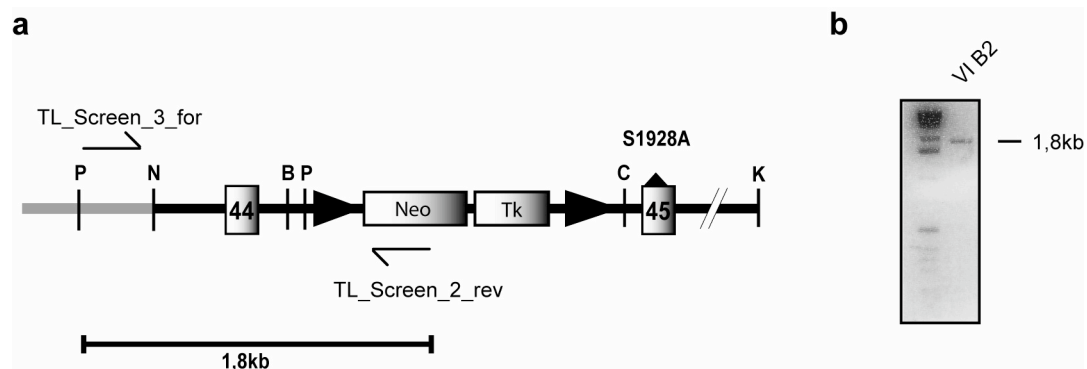


Abbildung 3-14 (a) PCR-Screening Strategie. Mit den Primern TL_Screen_3_for und TL_Screen_2_rev kann nur bei korrekter Integration des Konstrukts in das Genom ein 1,8kb großes DNS-Stück amplifiziert werden. **(b)** Beispielhaft gezeigt ist das PCR-Produkt von Klon VIB2.

3.3.6.4 Sequenzierung

Zur Überprüfung der S1928A-Mutation wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt. Mit einem Primerpaar wurde ein DNS-Stück amplifiziert, das sowohl das komplette Exon 45 beinhaltet, als auch die 3'-wärts gelegene KpnI-Schnittstelle. Diese Schnittstelle ist im Targeting-Vektor durch eine XhoI-Schnittstelle ersetzt, wodurch eine Unter-

scheidung des mutierten Allels vom Wildtyp-Allel möglich wird. Das 1,3kb große PCR-Produkt wurde in getrennten Ansätzen mit beiden Restriktionsenzymen geschnitten, wodurch ein 1kb großes Fragment entstand. Dieses Fragment wurde über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzanalyse der positiven Klone zeigte, dass die S1928A-Mutation in dem mit XhoI geschnittenem Fragment vorhanden war, das mit KpnI geschnittene DNS-Stück zeigte das Wildtyp-Signal.

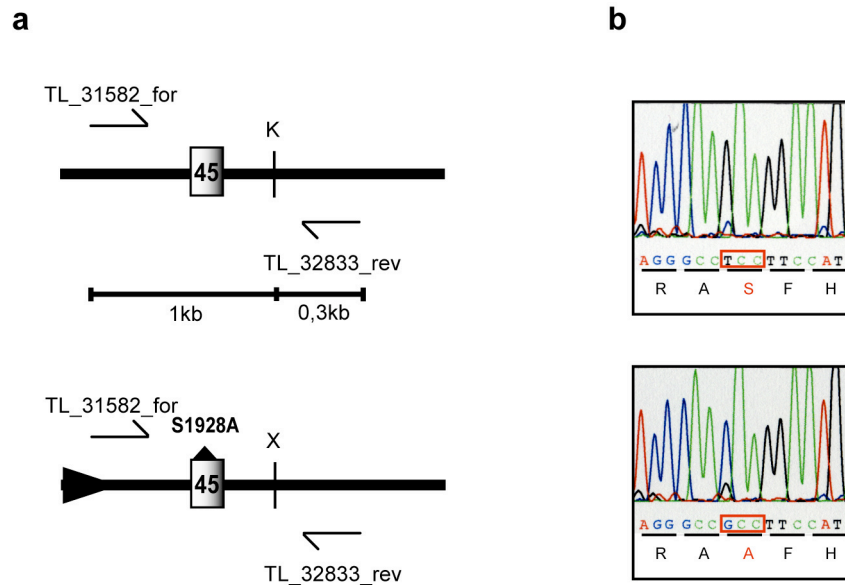


Abbildung 3-15 (a) Strategie zur Trennung von Wildtyp- und mutiertem Allel. Das Wildtyp-Fragment kann mit KpnI geschnitten werden (oben), das mutierte Allel mit XhoI (unten) **(b)** Sequenz der mit dem jeweiligen Enzym verdauten PCR-Produkte (oben KpnI, unten XhoI). K: KpnI; X: XhoI

3.3.7 Sekundäres ES-Zell-Targeting

In einem sekundären ES-Zell-Targeting wurde die Selektionskassette durch Cre-vermittelte Rekombination aus dem ES-Zell-Genom entfernt. Es wurden zwei Klone für das sekundäre Targeting ausgewählt (Klon VIB2, 18. Passage und IVH11, 15. Passage), von den anderen positiven Klonen wurden Gefrierstocks angelegt. Nach fünfmaligem Passagieren war eine ausreichende Zellzahl für die Elektroporation mit dem Cre-exprimierendem Plasmid pIC-Cre vorhanden, so dass sich die ES-Zellklone zum Zeitpunkt der Elektroporation in der 23. bzw. 20. Passage befanden. Es wurden jeweils 40 µg pIC-Cre-Plasmid aufgereinigt und für die Elektroporation verwendet. Die Zellen wurden in verschiedenen Dichten ausgesät und dem Medium nach 48 bzw. 72h Ganciclovir als Selektionszusatz zugegeben (2.3.3.4). Ganciclovir ist für solche Zellen toxisch, die das Thymidinkinasegen tragen, bei denen also kein Cre-

vermitteltes Rekombinationsereignis stattgefunden hat und die Selektions-kassette noch vorhanden ist. Neun Tage nach der Elektroporation konnten einzelne Zellklone isoliert werden. Im Verlauf von jeweils vier Tagen wurden 75 Klone (Primärklon VIB2) und 116 Klone (Primärklon IVH11) isoliert. Die A-Platten wurden bei einer Konfluenz von 70% als Gefrierstocks bei -80°C gelagert (2.3.1.6). Die übrigen Platten wurden bei vollständiger Konfluenz bei -20°C gelagert oder die Zellen sofort lysiert (2.3.2.6), um eine DNS-Analyse durchführen zu können.

3.3.8 Screening mit PCR

Die Analyse der isolierten ES-Zellklone vom sekundären Targeting erfolgte mittels einer 3-Primer-PCR, die Primer entsprachen denen unter (3.3.4). Auf dem Wildtyp-Allel binden nur die beiden äußeren Primer, was zu einem 430b großen PCR-Produkt führt. Bei nicht erfolgter Rekombination bindet ein zusätzlicher rückläufiger Primer in der Neo-Kassette und es entsteht ein 260b großes DNS-Amplifikat. Nach erfolgter Rekombination hingegen kann dieser Primer nicht mehr binden, sondern wiederum nur die beiden außengelegenen Primer. Dieses PCR-Produkt ist mit 535b etwas länger als das Produkt des Wildtyp-Allels, da es noch eine loxP-Sequenz und kleine Teile des Targeting-Vektors, wie Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, enthält. Ein positiver Klon ist somit an einer Doppelbande bei 430b und 535b erkenntlich. Alle isolierten Klone zeigten dieses Bandenmuster.

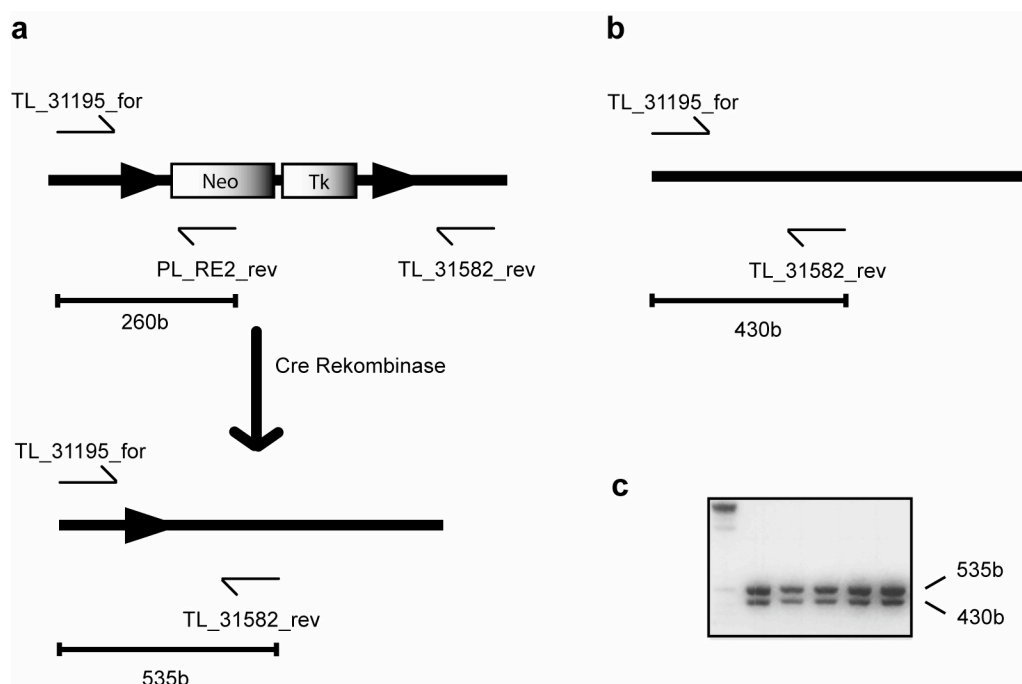


Abbildung 3-16 (a) Mutiertes Allel vor und nach Cre-vermittelter Rekombination (b) Wildtyp-Allel (c) Positive Klone des Sekundären Targetings mit der Bande für das Wildtyp-Allel sowie der Bande nach Cre-vermittelter Rekombination.

