

**Partielle Deletion des bovinen  
 $\beta$ -Lactoglobulins durch homologe  
Rekombination zur Produktion von  
 $\beta$ -Lactoglobulin-freier Milch**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften der  
Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

**TANIA KUMMER**  
aus München

Juli 2008

Dissertation eingereicht am 8. Juli 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Februar 2009

Erstgutachterin: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	5
<b>2 Einleitung</b> .....	6
2.1 Lebensmittelunverträglichkeit.....	6
2.1.1 Nicht-toxische, immunologisch vermittelte Nahrungsmittelreaktionen.....	7
2.1.2 Nicht-toxische, nicht immunologisch vermittelte Nahrungsmittelreaktionen.....	8
2.1.3 Die Allergie.....	9
2.1.3.1 Das $T_H1/T_H2$ -Konzept.....	9
2.1.3.2 Die IgE-vermittelte Abwehrreaktion.....	9
2.1.4 Nahrungsmittelallergien.....	10
2.1.4.1 Allgemeines.....	10
2.1.4.2 Die Kuhmilch-Allergie.....	11
2.2 Erzeugung von identischen DNA-Kopien (Klonen).....	14
2.2.1 Vor- und Nachteile des Klonens durch somatischen Kerntransfer.....	15
2.2.2 Genetische Veränderung von Nutztieren.....	16
2.3 Gezielte Veränderung eines definierten Genlocus durch homologe Rekombination.....	18
2.4 Zielsetzung.....	22
<b>3 Material</b> .....	24
3.1 Abkürzungen.....	24
3.2 Chemikalien und Enzyme.....	25
3.3 Allgemeine Puffer und Lösungen.....	25
3.4 Antikörper.....	26
3.5 Bakterien.....	26
3.5.1 Bakterienstämme.....	26
3.5.2 Kulturmedien für Bakterienzellen.....	27
3.6 Eukaryotische Zellen und Gewebe.....	27
3.6.1 Primäre Zellen.....	27
3.6.1.1 Gewinnung von bovinen fetalen Fibroblasten.....	27
3.6.1.2 Vorversuche mit bovinen fetalen Fibroblasten.....	27
3.6.2 Fetales bovines Gewebe.....	28
3.6.3 Zelllinien.....	28
3.7 Oligonukleotide.....	28
3.8 Vektoren und Plasmide.....	30
3.8.1 Knockout-Vektor.....	30
3.8.1.1 Selektionsmarker und -Agenzien.....	31
3.8.2 Eukaryotischer Expressionsvektor pEGFP-N1.....	32
3.8.3 Prokaryontische Klonierungsvektoren (Subklonierung von PCR-Produkten).....	32
3.9 Digoxigenin-markierte DNA-Sonden.....	32

<b>4 Methoden</b> .....	33
4.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	33
4.1.1 Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren.....	33
4.1.1.1 Phenolextraktion.....	33
4.1.1.2 Präzipitation von Nukleinsäuren.....	33
4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	33
4.1.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	33
4.1.2.2 Gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung.....	33
4.1.3 Isolierung von Nukleinsäuren.....	34
4.1.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Zellen und Gewebe nach der Aussalzmethode.....	34
4.1.3.2 Präparation von genomischer DNA in 96M-Platten (Proteinase K-Verdau).....	34
4.1.3.3 Plasmidisolierung.....	34
4.1.3.4 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen.....	35
4.1.4 Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren.....	36
4.1.4.1 Restriktionsverdau von DNA.....	36
4.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
4.1.4.3 Reinigung von PCR-Produkten.....	39
4.1.4.4 Klonierung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten.....	39
4.1.4.5 Ligation von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten.....	39
4.1.5 Agarosegelelektrophorese.....	40
4.1.5.1 Analytische elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	40
4.1.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	40
4.1.6 Nichtradioaktive Hybridisierung.....	41
4.1.6.1 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese.....	41
4.1.6.2 Transfer von DNA auf eine Nylonmembran.....	41
4.1.6.3 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden.....	42
4.1.6.4 Immundetektion.....	42
4.1.6.5 Entfernen DIG-markierter DNA-Sonden von hybridisierten Membranen ( <i>stripping</i> ).....	43
4.1.7 Sequenzierung.....	43
4.1.7.1 Sequenzierung mit dem ALFexpress™.....	43
4.2 Arbeiten mit Bakterien.....	44
4.2.1 Lagerung.....	44
4.2.2 Transformation kompetenter Bakterien.....	44
4.3 Arbeiten mit Säugerzelllinien.....	44
4.3.1 Kultivierung und Cryokonservierung.....	44
4.3.2 Bestimmung der Mindestkonzentration eines Selektionsagens im Medium.....	44
4.3.3 Transfektion von Säugerzellen.....	45
4.3.3.1 Vorbereitung des Knockout-Vektors.....	45
4.3.3.2 Elektroporation mittels Nucleofector™ ( <i>Amaxa</i> ).....	45
4.3.3.3 Transfektion mittels liposomaler Transfektionsreagenzien.....	46
4.3.4 Selektion und klonale Expansion von transfizierten bovinen fetalen Fibroblasten.....	47