3.3.9 Blastozysten-Injektion

Es wurden fünf ES-Zellklone des sekundären Targetings in Blastozysten injiziert. Die genaue Anzahl der Blastozysten, der Nachkommen und Chimären kann **Tabelle 3-A** entnommen werden.

Tabelle 3-A Übersicht über die injizierten Zellklone, Nachkommen und Chimären

Primärer ES-Zellklon	Sekundärer ES-Zellklon	Injizierte Blastozysten	Nachkommen	Chimären
VIB2	1A	51	9	1 (>90%)
VIB2	3A	19	0	0
VIB2	1B	21	0	0
IVH11	5E	47	4	1 (>90%)
IVH11	4E	28	2	1 (>90%)

Aus den Blastozysteninjektionen und Reimplantationen in CD1-Ammenmütter gingen insgesamt drei männliche Chimären hervor. Die Chimäre aus Klon 5E starb im Alter von zwei Wochen, wahrscheinlich an Mangelernährung. Die anderen beiden Chimären wurden mit C57/Bl6-Weibchen verpaart, wobei sich nur eines der Männchen als fertil erwies. Die Nachkommen der Chimäre aus Klon 4E (L5594) waren alle agouti-farben und wurden genotypisiert. Die heterozygoten Nachkommen wurden untereinander verpaart, um Mäuse zu erhalten, die homozygot für die S1928A-Mutation sind.

a



b



Abbildung 3-17 (a) Wurf der CD1-Ammenmutter (weiß) mit Chimäre L5594 (braun) **(b)** Wurf aus einer Verpaarung von Chimäre L5594 mit einem C57/Bl6-Weibchen (schwarz). Die Nachkommen sind alle agouti-farben (braun). Da agouti dominant über schwarz vererbt wird, müssen die braunen Nachkommen ein Allel aus dem ES-Zell-Genom tragen, entweder das Wildtyp- oder das mutierte Allel.

3.4 Untersuchung der Mäuse

Untersucht wurden Tiere der F2-Generation aus Verpaarungen heterozygoter Mäuse. Als Kontrolltiere dienten die aus diesen Verpaarungen hervorgegangenen Wildtypen.

Die homozygoten S1928A-Mäuse zeigen keine augenscheinlichen Auffälligkeiten und sind nicht von den Kontrolltieren zu unterscheiden.

3.4.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte mit den gleichen Primern, die schon bei der Funktionsüberprüfung der loxP-Sequenzen und dem Screening nach dem sekundären Targeting zum Einsatz kamen (3.3.4). Das Wildtyp-Allel ergibt eine 430b große Bande, die Bande des mutierten Allels ist durch die zusätzliche loxP-Sequenz 535b groß (siehe 3.3.8). **Abbildung 3-18 a** zeigt das typische Bandenmuster der verschiedenen Genotypen. Die direkten Nachkommen der Chimäre waren alle agouti-farben und wurden somit alle genotypisiert. Es zeigte sich, dass der einen Hälfte dieser Nachkommen das Wildtyp-Allel, der anderen Hälfte das mutierte Allel vererbt wurde.

Mit einer Sequenzanalyse wurde überprüft, ob die S1928A-Mutation tatsächlich im Genom der neuen Mauslinie vorhanden ist. Es wurden homozygote Mäuse untersucht, eine Trennung der beiden Allele war deshalb nicht erforderlich. Die PCR-Reaktion entsprach der in (3.3.6.4) beschriebenen. Die Sequenzanalyse ließ erkennen, dass die S1928A-Mutation auf beiden Allelen der homozygoten Mäuse vorhanden war (**Abbildung 3-18 b**).

Die durch die Genotypisierungs-PCR bestimmten Genotypen wurden stichprobenartig mit einer Southern-Blot-Analyse bestätigt (**Abbildung 3-18 c**). Das Vorgehen und erwartete Bandenmuster entsprach dabei dem Screening der ES-Zellen mit der 5'-Sonde nach dem ersten Targeting (3.3.6.1).

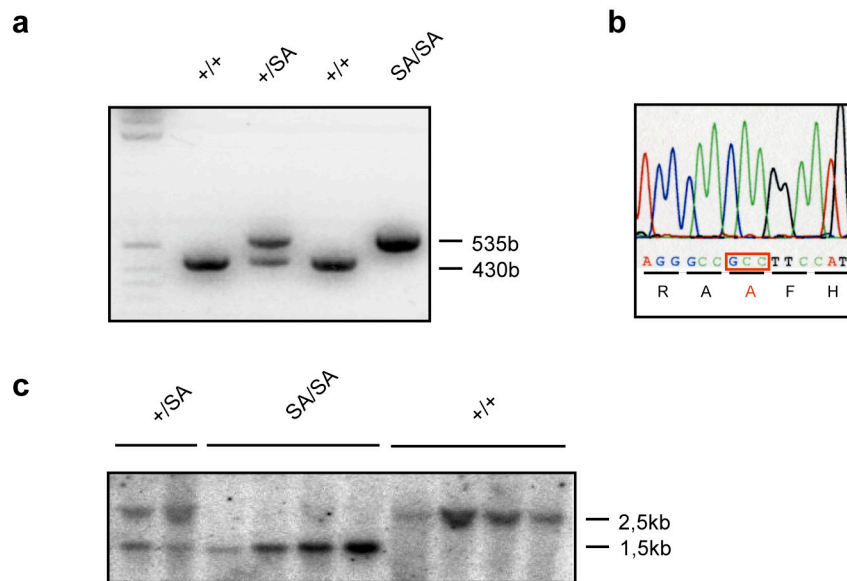


Abbildung 3-18 (a) Genotypisierungs-PCR **(b)** Sequenz einer für die S1928A-Mutation homozygoten Maus **(c)** Southern-Blot aus Maus-DNS verschiedener Genotypen, geschnitten mit PstI und mit der 5'-Sonde hybridisiert. +/+ : Wildtyp; +/- : heterozygot S1928A; SA/SA : homozygot S1928A

3.4.2 Geburtsstatistik

Es wurde eine Statistik aller heterozygoten Verpaarungen erstellt, die zeigen soll, ob die S1928A-Mutation nach dem Mendelschen Verhältnis vererbt wird. In diesem Fall wäre das Verhältnis Heterozygot:Wildtyp:Homozygot 50:25:25. Die Auswertung aller bisherigen Würfe zeigt eine Abweichung von diesem Verhältnis zu Ungunsten der homozygoten Nachkommen. Die Anwendung des Chi-Quadrat-Testes zeigt die Signifikanz dieses Unterschiedes ($\chi^2 = 6,1$; $P < 0,05$).

Tabelle 3-B Übersicht über alle durchgeführten Verpaarungen heterozygoter S1928A-Mäuse

	Nachkommen insgesamt	Heterozygot	Wildtyp	Homozygot
Anzahl	710	360	198	152
Prozent		50,7	27,9	21,4

3.4.3 Proteinanalyse

Ob durch die S1928A-Mutation und die loxP-Sequenz das Expressionsprofil von Ca_v1.2 und anderer in den PKA-Signalweg verwickelten Proteine verändert wird wurde durch Western-Blots überprüft.

3.4.3.1 Herz

Im Herz wurden Vorhöfe sowie Ventrikel auf β_1 -Adrenozeptoren und verschiedene Untereinheiten der PKA untersucht (PKAc, RII α , RII β). Es zeigte sich keine Veränderung im Expressionsmuster (**Abbildung 3-19 a**).

Mittels Co-Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass der Komplex von Ca_v1.2 mit PKAc, RII α und RII β durch die S1928A-Mutation nicht beeinflusst wurde. Die Co-Immunpräzipitate wurden aus Herz-Membranpräparationen mit Ca_v1.2-Antikörper gefällt, elektrophoretisch aufgetrennt und mit den entsprechenden Antikörpern im Western-Blot untersucht (**Abbildung 3-19 b**).

Auf den Einbau des Kalziumkanals in die Membran scheint die eingebrachte Genveränderung keinen Einfluss zu haben, **Abbildung 3-19 c** zeigt den Vergleich einer Membranpräparation aus Kontroll- bzw. homozygoten S1928A-Herzen. Es ist kein augenscheinlicher Unterschied in der Ca_v1.2-Expression zu erkennen. Als Ladekontrolle diente β_1 -Adrenozeptor, aufgetragen ist jeweils 65 μ g Protein.

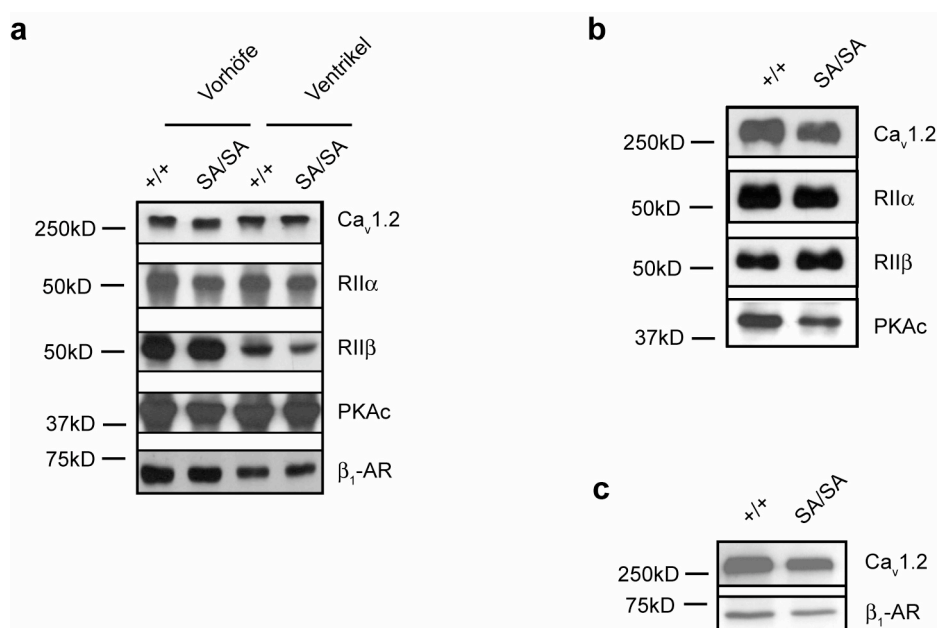


Abbildung 3-19 (a) Western-Blot mit Gesamtprotein aus Vorhöfen bzw. Ventrikeln (b) Co-Immunpräzipitation aus Herzen (c) Membranpräparation aus Herz, jeweils 65 μ g Protein aufgetragen.