4.3.4.1 Lipofectionen.....	47
4.3.4.2 Nucleofectionen.....	47
4.3.5 Zellsynchronisierung und Nachweis.....	48
4.3.5.1 Zellzyklusarrest durch Thymidin-Block.....	48
4.3.5.2 Färbung synchronisierter Zellen und durchflusszytometrische Analyse.....	48
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
5.1 Konstruktion des Knockout-Vektors.....	49
5.1.1 Vorbereitungen.....	49
5.1.1.1 Überlegungen zur Anwendung von Anreicherungs-Strategien.....	49
5.1.1.2 Modifikation des Ausgangsvektors pKO-NTKV 1901 ( <i>Stratagene</i> ).....	50
5.1.2 Das bLG-Gen: Klonierungsstrategie.....	51
5.1.2.1 Das bLG-Pseudogen.....	51
5.1.2.2 Die bLG-homologen Vektorarme.....	52
5.1.2.3 Der KO-Vektor: Einbau von mutierten loxP-Sequenzen.....	54
5.1.3 Der Vektor pKO-bLG.....	55
5.1.4 Der Vektor pKO-bLG-SV40nls.....	56
5.2 Etablierung von PCR und Southern-Analyse zum Nachweis einer homologen Rekombination....	57
5.2.1 Die <i>nested</i> -PCR.....	57
5.2.1.1 Generierung einer Positiv-Kontrolle.....	57
5.2.1.2 Etablierung und Optimierung der <i>nested</i> -PCR.....	58
5.2.2 Die Southern-Analyse.....	60
5.2.2.1 Bestimmung der Nachweisgrenze der verwendeten 3'-Sonde.....	61
5.3 S-Phase-Synchronisierung und durchflusszytometrische Analyse.....	62
5.4 Transfektion von bovinen fetalen Fibroblasten.....	64
5.4.1 Vorbereitung des KO-Vektors.....	64
5.4.2 Nucleofectionen.....	65
5.4.2.1 Nucleofectionen von bovinen fetalen Fibroblasten der Linie 209.....	65
5.4.2.2 Nucleofectionen von bovinen fetalen Fibroblasten der Linie 207.....	67
5.4.3 Lipofectionen von bovinen fetalen Fibroblasten der Linie 209.....	68
5.4.3.1 Bestimmung der optimalen Konzentration des Lipofections-Reagenz.....	68
5.4.3.2 Lipofection mit dem Knockout-Vektor.....	69
5.5 Analyse von <i>nested</i> -PCR-positiven Populationen und Klonen.....	70
5.5.1 Analyse von <i>nested</i> -PCR-positiven Klonen aus Nucleofectionen.....	71
5.5.2 Analyse von <i>nested</i> -PCR-positiven Populationen und Klonen aus Lipofectionen.....	73
5.6 Kern- und Embryotransfer.....	76
5.7 Analyse der Feten aus Klonierungsexperimenten.....	77
5.7.1 Ergebnisse der <i>nested</i> -PCR.....	77
5.7.2 Ergebnisse der Southern-Analysen.....	77
5.7.3 Die inverse PCR.....	80
5.7.3.1 Prinzip.....	80

5.7.3.2 Analyse der Feten.....	80
<b>6 Diskussion.....</b>	<b>88</b>
6.1 Konstruktion des Knockout-Vektors.....	88
6.1.1 Anreicherungsstrategien.....	88
6.1.2 Einfluss von Fehlpaarungen.....	91
6.1.3 Linearisierung des KO-Vektors.....	91
6.2 Transfektionen.....	93
6.2.1 Lipofection versus Nucleofection.....	93
6.2.2 Versuchsbedingungen.....	95
6.3 Knockout-Ansatz nach Mir und Piedrahita.....	96
6.4 Nachweissysteme.....	98
6.5 Die Feten.....	99
6.5.1 Schlussbetrachtung und Ausblick.....	100
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>102</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>109</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>114</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>115</b>
<b>Ehrenwörtliche Versicherung.....</b>	<b>116</b>