3.4.3.2 Hirn

In einzelnen Gehirnteilen (Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Rest) zeigte sich keine veränderte Expression von Ca_v1.2 **Abbildung 3-20 a**. Der Komplex von Ca_v1.2 mit PKAc, RII α und RII β ist auch im Hirn noch vorhanden, wie in **Abbildung 3-20 b** zu erkennen ist. Auch in der Membranpräparation aus Gesamthirn zeigte sich kein Un-

terschied der $Ca_v1.2$ Expression zwischen Kontroll- und S1928A-Tieren (**Abbildung 3-20 c**). Es sind jeweils 50 μ g Protein aufgetragen, als Ladekontrolle diente MAPK.

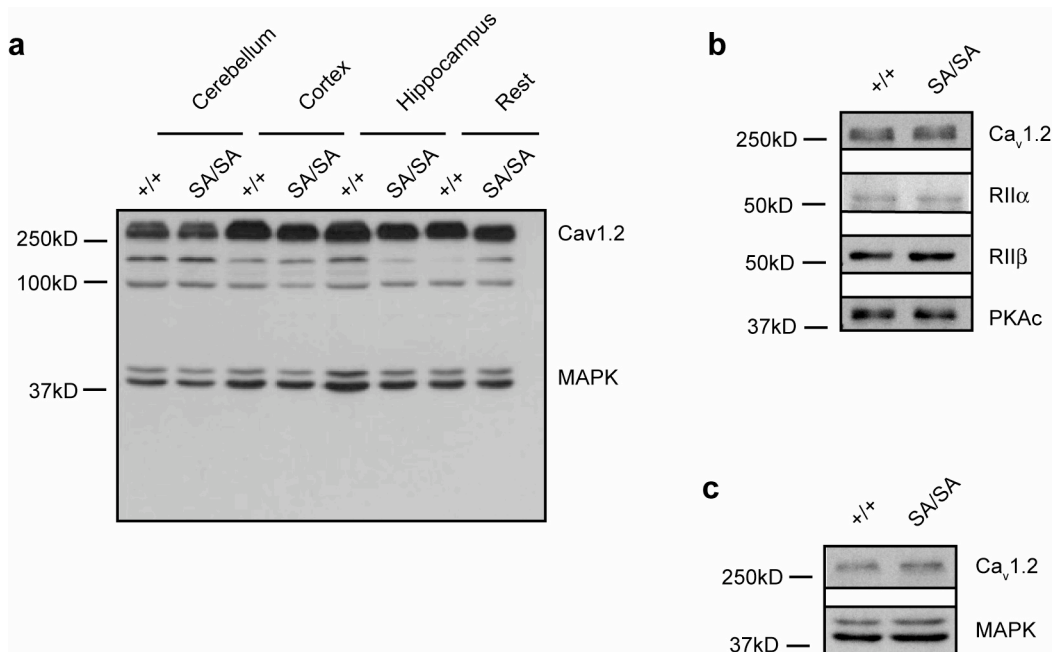


Abbildung 3-20 (a) Western-Blot mit Hirngewebe aus Kontrolltieren (+/+) bzw. homozygoten S1928A Tieren (SA/SA). Als Ladekontrolle diente MAPK (b) Co-Immunpräzipitation aus Gesamthirn (c) Membranpräparation aus Hirn, jeweils 50 μ g Protein aufgetragen.

3.4.4 Phosphorylierung

Mit einem phosphospezifischem Antikörper gegen S1928 konnte in homozygoten S1928A-Mäusen kein Signal festgestellt werden. Die Spezifität des Antikörpers wurde in **Abbildung 3-8** in Abschnitt 3.2 gezeigt. Es wurden Membranpräparationen aus Herzen von Kontrolltieren bzw. homozygoten S1928A-Tieren im Western-Blot mit dem pS1928-Antikörper analysiert. Es zeigte sich nur eine Bande in der Präparation aus Kontrollherzen (**Abbildung 3-21**), jedoch kein Signal bei der S1928A-Mutante. Der $Ca_v1.2$ -Antikörper zeigte gleiche Expression von $Ca_v1.2$ in beiden Präparationen.

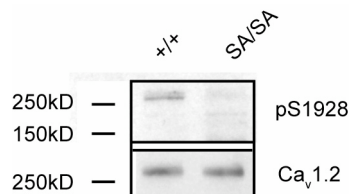


Abbildung 3-21 Western-Blot mit Membranpräparationen aus Kontroll- (+/+) bzw. S1928A homozygoten Herzen. Nur in der Kontrolle ist eine Phosphorylierung mit dem pS1928 Antikörper detektierbar.

Mit dem pS1928-Antikörper wurde gezeigt, dass in Kontrolltieren eine Grundphosphorylierung des $Ca_v1.2$ am S1928 vorliegt, die in den homozygoten

S1928A-Mäusen nicht vorhanden ist. Um nun zu überprüfen ob $\text{Ca}_v1.2$ an einer anderen Stelle von der PKA phosphoryliert wird, wurde eine Co-Immunpräzipitation aus Herzgewebe von homozygoten S1928A-Mäusen sowie Kontrolltieren durch die endogene, also am $\text{Ca}_v1.2$ -Komplex haftende PKA, phosphoryliert. Dass dieser Komplex sowohl in den Kontrolltieren als auch in den homozygoten S1928A-Mäusen vorhanden ist wurde in **Abbildung 3-19 b** gezeigt. Die co-immunpräzipitierte PKA wurde durch die Zugabe von cAMP aktiviert. Das Phosphorylierungssignal im Autoradiogramm war nur in der Kontrolle zu detektieren, die S1928A-Mutation verhindert also eine Phosphorylierung des kardialen $\text{Ca}_v1.2$ durch die co-immunpräzipitierte PKA. Die Ladekontrolle im Immunoblot zeigt eine unveränderte Expression von $\text{Ca}_v1.2$ (**Abbildung 3-22 a**).

Auch durch die Zugabe von PKAc (1U) konnte $\text{Ca}_v1.2$ in einer Co-Immunpräzipitation phosphoryliert werden. Das Phosphorylierungssignal war wiederum nur in der Kontrolle zu detektieren. Durch Zugabe von PKI als spezifischem Inhibitor der PKA konnte die Phosphorylierung verhindert werden (**Abbildung 3-22 b**).

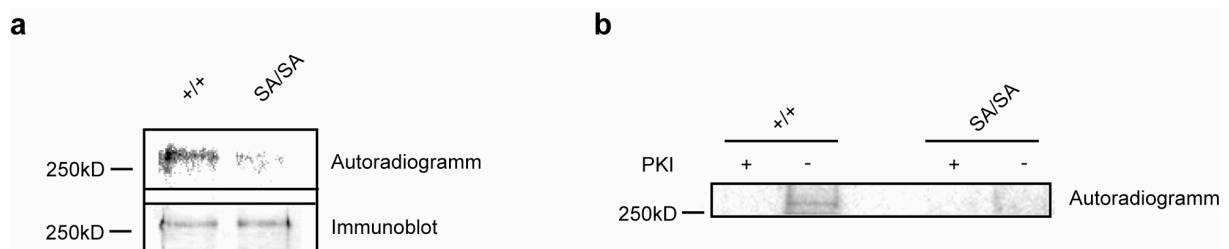


Abbildung 3-22 (a) Phosphorylierung des $\text{Ca}_v1.2$ in einer Co-Immunpräzipitation aus Kontrollherzen ($+/+$) bzw. für S1928A homozygoten Herzen (SA/SA) mit endogener PKA. Im Autoradiogramm ist ein deutliches Signal nur für die Kontrolle zu erkennen, wohingegen der Immunoblot mit $\text{Ca}_v1.2$ Antikörper die gleiche Beladung beider Spuren zeigt. **(b)** Phosphorylierung einer Co-Immunpräzipitation mit PKAc (1U). Ein Phosphorylierungssignal ist nur in der Kontrolle zu detektieren, die Phosphorylierung ist durch PKI hemmbar.

3.4.5 Elektrophysiologie

Die Messungen an Myozyten (durchgeführt von PD Dr. Andrea Welling und Carl Christel) von homozygoten S1928A-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren aus den gleichen Würfen zeigten keinen Unterschied in der Strom-Spannungsbeziehung sowie Stromdichte (**Abbildung 3-23**). β -adrenerge Stimulation durch Zugabe von Isoproterenol (Iso) führte zu einer Erhöhung von I_{CaL} um $280\% \pm 25\%$ in den Kontrollen und $268\% \pm 20\%$ in den homozygoten S1928A-Myozyten. Es ist kein signifikanter

Unterschied feststellbar. Auch der Linksshift um 10mV war in den S1928A-Myozyten noch vorhanden.

Wurde der I_{CaL} mit dem Adenylatcyclase-Agonisten Forskolin stimuliert, konnte ebenso wie in der Stimulation durch Isoproterenol kein signifikanter Unterschied in der Stromerhöhung von Kontrollen und Mutanten festgestellt werden ($228\% \pm 39\%$ bzw. $240\% \pm 20\%$). Wurde nach der Stimulation mit Forskolin zusätzlich Isoproterenol zugegeben, war weder in den Kontrollen noch in den Mutanten eine weitere Erhöhung des I_{CaL} messbar. Dadurch kann eine direkte Stimulation des I_{CaL} durch die G_s -Untereinheit ausgeschlossen werden (Hartzell et al., 1991).

Diese Versuche lassen darauf schließen, dass für die akute β -adrenerge Stimulation des I_{CaL} die Phosphorylierung von Serin 1928 nicht von Bedeutung ist.

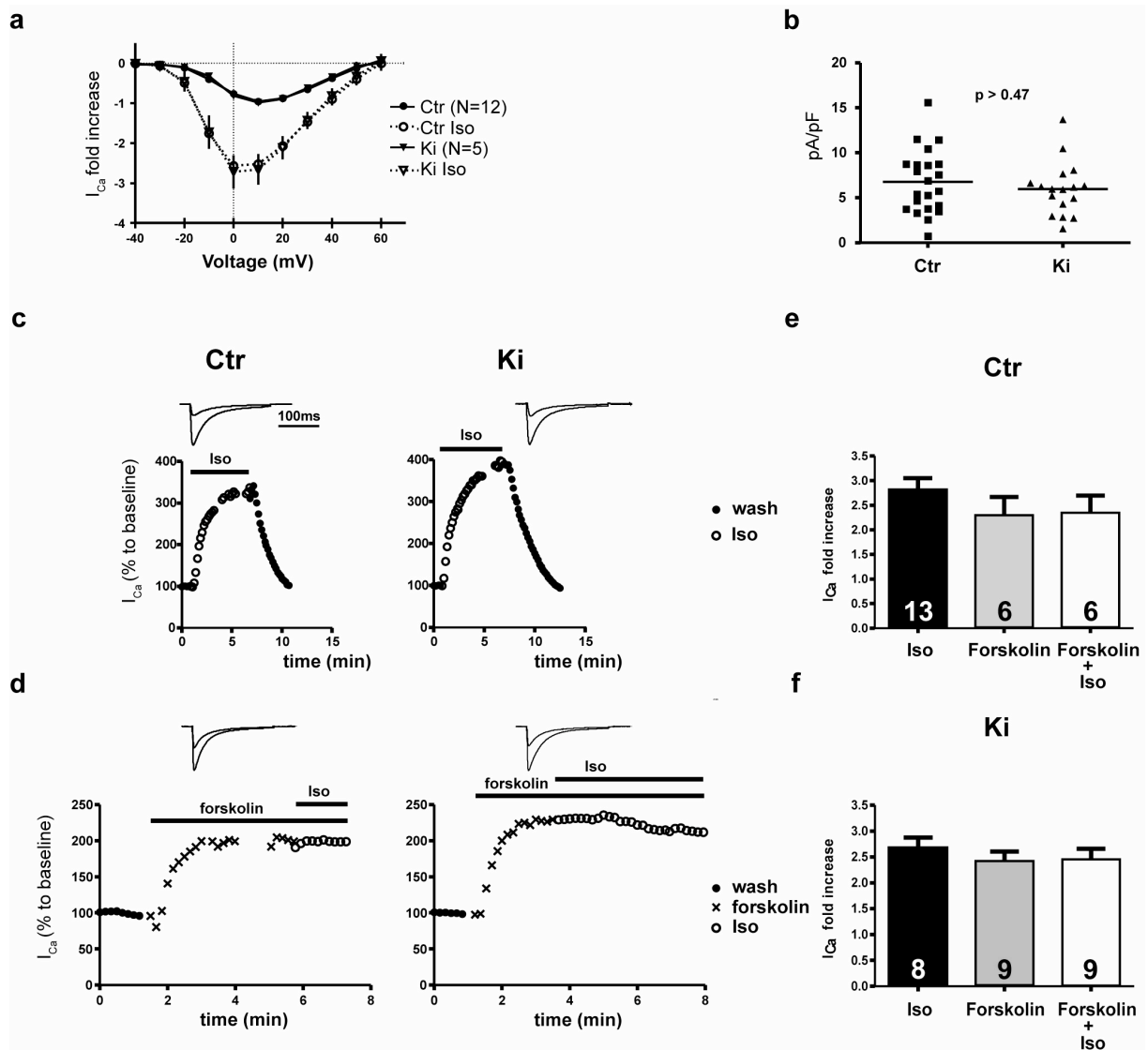


Abbildung 3-23 Messungen von Kalziumströmen in ventrikulären Myozyten von Kontrollen (Ctr) und homozygoten S1928A-Mäusen (Ki) **(a)** Durchschnittliche (\pm SEM) Strom-Spannungsbeziehung vor und nach Stimulation mit 100nM Isoproterenol (Iso) **(b)** Durchschnittliche Stromdichten der Kalziumströme in Kontroll- (Vierecke) und homozygoten S1928A-Myozyten (Dreiecke) **(c), (d)** Repräsentative Messungen von Kalziumströmen vor und nach Stimulation mit 100nM Isoproterenol oder 10 μ M Forskolin. Die Ströme wurden durch 200ms Testpulse von -40 auf 10mV stimuliert. **(e), (f)** Statistische Auswertung der Effekte von Isoproterenol, Forskolin und Forskolin plus Isoproterenol auf beide Genotypen. Die Nummern in den Säulen stehen für die Zahl der gemessenen Myozyten.

4 Diskussion

4.1 Phosphorylierungsexperimente

Die Phosphorylierung durch Kinasen stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus vieler intrazellulärer Prozesse dar. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Phosphorylierung des Ca_v1.2-Carboxyterminus durch die Proteinkinase A spezifisch an einer Aminosäure, nämlich Serin 1928, geschieht.

Dass Ca_v1.2 *in vitro* von der PKA phosphoryliert wird, konnte schon vor längerer Zeit gezeigt werden (Yoshida et al., 1992). Daraufhin beschäftigten sich unterschiedliche Arbeitsgruppen mit der Identifizierung der PKA-Phosphorylierungsstelle. Durch die Expression verschiedener cDNA-Konstrukte in *Saccharomyces cerevisiae* konnte Serin 1928 als einzige Phosphorylierungsstelle der PKA im Carboxyterminus von Ca_v1.2 identifiziert werden (Mitterdorfer et al., 1996). De Jongh et al konnten 1996 feststellen, dass eine lange und eine trunkierte Form von Ca_v1.2 existieren und dass nur die lange Form von PKA phosphoryliert wird. Durch Mikrosequenzierung und Versuche mit GST-Fusionsproteinen wurde von dieser Arbeitsgruppe Serin 1928 als alleinige Phosphorylierungsstelle der PKA im Ca_v1.2 identifiziert. Zudem konnte in ventrikulären Myozyten gezeigt werden, dass Serin 1928 auch *in vivo* durch β -adrenerge Stimulation phosphoryliert wird (Hulme et al., 2006). Die Trunkierung von Ca_v1.2 soll im ZNS durch die kalziumabhängige Protease Calpain zustande kommen (Hell et al., 1996), in kardialem Gewebe ist jedoch hauptsächlich die lange Form vorhanden (Gao et al., 1997).

Der Einfluss der PKC-Phosphorylierung auf den I_{CaL} ist bisher ungeklärt. Wichtig in diesem Zusammenhang scheint der N-Terminus des Ca_v1.2 zu sein. Wird humaner Ca_v1.2 in *Xenopus* Oozyten exprimiert, lässt sich durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) als Aktivator der PKC eine Inhibition von I_{CaL} erreichen (Bouron et al., 1995). Wird allerdings Ca_v1.2 aus Kaninchen verwendet, steigt der Strom durch Gabe von PMA zunächst an (Bourinet et al., 1992; Singer-Lahat et al., 1992). Es stellte sich heraus, dass Unterschiede im N-Terminus für die unterschiedlichen Effekte verantwortlich sind (Shistik et al., 1998). Bei Expression von Ca_v1.2 aus Kaninchen in einem anderen System, nämlich TSA-201-Zellen, wird I_{CaL} durch PKC inhibiert (McHugh et al., 2000).

In einer neueren Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch Serin 1928 im Carboxyterminus des $\text{Ca}_v1.2$ von verschiedenen Isoformen der PKC phosphoryliert wird (Yang et al., 2005). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch Experimente an GST-Fusionsproteinen bestätigt werden. Es werden jedoch zusätzlich noch andere Aminosäuren im $\text{Ca}_v1.2$ -Carboxyterminus von der PKC phosphoryliert. Diese zusätzlichen Phosphorylierungsstellen liegen hinter Aminosäure 1733. Für die PKC ζ konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Phosphorylierungsstelle zwischen Aminosäure 1733 und 1906 liegen muss.

Da nun gezeigt ist, dass auch der Carboxyterminus, speziell Serin 1928, durch PKC phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung durch eine direkte Assoziation der PKC mit dem Carboxyterminus des $\text{Ca}_v1.2$ zustande kommt (Yang et al., 2005), ist eine Regulation sowohl über den N-Terminus als auch über den C-Terminus denkbar. Ob und welche physiologischen Auswirkungen die PKC-Phosphorylierung von $\text{Ca}_v1.2$ hat muss noch untersucht werden.