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Allergien sind in der westlichen Welt auf dem Vormarsch und stellen deshalb für die Gesundheitspolitik eine große Herausforderung dar. In unserem Kulturkreis ist Kuhmilch ein wichtiges Nahrungsmittel. Dabei betreffen Unverträglichkeitsreaktionen gegen Kuhmilchproteine inzwischen bis zu 2,4 % der Kleinkinder, was die Kuhmilch-Allergie zu einer der wichtigsten Nahrungsmittel-Allergien macht. In einer kürzlich publizierten Studie konnte gezeigt werden, dass etwa die Hälfte der Kuhmilch-Allergiepazienten spezifische Antikörper gegen das bovine  $\beta$ -Lactoglobulin (bLG) aufweist. Da oft bereits im Säuglingsalter mit einer Nahrungsmittelsensibilisierung der Grundstein für die weitere Entwicklung bzw. Manifestation von Allergien gelegt wird, zielen alle Maßnahmen darauf ab, eine frühe Sensibilisierung und somit erste allergische Manifestationen zu vermeiden. Nach wie vor ist die einzige effiziente Therapie bei einer Kuhmilchallergie die Eliminationsdiät.

Vor dem Hintergrund der geschilderten Zusammenhänge sollte im Rahmen dieser Arbeit durch homologe Rekombination mit einem Knockout-Vektor eine genetisch veränderte bovine Zelle generiert werden, die kein bLG exprimiert. Aus dieser Zelle sollten durch anschließenden Kerntransfer bLG-defiziente Kühe geklont werden, so dass bLG-freie Milch und Milchprodukte gewonnen werden können.

Dazu wurde in der ersten Versuchsphase ein geeigneter Knockout-Vektor konstruiert, dessen wichtigste Elemente ein Selektionsmarker und zwei zum bLG-Gen homologe DNA-Bereiche sind. Letztere flankieren den Selektionsmarker und vermitteln die homologe Rekombination mit der genomischen DNA. Parallel dazu wurden effiziente Transfektionsprotokolle für die Verwendung mit bovinen fetalen Fibroblasten erarbeitet.

In der zweiten Phase wurden Testsysteme für den Nachweis der gewünschten Veränderung in den generierten Fibroblasten-Klonen etabliert. Dabei handelt es sich um die *nested*-PCR und die Southern-Analyse, die für die gegebenen Anforderungen optimiert wurden. Der Vergleich der Anzahl an PCR-positiven Klonen aus Lipofektionen und Nucleofektionen deutet darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination des bLG-Gens bei Verwendung eines liposomalen Transfektionsreagens größer ist. Zusätzlich durchgeführte Transfektionen konnten diese Tendenz bestätigen. Mit diesem Nachweissystem konnten insgesamt zwei Klone identifiziert werden, bei denen es vermutlich zur gewünschten Umlagerung des bLG-Gens gekommen ist. Beide Klone wurden in Kerntransfer-Experimente eingesetzt, woraus sich insgesamt drei Feten entwickelten.

In der dritten Versuchsphase wurden diese Feten mit den beiden oben erwähnten Verfahren analysiert. Ein Fetus wurde schließlich als negativ für die gewünschte Veränderung des bLG-Gens bewertet, bei den Zwillingfeten ist es wahrscheinlich zu einem homologen Rekombinationsereignis neben diversen nicht-homologen Integrationen des KO-Vektors gekommen.

Die in dieser Arbeit aufgezeigten Ergebnisse können maßgeblich zur Verbesserung der Effizienz von Experimenten beitragen, deren Ziel die Einführung einer definierten Veränderung in die genomische DNA einer somatischen Zelle ist. So konnte neben der Ausarbeitung effizienter Transfektionsprotokolle für fetale Fibroblasten bestätigt werden, dass eine Kombination aus NLS und S-Phase-Synchronisierung der Zellen die Anzahl an Klonen mit nicht-homologen Integrationen des KO-Konstrukts reduziert und so die Gesamteffizienz steigert.

## 2 EINLEITUNG

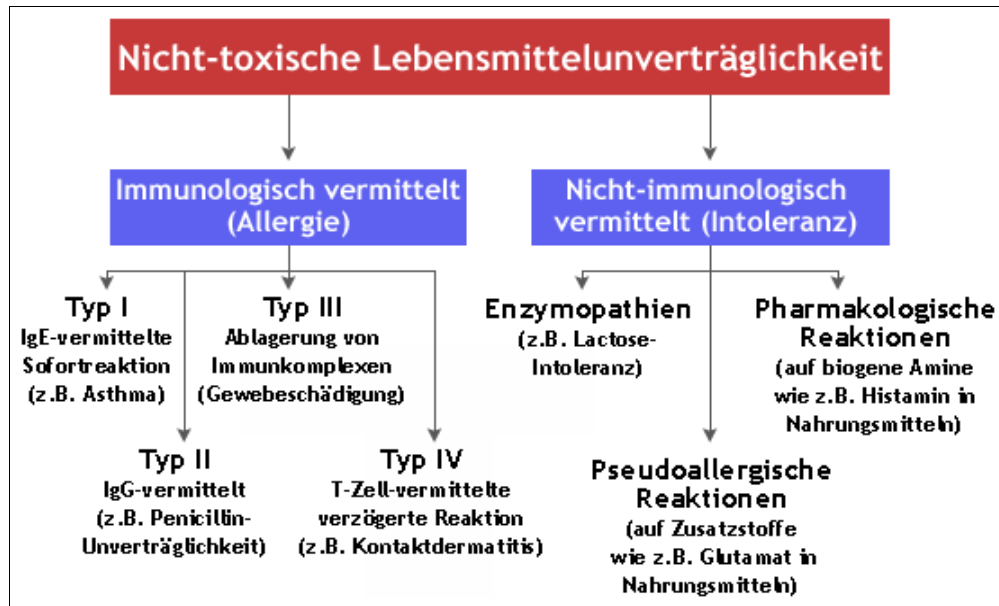
Nahrungsmittel-Allergien sind heute als universelles Problem unserer westlichen Welt bekannt und ihre Verbreitung scheint weiterhin ungebrochen [89]. Da bovine Milch in unserem Kulturkreis ein elementares Nahrungsmittel darstellt, zählen Unverträglichkeitsreaktionen gegen Kuhmilchproteine zu den heutzutage wichtigsten Nahrungsmittel-Allergien, die bis zu 2,4 % der Kleinkinder betreffen [87]. Dies lässt sich u.a. dadurch begründen, dass Kuhmilch nach der Stillphase üblicherweise als Ersatz für die menschliche Muttermilch dient und somit häufig das erste Fremdartigen darstellt, dem der Säugling ausgesetzt ist [34]. Dabei kommt dem  $\beta$ -Lactoglobulin eine besondere Bedeutung bei der Entwicklung von Sensibilisierungsreaktionen zu. So konnte in einer kürzlich publizierten Studie gezeigt werden, dass 45 % der Kuhmilch-Allergiepationen spezifische Antikörper gegen das bovine  $\beta$ -Lactoglobulin (bLG) aufweisen [71].

Die einzige effiziente Therapie bei einer manifesten Kuhmilchallergie ist nach wie vor der Verzicht auf Milch und Milchprodukte. Das könnte auch damit zusammenhängen, dass  $\beta$ -Lactoglobulin eine außergewöhnliche Stabilität in der sauren Umgebung des Verdauungstrakts aufweist und auch die Prozessierung der Milch durch v.a. Hitzebehandlung keine Abschwächung der allergenen Eigenschaften des  $\beta$ -Lactoglobulins garantieren kann. Vor diesem Hintergrund besteht ein nicht unerhebliches Interesse daran, dieses Protein aus der Milch zu eliminieren. In der vorliegenden Arbeit sollte das  $\beta$ -Lactoglobulin-Gen in bovinen Zellen auf DNA-Ebene entfernt und aus den so veränderten Zellen durch Klonen eine Kuh erzeugt werden.