Die β_{2a} -Untereinheit des L-Typ-Kalziumkanals spielt eine wichtige Rolle in der Kanalregulierung. Eine bedeutende Aufgabe der β_{2a} -Untereinheit ist, die Zahl aktiver Kalziumkanäle an der Membran zu erhöhen. Außerdem wird durch diese Untereinheit die Aktivierungsschwelle des Kalziumkanals herabgesetzt (Dolphin, 2003). $\text{Ca}_v\beta^{-/-}$ -Embryos sterben an Tag 10,5p.c. Die Kalziumströme in Myozyten aus $\text{Ca}_v\beta^{-/-}$ -Embryos von Tag 9,5p.c. sind stark vermindert (Weissgerber et al., 2006). Auch die β_{2a} -Untereinheit wird von der PKA phosphoryliert. Vor allem zwei Serine (Serin 479/480) sind von der PKA-Phosphorylierung betroffen (Bunemann et al., 1999). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch Phosphorylierungsexperimente bestätigt werden. Somit ist es auch denkbar, dass die Regulation des I_{CaL} über eine Phosphorylierung der β -Untereinheit abläuft.

4.2 Vektorkonstruktion und Targeting für die $Ca_v1.2$ S1928A-Mauslinie

Um die physiologische Relevanz der Phosphorylierung des $Ca_v1.2$ an Serin 1928 aufzuklären, sollte eine Mauslinie generiert werden, die an dieser Stelle nicht phosphoryliert werden kann. Serin 1928 wurde durch eine Punktmutation in ein Alanin umgewandelt. Es wurde ein Targeting-Vektor mit dieser Mutation generiert, der durch homologe Rekombination in das Maus-Genom integriert wurde.

Die Generierung des Targeting-Vektors erfolgte mittels PCR aus genomischer ES-Zell-DNS. Als Sequenzvorlage diente die Ensembl Gene ID „ENSMUSG00000051331“. Zur Überprüfung der Übereinstimmung dieser Sequenz mit der vorliegenden ES-Zell-DNS wurde eine Intronanalyse durchgeführt. Diese erbrachte keinen Unterschied in dem untersuchten Abschnitt. Bei der Sequenzierung der subklonierten PCR-Amplifikate fiel jedoch ein intronischer Abschnitt auf, der eine von der Sequenzvorlage abweichende Basenabfolge aufzeigte. Eine Sequenzierung von genomischer DNS aus 129/Sv-Mäusen zeigte, dass diese Mutationen nicht durch die PCR entstanden waren, sondern schon im Maus-Genom vorlagen. Aus diesem Grund wurde mit der abweichenden Sequenz weitergearbeitet, da die homologe Rekombination mit ES-Zellen aus 129/Sv-Mäusen durchgeführt werden sollte. Die abweichende Sequenz kommt wahrscheinlich durch Inzuchtstamm-spezifische Abweichungen zustande. Die ES-Zellen stammen ursprünglich aus 129/Sv-Mäusen, die Ensembl Gene ID hingegen wurde anhand von Sequenzen von C57/Bl6-Mäusen erstellt.

Es wurden insgesamt 1234 Klone im primären Targeting isoliert, von denen 14 als „positiv“ identifiziert wurden, d.h. in diesen Klonen hat homologe Rekombination stattgefunden. Das entspricht einer Quote von 1,1%. In den übrigen isolierten Klonen hat wahrscheinlich Integration des Targeting-Vektors an einem zufälligen Genort stattgefunden, so dass auch diese Klone die Positivselektion mit G418 überlebten.

Um eine mehrmalige Integration des Targeting-Vektors in das Genom auszuschließen, wurde zusätzlich mit einer Neo-Sonde gescreent. Außerdem wurde die homologe Rekombination mit einer PCR bestätigt. Das Vorhandensein der Punktmutation wurde durch eine Sequenzierung bestätigt, wobei eine Strategie verfolgt wurde, die eine Trennung der beiden Allele ermöglichte. Das Wildtyp-Allel trug in den untersuchten Klonen das Triplet GGC für Serin, das Knock-In-Allel ein TCC für Alanin.

Durch ein sekundäres Targeting wurde die gefloخته Selektionskassette aus dem ES-Zell-Genom entfernt. Dafür wurden zwei Klone des primären Targetings verwendet (VIB2 und IVH11). Da das primäre Targeting zweimal durchgeführt wurde, um eine ausreichende Anzahl positiver Klone zu gewährleisten, konnte für das sekundäre Targeting jeweils ein Klon aus einem primären Targeting ausgewählt werden. So konnte umgangen werden, dass durch eventuelle Probleme in einem Targeting alle weiterverwendeten Klone ihre Omnipotenz verloren haben und somit nicht mehr in der Lage wären, die Keimbahn zu bilden. Die beiden Klone wurden mit dem Cre-exprimierendem Plasmid pIC-Cre transfiziert. Da in dem sekundären Targeting kaum falsch positive Klone heranwachsen, wurden nur 75 Klone (Primärklon VIB2) und 116 Klone (Primärklon IVH11) isoliert. Die Selektionskassette war bei allen isolierten Klonen entfernt.

4.3 Untersuchung der S1928A-Mäuse

Nach Blastozysten-Injektion wurden drei Chimären von CD1-Ammenmüttern ausgetragen. Nur mit einer dieser Chimären konnten heterozygote Nachkommen gezüchtet werden. Die Verpaarung der heterozygoten S1928A-Mäuse untereinander führte zu homozygoten Nachkommen. Mit einer Sequenzanalyse wurde das Vorhandensein der Punktmutation in diesen Mäusen bestätigt.

Dass nun auch wirklich keine Phosphorylierung mehr an der Aminosäure 1928 stattfinden kann wurde zum einen mit dem phosphospezifischen Antikörper pS1928 gezeigt. Zum anderen konnte in den S1928A-Mutanten überhaupt keine Phosphorylierung mehr durch PKA am co-immunpräzipitierten $Ca_v1.2$ detektiert werden. Das bedeutet, dass Serin 1928 definitiv die einzige Phosphorylierungsstelle der PKA am $Ca_v1.2$ darstellt.

Die Untersuchung der homozygoten S1928A-Mäuse im Vergleich mit Kontrollmäusen aus den gleichen Würfen ergab keine Unterschiede hinsichtlich der Proteinexpression in Herz- sowie Hirngewebe. Der Komplex mit den Untereinheiten der PKA und dem β_1 -Adrenozeptor ist nach wie vor im Co-Immunpräzipitat vorhanden.

Was für Auswirkungen die S1928A-Mutation auf die β -adrenerge Stimulation des I_{CaL} hat, wurde elektrophysiologisch an ventrikulären Myozyten untersucht. Diese Experimente zeigen, dass nach wie vor eine Erhöhung des I_{CaL} durch den β -Adrenozeptor-Agonisten Isoproterenol erreicht werden kann. Es scheint also keinen Zusammen-

hang zwischen der Phosphorylierung von Serin 1928 und der Regulation des I_{CaL} durch die Proteinkinase A zu geben.

Dieses Ergebnis ist überraschend, da es viele Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen Phosphorylierung an Serin 1928 und Erhöhung des I_{CaL} gab. Zwar konnten Zong et al (1995) in HEK-Zellen keine Veränderung des I_{CaL} durch Zugabe von PKA feststellen. Dieses Problem schien aber durch Co-Expression von AKAP sowie $Ca_v\beta_{2a}$ behoben. So konnten Gao et al (1997) in HEK-Zellen eine Erhöhung des I_{CaL} durch Forskolin bzw. 8-Br-cAMP erreichen. Diese Erhöhung war durch S1928A-Mutation nicht mehr feststellbar. Hulme et al (2006) konnten β -adrenerge Stimulation mit der Phosphorylierung von Serin 1928 und Regulierung des I_{CaL} in ventrikulären Myozyten korrelieren. Auch eine andere Arbeit (Oliveria et al., 2007) belegt die kritische Rolle, die Serin 1928 in der β -adrenergen Regulation von $Ca_v1.2$ spielt. Auf der anderen Seite konnte durch Verwendung eines adenoviralen Transfektionssystems in Myozyten gezeigt werden, dass der Carboxyterminus von $Ca_v1.2$ essenziell für die Erhöhung des I_{CaL} durch β -adrenerge Stimulation ist. Serin 1928 trägt in diesem System jedoch nur höchstens 30% zur β -adrenergen Regulation von I_{CaL} bei (Ganesan et al., 2006).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse aus Versuchen an heterologen Expressionssystemen belegen die Unzulänglichkeiten dieser Systeme. Da in keinem dieser Systeme eine der in nativen Myozyten vergleichbare Erhöhung des I_{CaL} erreicht werden konnte (10-50% gegen 200-400%), ist davon auszugehen, dass wichtige Regulationsmechanismen in diesen Systemen nicht reproduziert werden konnten. In den in dieser Arbeit untersuchten Myozyten sind hingegen alle nativen Regulationsmechanismen vorhanden.

Auch die direkte Stimulation der Adenylatcyclase durch Forskolin erhöhte den Kalziumstrom in den S1928A-Myozyten in gleichem Maße wie in den Kontroll-Myozyten. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von Isoproterenol nicht weiter verstärkt werden. Eine direkte Stimulation des I_{CaL} durch die G_s -Untereinheit kann somit ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse werfen zwei Fragen auf. Zum einen, wie die Stimulation des I_{CaL} durch die PKA zustande kommt, wenn nicht über die Phosphorylierung der α_1 -Untereinheit. Die zweite ungeklärte Frage ist, ob und welche physiologischen Auswirkungen die Phosphorylierung an Serin 1928 hat. In dieser Arbeit wurde gezeigt,

dass auch die β_{2a} -Untereinheit von der PKA phosphoryliert wird. So könnte die Erhöhung des I_{CaL} als Antwort auf β -adrenerge Stimulation auch über eine PKA-Phosphorylierung dieser Untereinheit ablaufen. Bisher wurden nur ventrikuläre Myozyten elektrophysiologisch untersucht. Es wäre denkbar, dass die Phosphorylierung an Serin 1928 in anderen Geweben eine regulative Rolle spielt. Dies muss in weiteren Versuchen untersucht werden.

4.4 Ausblick

Im Anschluss an diese Arbeit soll untersucht werden, ob die $Ca_v1.2$ S1928A-Mäuse ein verändertes EKG aufweisen.

Der Einfluss einer Dauerstimulation mit Isoproterenol auf wichtige Herzparameter soll mit Hilfe von osmotischen Pumpen untersucht werden. Diese Pumpen werden der Maus subkutan implantiert und geben den enthaltenen Wirkstoff kontinuierlich in das Gewebe ab.

Weiterhin kann die Rolle der PKC-Phosphorylierung von Serin 1928 im Carboxyterminus des $Ca_v1.2$ untersucht werden, beispielsweise mit Aktivatoren der PKC.

5 Zusammenfassung

Der Kalziumeinstrom durch den kardialen L-Typ-Kalziumkanal ($Ca_v1.2$) wird durch β -adrenerge Stimulation erhöht. So ist in nativen Myozyten eine Erhöhung des I_{CaL} durch β -Adrenozeptor-Agonisten um das drei- bis vierfache messbar. Der gleiche Effekt ist durch direkte Zugabe von PKAc oder cAMP induzierbar. Eine Phosphorylierung durch die PKA scheint also der ausschlaggebende Faktor für die Stromerhöhung zu sein.

Der molekulare Mechanismus dieses Effekts ist bisher unbekannt. Es gibt jedoch viele Hinweise, die auf eine wichtige Rolle einer einzigen Aminosäure im Carboxyterminus des $Ca_v1.2$ hinweisen. Serin 1928 wird durch die PKA phosphoryliert. Es liegt nahe, dass die Phosphorylierung dieser Aminosäure an der Stromerhöhung durch β -adrenerge Stimulation beteiligt ist. Da diese Fragestellung in heterologen Expressionssystemen nicht zufriedenstellend geklärt werden konnte, war Ziel dieser Arbeit, eine Mauslinie ohne phosphorylierbares Serin 1928 zu generieren.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Phosphorylierungsexperimente durchgeführt, die zeigen, dass Serin 1928 die einzige Phosphorylierungsstelle der PKA im Carboxyterminus des $Ca_v1.2$ darstellt. Auch für verschiedene Isoformen der PKC ($PKC\alpha$, $PKC\epsilon$, $PKC\zeta$) stellt Serin 1928 einen Angriffspunkt zur Phosphorylierung dar. Allerdings werden auch noch andere Aminosäuren im Carboxyterminus von der PKC phosphoryliert. Weiterhin wurde gezeigt, dass die β_{2a} -Untereinheit des kardialen L-Typ-Kalziumkanals von der PKA phosphoryliert wird.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ein Targeting-Vektor konstruiert, der an Stelle des Serin 1928 ein Alanin trug. Da dieser Vektor über homologe Rekombination in das ES-Zell-Genom gelangen sollte, wurde ein langer homologer Bereich zum Zielgen *CACNA1C* in den Vektor integriert. Zur Selektion positiver Klone wurde außerdem eine Selektionskassette in den Targeting-Vektor eingeschlossen, die sowohl eine Positivselektion, als auch eine Negativselektion erlaubte.

In einem primären Targeting fand homologe Rekombination des Targeting-Vektors in den ES-Zellen statt. Über eine Positivselektion mit G418 wurden Klone angereichert, die das Targeting-Konstrukt in das Genom integriert hatten. Um Klone zu detektieren, bei denen homologe Rekombination stattgefunden hatte, wurde eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt.

Zwei der als positiv identifizierten Klone wurden in einem sekundären Targeting mit einem Cre-Rekombinase exprimierenden Plasmid transfiziert. Die gefloxtete Selektionskassette wurde auf diesem Weg entfernt, was durch ein PCR-Screening gezeigt wurde.

Fünf Klone des sekundären Targetings wurden in Blastozysten injiziert und die Blastozysten in Leihmütter implantiert. Von den Leihmüttern wurden drei Chimären ausgetragen. Aus einer der Chimären konnten heterozygote Nachkommen gezüchtet werden. Die Verpaarung dieser Nachkommen untereinander führte zu homozygoten S1928A-Mäusen. Diese Mäuse können an Aminosäure 1928 nicht phosphoryliert werden.

Die Untersuchung der für die S1928A-Mutation homozygoten Mäuse erbrachte keinen auffälligen Unterschied zu den Kontrolltieren. Sowohl in dem Proteinexpressionsprofil als auch in elektrophysiologischen Untersuchungen ventrikulärer Myozyten konnte kein Unterschied zu den Kontrollen festgestellt werden. Es scheint keinen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von Serin 1928 und der Regulation des I_{CaL} durch die Proteinkinase A zu geben. Phosphorylierungsexperimente zeigten, dass Phosphorylierung durch die PKA an $Ca_v1.2$ in Herzen aus homozygoten S1928A-Mäusen nicht mehr stattfindet.

6 Anhang

6.1 Verwendete Oligonukleotid-Primer

Alle verwendeten Primer wurden von MWG Biotech bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in einer entsprechenden Menge H₂O gelöst, so dass die Konzentration 10µM betrug, Primer für Sequenzierungen wurden auf eine Konzentration von 1µM eingestellt. An die Primer angefügte Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme und andere Mutationen sind fett dargestellt.

Primer	Sequenz in 5'- 3'-Richtung	Verwendung
TL_NotI_for	TTATAAG CGGCCGCGGG TGATAGCCAATG	5'-Arm
TL_BamHI_rev	TGCCT CGGATCC CAAAGTAATGAGCCA	5'-Arm
TL_ClaI_for	CGTCAG ATCGAT GCCTGTGGCAAGGAG	3'-Arm 1
TL_XhoI_rev	GCCTAG CTCGAG GGCACCTGGAAATCC	3'-Arm 1
TL_Ser-Ala_for	TTTGCAGGTCGAAGGGCC GCCTTCC ATCT	Overlap S1928A
TL_Ser-Ala_rev	GACATTCCAGATGGAAGG CGGCCCTT CGAC	Overlap S1928A
TL_XbaXho_for	TATGTT CTAGACTCGAG CAGAAGCTGGGGACC	3'-Arm 2
TL_Kpn_1_rev	TCACGAG GTACCA CTCTGTCACAGACC	3'-Arm 2
TL_Xba_a_for	ACCGCGT CTAGAA ACTCAACAGCAGCT	3'-Arm 3
TL_Kpn_2_rev	ACGACG GGTACCA ACTGAGGGATATGG	3'-Arm 3
TL_5'Sonde_for	ATTAAT CGGCCGCG AGTGTGCTTAATTGC	5-Sonde NotI
TL_5'Sonde_rev	GCATAT GGATCCC CATAGGAGACACCC	5-Sonde BamHI
TL_RE_31195_for	GACCCTTGTGTAGAGAGTGAGCC	In vitro Rekombination; Screening 2. Targeting; Genotypisierung
TL_RE_31582_rev	CAAAGTAGCCGGGGAACCG	In vitro Rekombination; Screening 2. Targeting; Genotypisierung
PL_RE2_rev	GAATTGACCTGCAGGGGCCCT	In vitro Rekombination; Screening 2. Targeting
TL_Screen_3_for	ATGCAGAGCAAGTCCATCAGC	Screening 1. Targeting
TL_Screen_2_rev	TCCCTACCCGGTAGAATTGACC	Screening 1. Targeting
TL_31582_for	ATCTGTCCTGCGTCCTGATTCC	PCR zum Sequenzieren über Punktmutation
TL_32833_rev	TGTCCCTGACTGTTTCTGAGACG	PCR zum Sequenzieren über Punktmutation

Moo_GST2_for	AGAGGATCCGTAGCTGTTATCATGGAC	GST-Fusionsprotein
Moo_GST_1733_rev	AGACTCGAGCTAGATGTGCAGTGGGCGCTG	GST-Fusionsprotein
PL_GST_45end_for	CATGATGGATCCCAGCGCCCACTGCACATC	GST-Fusionsprotein
TL_GST_full_rev	AGACTCGAGCTACAGGCTGCTGACGCC	GST-Fusionsprotein
TL_GST_1906_for	ATTACAGGATCCAAGCGGGACATCAGGCTG	GST-Fusionsprotein
TL_LK1_Ser-Ala_for	CTGGGTCTGAAGGGCTGCCTTCCACCT	GST Overlap S1928A
TL_LK1_Ser-Ala_rev	ACTCCAGGTGGAAGGCAGCCCTTCGAC	GST Overlap S1928A
TL_GST_beta2_for	TATGGATCCCTTGACAGGCACCTCGCG	GST-Fusionsprotein
TL_GST_beta2_N_rev	ATTACAGCGGCCGCTCATTGGCGGATGTAAAC	GST-Fusionsprotein
TL_Beta_S479/480A_for	ATCCCAGCACCGGTCTGCCGCCTCAGCC	GST Overlap S479/480A
TL_Beta_S479/480A_r	TGGTGTGGGGCTGAGGCGGCAGACCGGTG	GST Overlap S479/480A