### 2.1 LEBENSMITTELUNVERTRÄGLICHKEIT

Der Begriff Lebensmittelunverträglichkeit beinhaltet sämtliche reproduzierbaren Nebenwirkungen gegenüber Nahrungsmitteln, die nicht auf psychischen Faktoren beruhen [103] [25]. Unverträglichkeitsreaktionen können sowohl durch Bestandteile der genuinen Lebensmittel als auch durch beabsichtigt oder unbeabsichtigt beim Herstellungsprozess zugesetzte Stoffe ausgelöst werden. Bei der Bestimmung der Ursache einer Nahrungsmittelunverträglichkeit kann man zunächst toxische von nicht toxischen Reaktionen abgrenzen. Toxische Reaktionen sind dosisabhängig. Ein durch Verunreinigungen verdorbener Fisch, der große Mengen Histamin enthält, ist ein typischer Auslöser einer solchen Reaktion, ebenso wie Nahrungsmittel, die durch bakterielle Gifte oder Chemikalien kontaminiert sind. Bei den nicht toxischen Unverträglichkeitsreaktionen gibt es sowohl immunologische als auch nicht immunologische Mechanismen. Die nachfolgende Abbildung soll einen Überblick über die möglichen Mechanismen geben.





**Abb. 2.1: Klassifikation der nicht-toxischen Lebensmittelunverträglichkeiten.** Die Nahrungsmittel-Allergien (Hypersensibilitäten) werden nach Coombs und Gell in vier Typen eingeteilt. Bei den Intoleranzen sind nur die häufigsten aufgeführt.

### 2.1.1 Nicht-toxische, immunologisch vermittelte Nahrungsmittelreaktionen

Nicht toxische Unverträglichkeiten, die spezifisch durch das Immunsystem vermittelt werden, bezeichnet man als Überempfindlichkeits- oder Hypersensibilitätsreaktionen. Eine Überempfindlichkeitsreaktion definiert man heute als Krankheit, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem sonst harmlosen Antigen ausgelöst wird und dabei Gewebeschäden hervorrufen und zu ernsthaften Erkrankungen führen kann. Hypersensibilitätsreaktionen werden klassisch nach Coombs und Gell in vier Typen eingeteilt (Abb.2.1; Lehrbücher der Immunologie, z.B. [51] [108]):

#### Reaktionstyp I (Überempfindlichkeit vom Soforttyp)

Reaktionen vom Typ I beruhen auf IgE-Antikörpern, die mit ihrem Fc-Teil fest an spezifische Oberflächenrezeptoren (IgE-Rezeptor, FcεRI) auf Mastzellen gebunden sind. Die Bindung eines Antigens führt zur Aktivierung und nachfolgenden Freisetzung von chemischen Mediatoren aus den Mastzellen. Typische Beispiele diese Reaktion vom Soforttyp sind Asthma und systemische Anaphylaxie.

#### Reaktionstyp II

Bei Reaktionen vom Typ II werden Medikamente auf der Zelloberfläche z.B. von Erythrocyten oder Thrombocyten deponiert. Derart abgelagerte Arzneimittel dienen als Angriffsziel für IgG-Antikörper. So werden z.B. Antikörper-besetzte Zellen in der Milz durch Makrophagen aus dem Blut entfernt, die über Oberflächenrezeptoren (Fcγ-Rezeptoren) für IgG-Antikörper verfügen. Typisches Beispiel für diesen Reaktionstyp ist die Penicillinunverträglichkeit.

#### Reaktionstyp III

Reaktionen vom Typ III werden von löslichen Antigenen ausgelöst. Ursache der Symptome ist die Bildung und nachfolgende Ablagerung von Immunkomplexen im Organismus. Sind die Abbaukapazitäten durch einen Antigenüberschuss überfordert, werden die Immunkomplexe vorwiegend in den Gefäßwänden, u.a. der kleinen Blutgefäßen vieler Organe (darunter Haut, Nieren

und Nervensystem), abgelagert. Dort wird von IgG-Antikörpern entweder das Komplementsystem rekrutiert und aktiviert oder über Oberflächenrezeptoren (Fc $\gamma$ -Rezeptoren) Leukocyten, die dann ihrerseits eine Schädigung des Gewebes bewirken. Ein Antigenüberschuss wird z.B. durch Erkrankungen hervorgerufen, die ständig Antigene produzieren (chronische Virushepatitiden). Zu einer fortwährenden Ablagerung von Immunkomplexen und einem entsprechenden Krankheitsbild kommt es auch bei Autoimmunerkrankungen wie dem Systemischen Lupus Erythematoses (SLE). Als Antigenquelle fungiert hier körpereigenes Gewebe.