Sequenzierprimer

Primer	Sequenz in 5'- 3'-Richtung	Verwendung
TL_Not/Bam_1_for	GAAATCAGCAATGCAAGG	Targeting-Vektor
TL_Not/Bam_2_for	AACACCGACAACCTGACCT	Targeting-Vektor
TL_Not/Bam_1_rev	TGCATTGCTGATTTTCAGC	Targeting-Vektor
TL_Not/Bam_2_rev	AGGTCAGTTGTCGGTGTT	Targeting-Vektor
TL_Cla/Xho_1_for	TAACATCTGTGACCAGGC	Targeting-Vektor
TL_Cla/Xho_2_for	AGAAACTAAGACCCAGGG	Targeting-Vektor
TL_Cla/Xho_1_rev	TGGTCACAGATGTTAATACC	Targeting-Vektor
TL_Cla/Xho_2_rev	CCTGGGTCTTAGTTTCTC	Targeting-Vektor
TL_Xba/Kpn_1_for	AAGAGTGAGTAACCTCTG	Targeting-Vektor
TL_Xba/Kpn_2_for	AAGCAAAGAGTGCACCTT	Targeting-Vektor
TL_Xba/Kpn_3_for	CACACATGCGCACTTAT	Targeting-Vektor
TL_Xba/Kpn_4_for	TTGTGAACTGCAGGGAC	Targeting-Vektor
TL_Xba/Kpn_5_for	CCTTGCTTGATAAACAG	Targeting-Vektor
TL_Xba/Kpn_6_for	AAGAGCGGTTACAACTG	Targeting-Vektor
TL_Xba/Kpn_7_for	GTGTCCATAGTATGTGCG	Targeting-Vektor
TL_Xba/Kpn_8_for	GTTATACTTGAATTCAGGTC	Targeting-Vektor
TL_XbaXho/Kpn_1_for	CATGACTACCAGTGTTC	Targeting-Vektor
TL_XbaXho/Kpn_2_for	GCTTCCAGAATTCTAAGC	Targeting-Vektor
TL_XbaXho/Kpn_3_for	AGGGAGACAGTTCATG	Targeting-Vektor
TL_XbaXho/Kpn_4_for	GCCACACTTCAATATGC	Targeting-Vektor
TL_LK1_5337_for	ACAGCTCTGAGGATCAA	GST-Fusionsprotein Ca _v 1.2

TL_LK1_5739_for	CTGTTTGGCAACCATGT	GST-Fusionsprotein Ca _v 1.2
TL_LK1_6150_for	GTGAGGATCGGTGAAGA	GST-Fusionsprotein Ca _v 1.2
TL_LK1_6566_for	CCGACTCCAGTGAGAAAC	GST-Fusionsprotein Ca _v 1.2
TL_LK1_6966_for	AGAACGAGCAGGACGC	GST-Fusionsprotein Ca _v 1.2
TL_beta2_162_rev	CACATCTGAATCGGATGG	GST-Fusionsprotein β _{2a}
TL_beta2_652_for	TTCACAGGGTTCTCAAGG	GST-Fusionsprotein β _{2a}
TL_beta2_990_for	TAGCGGAAGTTCAGAGTG	GST-Fusionsprotein β _{2a}
TL_beta2_1420_for	TTCACAGGGTTCTCAAGG	GST-Fusionsprotein β _{2a}
TL_beta2_2040_for	TTGCTGTTGCTCAAGTAGC	GST-Fusionsprotein β _{2a}

6.2 Verwendete Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen.

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz
NotI	GC/GGCCGC
BamHI	G/GATCC
ClaI	AT/CGAT
XhoI	C/TCGAG
XbaI	T/CTAGA
KpnI	GGTAC/C
PstI	CTGCA/G

6.3 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Konzentration	Herkunft
Ca _v 1.2	Kaninchen	1:250	(Moosmang et al., 2003)
β _{2a}	Kaninchen	1:200	(Ludwig et al., 1997)
Ca _v 1.2-pS1928	Kaninchen	1:200	CovalAb
PKAc	Maus	1:1000	BD Biosciences
RIIα	Maus	1:1000	BD Biosciences
RIIβ	Maus	1:1000	BD Biosciences
β ₁ -adrenergic	Kaninchen	1:1000	Upstate
MAPK	Kaninchen	1:1000	Cell Signalling
GST	Kaninchen	1:1000	Calbiochem

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Konzentration	Herkunft
GAR-HRP	Ziege	1:50000	Dianova
GAM-HRP	Ziege	1:50000	Dianova
GAR-AP	Ziege	1:5000	Dianova

6.4 Sequenzabweichung CACNA1C zwischen Exon 45 und 46

Rot: abweichende Basenfolge Sv/129-Maus im Vergleich B16-Maus

Blau: zusätzliche Basen

Violett (-12): fehlende Basen

CAA GAA ACT AAT AGA GAG TTT TAG ACT AGG CTA GAC TGG CAA AAA AAA
 AAA AGA CCC AGG GAG ACT CAT TAT ATA AA-12G TCC AGC TGA GAA AGT
 GGG AAC ACC TGT ATC ATA CTC ACT TGG AGA TCG AGG AGA AAC TTC AGG
 CTA TGG CCA ATA CAT TGT CTG CAG CAA ATG GGC TCT CAC CTG AAC ACC
 ACA GGT TAC CTT TTT AAT TAA AAA TTC CCT TTG GGT GGG TCC TGT GTT
 TTC AAC ATG TGT GTG TGT ACA TGT GTA TAT GTG CGT GTG CAT GTG TAA
 GCA TGT ATG TGT GCA TGT GTG CAT ATA TGT GTT TTC TAA ACT GAT ATC
 ACT TCA GCT CAA AGT CAA AGC ACT CTC TAA ATA GGG ATT ATA GTC ATA
 AGC CTT CCA AGA TAA TGC ACA TAG CAT TAT GCT TCC CTT GGA TTT

7 Literaturverzeichnis

- Berridge, M.J. (2004) Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, **1742**, 3-7.
- Bers, D.M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, **415**, 198-205.
- Biel, M., Ruth, P., Bosse, E., Hullin, R., Stuhmer, W., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1990) Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett*, **269**, 409-412.
- Biel, M., Seeliger, M., Pfeifer, A., Kohler, K., Gerstner, A., Ludwig, A., Jaissle, G., Fauser, S., Zrenner, E. and Hofmann, F. (1999) Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7553-7557.
- Blumenstein, Y., Kanevsky, N., Sahar, G., Barzilai, R., Ivanina, T. and Dascal, N. (2002) A novel long N-terminal isoform of human L-type Ca²⁺ channel is up-regulated by protein kinase C. *J Biol Chem*, **277**, 3419-3423.
- Bodi, I., Mikala, G., Koch, S.E., Akhter, S.A. and Schwartz, A. (2005) The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest*, **115**, 3306-3317.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., Ciccolini, F. and Lipp, P. (2001) Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol*, **12**, 3-10.
- Bourinet, E., Fournier, F., Lory, P., Charnet, P. and Nargeot, J. (1992) Protein kinase C regulation of cardiac calcium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch*, **421**, 247-255.
- Bouron, A., Soldatov, N.M. and Reuter, H. (1995) The beta 1-subunit is essential for modulation by protein kinase C of an human and a non-human L-type Ca²⁺ channel. *FEBS Lett*, **377**, 159-162.
- Bunemann, M., Gerhardstein, B.L., Gao, T. and Hosey, M.M. (1999) Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit. *J Biol Chem*, **274**, 33851-33854.
- Catterall, W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 521-555.
- Colledge, M. and Scott, J.D. (1999) AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol*, **9**, 216-221.
- Cribbs, L.L., Lee, J.H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M. and Perez-Reyes, E. (1998) Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res*, **83**, 103-109.
- Davare, M.A. and Hell, J.W. (2003) Increased phosphorylation of the neuronal L-type Ca(2+) channel Ca(v)1.2 during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 16018-16023.
- De Jongh, K.S., Murphy, B.J., Colvin, A.A., Hell, J.W., Takahashi, M. and Catterall, W.A. (1996) Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry*, **35**, 10392-10402.
- Dolphin, A.C. (2003) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*, **35**, 599-620.
- Dubel, S.J., Starr, T.V., Hell, J., Ahljanian, M.K., Enyeart, J.J., Catterall, W.A. and Snutch, T.P. (1992) Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5058-5062.

- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W. and Catterall, W.A. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, **25**, 533-535.
- Ganesan, A.N., Maack, C., Johns, D.C., Sidor, A. and O'Rourke, B. (2006) Beta-adrenergic stimulation of L-type Ca²⁺ channels in cardiac myocytes requires the distal carboxyl terminus of alpha1C but not serine 1928. *Circ Res*, **98**, e11-18.
- Gao, T., Yatani, A., Dell'Acqua, M.L., Sako, H., Green, S.A., Dascal, N., Scott, J.D. and Hosey, M.M. (1997) cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron*, **19**, 185-196.
- Gerhardstein, B.L., Puri, T.S., Chien, A.J. and Hosey, M.M. (1999) Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry*, **38**, 10361-10370.
- Gu, H., Zou, Y.R. and Rajewsky, K. (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell*, **73**, 1155-1164.
- Gui, P., Wu, X., Ling, S., Stotz, S.C., Winkfein, R.J., Wilson, E., Davis, G.E., Braun, A.P., Zamponi, G.W. and Davis, M.J. (2006) Integrin receptor activation triggers converging regulation of Cav1.2 calcium channels by c-Src and protein kinase A pathways. *J Biol Chem*, **281**, 14015-14025.
- Hall, D.D., Feekes, J.A., Arachchige Don, A.S., Shi, M., Hamid, J., Chen, L., Strack, S., Zamponi, G.W., Horne, M.C. and Hell, J.W. (2006) Binding of protein phosphatase 2A to the L-type calcium channel Cav1.2 next to Ser1928, its main PKA site, is critical for Ser1928 dephosphorylation. *Biochemistry*, **45**, 3448-3459.
- Halling, D.B., Aracena-Parks, P. and Hamilton, S.L. (2005) Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by calmodulin. *Sci STKE*, **2005**, re15.
- Hartzell, H.C., Mery, P.F., Fischmeister, R. and Szabo, G. (1991) Sympathetic regulation of cardiac calcium current is due exclusively to cAMP-dependent phosphorylation. *Nature*, **351**, 573-576.
- Hell, J.W., Westenbroek, R.E., Breeze, L.J., Wang, K.K., Chavkin, C. and Catterall, W.A. (1996) N-methyl-D-aspartate receptor-induced proteolytic conversion of postsynaptic class C L-type calcium channels in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3362-3367.
- Hofmann, F., Lacinova, L. and Klugbauer, N. (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **139**, 33-87.
- Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F. and Flockerzi, V. (1992) Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *Embo J*, **11**, 885-890.
- Hulme, J.T., Westenbroek, R.E., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (2006) Phosphorylation of serine 1928 in the distal C-terminal domain of cardiac CaV1.2 channels during beta1-adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 16574-16579.
- Kamp, T.J. and Hell, J.W. (2000) Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res*, **87**, 1095-1102.

- Kennelly, P.J. and Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem*, **266**, 15555-15558.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, J.H., Daud, A.N., Cribbs, L.L., Lacerda, A.E., Pereverzev, A., Klockner, U., Schneider, T. and Perez-Reyes, E. (1999) Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci*, **19**, 1912-1921.
- Lee, T.S., Karl, R., Moosmang, S., Lenhardt, P., Klugbauer, N., Hofmann, F., Kleppisch, T. and Welling, A. (2006) Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem*, **281**, 25560-25567.
- Ludwig, A., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1997) Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci*, **17**, 1339-1349.
- McHugh, D., Sharp, E.M., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (2000) Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12334-12338.
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S. and Numa, S. (1989) Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*, **340**, 230-233.
- Mitterdorfer, J., Froschmayr, M., Grabner, M., Moebius, F.F., Glossmann, H. and Striessnig, J. (1996) Identification of PK-A phosphorylation sites in the carboxyl terminus of L-type calcium channel alpha 1 subunits. *Biochemistry*, **35**, 9400-9406.
- Moosmang, S., Haider, N., Klugbauer, N., Adelsberger, H., Langwieser, N., Muller, J., Stiess, M., Marais, E., Schulla, V., Lacinova, L., Goebbels, S., Nave, K.A., Storm, D.R., Hofmann, F. and Kleppisch, T. (2005) Role of hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci*, **25**, 9883-9892.
- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J.W., Hofmann, F. and Klugbauer, N. (2003) Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *Embo J*, **22**, 6027-6034.
- Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T. and et al. (1991) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature*, **350**, 398-402.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. and Roder, J.C. (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8424-8428.
- Newton, A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, **270**, 28495-28498.
- Niidome, T., Kim, M.S., Friedrich, T. and Mori, Y. (1992) Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett*, **308**, 7-13.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P. and Tsien, R.W. (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, **316**, 440-443.
- Oliveria, S.F., Dell'Acqua, M.L. and Sather, W.A. (2007) AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls neuronal L-type Ca²⁺ channel activity and nuclear signaling. *Neuron*, **55**, 261-275.

- Osterrieder, W., Brum, G., Hescheler, J., Trautwein, W., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1982) Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates Ca²⁺ current. *Nature*, **298**, 576-578.
- Perez-Reyes, E. (1998) Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*, **30**, 313-318.
- Perez-Reyes, E. (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev*, **83**, 117-161.
- Puri, T.S., Gerhardstein, B.L., Zhao, X.L., Ladner, M.B. and Hosey, M.M. (1997) Differential effects of subunit interactions on protein kinase A- and C-mediated phosphorylation of L-type calcium channels. *Biochemistry*, **36**, 9605-9615.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schulla, V., Renstrom, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjinovci, A., Jing, X.J., Laux, D., Lundquist, I., Magnuson, M.A., Obermuller, S., Olofsson, C.S., Salehi, A., Wendt, A., Klugbauer, N., Wollheim, C.B., Rorsman, P. and Hofmann, F. (2003) Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca²⁺ channel null mice. *Embo J*, **22**, 3844-3854.
- Sculptoreanu, A., Rotman, E., Takahashi, M., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (1993) Voltage-dependent potentiation of the activity of cardiac L-type calcium channel alpha 1 subunits due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10135-10139.
- Seino, S., Chen, L., Seino, M., Blondel, O., Takeda, J., Johnson, J.H. and Bell, G.I. (1992) Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 584-588.
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A., Kuhbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R. and Hofmann, F. (2000) Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem*, **275**, 39193-39199.
- Shistik, E., Ivanina, T., Blumenstein, Y. and Dascal, N. (1998) Crucial role of N terminus in function of cardiac L-type Ca²⁺ channel and its modulation by protein kinase C. *J Biol Chem*, **273**, 17901-17909.
- Shistik, E., Keren-Raifman, T., Idelson, G.H., Blumenstein, Y., Dascal, N. and Ivanina, T. (1999) The N terminus of the cardiac L-type Ca(2+) channel alpha(1C) subunit. The initial segment is ubiquitous and crucial for protein kinase C modulation, but is not directly phosphorylated. *J Biol Chem*, **274**, 31145-31149.
- Singer-Lahat, D., Gershon, E., Lotan, I., Hullin, R., Biel, M., Flockerzi, V., Hofmann, F. and Dascal, N. (1992) Modulation of cardiac Ca²⁺ channels in Xenopus oocytes by protein kinase C. *FEBS Lett*, **306**, 113-118.
- Snutch, T.P., Tomlinson, W.J., Leonard, J.P. and Gilbert, M.M. (1991) Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron*, **7**, 45-57.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Starr, T.V., Prystay, W. and Snutch, T.P. (1991) Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5621-5625.
- Striessnig, J. (1999) Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels. *Cell Physiol Biochem*, **9**, 242-269.
- Strom, T.M., Nyakatura, G., Apfelstedt-Sylla, E., Hellebrand, H., Lorenz, B., Weber, B.H., Wutz, K., Gutwillinger, N., Ruther, K., Drescher, B., Sauer, C., Zrenner,

- E., Meitinger, T., Rosenthal, A. and Meindl, A. (1998) An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet*, **19**, 260-263.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. and Numa, S. (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, **328**, 313-318.
- Trautwein, W., Taniguchi, J. and Noma, A. (1982) The effect of intracellular cyclic nucleotides and calcium on the action potential and acetylcholine response of isolated cardiac cells. *Pflugers Arch*, **392**, 307-314.
- van der Heyden, M.A., Wijnhoven, T.J. and Ophof, T. (2005) Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Cardiovasc Res*, **65**, 28-39.
- Weissgerber, P., Held, B., Bloch, W., Kaestner, L., Chien, K.R., Fleischmann, B.K., Lipp, P., Flockerzi, V. and Freichel, M. (2006) Reduced cardiac L-type Ca²⁺ current in Ca(V)_{β2}^{-/-} embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circ Res*, **99**, 749-757.
- Welling, A., Ludwig, A., Zimmer, S., Klugbauer, N., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1997) Alternatively spliced IS6 segments of the alpha 1C gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca²⁺ channels. *Circ Res*, **81**, 526-532.
- Williams, M.E., Brust, P.F., Feldman, D.H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., McCue, A.F., Velicelebi, G., Ellis, S.B. and Harpold, M.M. (1992) Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science*, **257**, 389-395.
- Yaari, Y., Hamon, B. and Lux, H.D. (1987) Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science*, **235**, 680-682.
- Yang, L., Liu, G., Zakharov, S.I., Morrow, J.P., Rybin, V.O., Steinberg, S.F. and Marx, S.O. (2005) Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem*, **280**, 207-214.
- Yoshida, A., Takahashi, M., Nishimura, S., Takeshima, H. and Kokubun, S. (1992) Cyclic AMP-dependent phosphorylation and regulation of the cardiac dihydropyridine-sensitive Ca channel. *FEBS Lett*, **309**, 343-349.
- Zong, X., Schrieck, J., Mehrke, G., Welling, A., Schuster, A., Bosse, E., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1995) On the regulation of the expressed L-type calcium channel by cAMP-dependent phosphorylation. *Pflugers Arch*, **430**, 340-347.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Sven Moosmang für die kompetente Betreuung dieser Arbeit, seine freundliche und engagierte Unterstützung und die zahlreichen Anregungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann für die Aufnahme an sein Institut und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Martin Biel bedanke ich mich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit und die Berichterstattung vor der Fakultät.

Frau PD Dr. Andrea Welling und Herrn Carl Christel danke ich für die Durchführung der Elektrophysiologischen Messungen und die gute Zusammenarbeit.

Steffi und Peter, meinen Mitkämpfern in der ES-Zellkultur sowie bei den Blastozysteninjektionen, danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit, die gegenseitige Hilfsbereitschaft und die lustigen Stunden am Mikromanipulator.

Bei Angelika bedanke ich mich herzlichst für die hervorragende und tatkräftige Unterstützung im Laboralltag.

Nicole danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und den regen Austausch von Laborerfahrungen.

Bei Herrn Selahattin Sahiner und Mehmet Durmaz bedanke ich mich für die gute Betreuung des Tierstalls.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts und besonders meiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich für das nette Arbeitsklima und den freundlichen Umgang bei und nach der Arbeit. Die vielen Feiern, unsere mittäglichen „Salatrunde“ oder der Doktoranden-Stammtisch haben den Arbeitsalltag aufgelockert und viel Spaß gemacht.

Zu guter Letzt möchte ich Bastian danken für das unermüdliche Korrekturlesen und sein Verständnis dafür, dass ES-Zellen jeden Tag gehätschelt werden müssen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Toni Franziska Lemke
Geburtsdatum	07.06.1979
Geburtsort	Rüsselsheim
Familienstand	ledig

Schulbildung

1985 bis 1989	Eichgrundschule Rüsselsheim
1989 bis 1998	Max-Planck-Gymnasium Rüsselsheim Abschluss Abitur

Studium

Wintersemester 1998/99	Gasthörerschaft an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
April 1999 bis Oktober 2003	Studium der Pharmazie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Oktober 2003	2. Staatsexamen Pharmazie (Note 1,5)
November 2004	3. Staatsexamen Pharmazie (Note 1,5) Erteilung der Approbation als Apothekerin

Praktika

November 2003 bis April 2004	BioProof AG, München
Mai 2004 bis Oktober 2004	Iris Apotheke, München

Berufserfahrung

Nov 2004 bis Dez 2004	angestellte Apothekerin Iris Apotheke, München
Seit Januar 2005	Wissenschaftliche Angestellte an der TU München, Institut für Pharmakologie und Toxikologie