### **Reaktionstyp IV (Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ)**

Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ werden im Gegensatz zu den Antikörpervermittelten Reaktionen der Typen I-III durch antigenspezifische T-Effektorzellen ausgelöst. Typ IV-Reaktionen werden in drei Untergruppen eingeteilt. Bei der ersten Gruppe beruht die lokale Gewebeschädigung maßgeblich auf der Aktivität von Makrophagen, die durch die CD4<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>1-Helferzellen rekrutiert und aktiviert werden. Das chronische Asthma ist ein Beispiel für Krankheitsbilder, die in die zweite Gruppe der Hypersensibilitätsreaktionen vom verzögerten Typ gehören. Bei dieser zweiten Gruppe entsteht die Gewebeschädigung durch proteolytische Enzyme und hochtoxische Proteine von eosinophilen Granulocyten, die von CD4<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>2-Zellen aktiviert werden. Bei der dritten Gruppe von Typ IV-Reaktionen werden die Gewebeschäden direkt durch Einwirkung von T-Zellen hervorgerufen. In diesem Fall handelt es sich um CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (cytotoxische T-Zellen, CTL), die entweder durch direktes Abtöten der Zielzellen oder durch Freisetzen von Cytokinen (z.B. IFN- $\gamma$ ) Schäden hervorrufen.

Für alle Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ gilt, dass die voll ausgebildete Reaktion erst mit einer Verzögerung von 24-48 Stunden in Erscheinung tritt.

### **2.1.2 Nicht-toxische, nicht immunologisch vermittelte Nahrungsmittelreaktionen**

Die häufigsten nicht-toxischen Unverträglichkeiten entstehen ohne eine Beteiligung des Immunsystems, sind also keine Überempfindlichkeitsreaktion. Hierunter fallen enzymatische, pharmakologische und nicht definierte oder pseudoallergische Nahrungsmittelunverträglichkeiten [93] (Abb. 2.1). Bei den enzymatischen Unverträglichkeiten tritt am häufigsten die Lactoseintoleranz auf. Menschen mit Lactoseunverträglichkeit können den in der Milch enthaltenen Milchzucker nicht verdauen. Nach dem Verzehr von Milchprodukten kommt es zu erheblichen Verdauungsstörungen mit Durchfällen, Übelkeit und Bauchschmerzen. Die Hauptursache der Störung ist der genetisch bedingte Mangel des Enzyms Lactase, welches für den Abbau des Milchzuckers verantwortlich ist. Bei Kleinkindern ist die Lactase-Aktivität in der Regel noch sehr hoch. Mit zunehmendem Alter nimmt diese jedoch deutlich ab, so dass der Gendefekt unter Umständen erst in den späteren Lebensjahren erkannt wird.

Pharmakologische Reaktionen werden bei entsprechender Überempfindlichkeit durch Nahrungsmittel mit hohem Gehalt an biogenen Aminen wie z.B. Histamin verursacht. Nahrungsmittel, die reich an biogenen Aminen sein können, sind z.B. Käse (Gehalt steigt mit dem Reifegrad, besonders Emmentaler, Roquefort), Fischprodukte, Wurstwaren, Obst und Gemüse (z.B. Tomaten, Orangen, Ananas, Spinat, Walnüsse) und Genussmittel (Wein, insbesondere Rotwein, „frisch gebräutes“ Bier).

Nicht definierte oder pseudoallergische Reaktionen gleichen in ihren Symptomen den echten

Überempfindlichkeitsreaktionen und werden durch eine direkte, nicht IgE-vermittelte Degranulation der Mastzellen verursacht. Die Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Nahrungsmittelzusatzstoffe wie Konservierungsmittel (z.B. Benzoesäure), Farbstoffe (Azofarbstoffe), Geschmacksverstärker (Glutamat), Süßstoffe (Cyclamat, Saccharin) aber auch Arzneimittel und medizinische Hilfsstoffe (Acetylsalicylsäure, Röntgenkontrastmittel) und sehr saure bzw. scharfe Nahrungsmittel (Zitrusfrüchte, Meerrettich) können diese Reaktionen auslösen.

### 2.1.3 Die Allergie

Der Wiener Professor für Kinderheilkunde, Clemens von Pirquet, prägte den heute auch in der Alltagssprache häufig verwendeten Begriff der Allergie [21]. Er wollte Allergie als „veränderte Reaktionsfähigkeit“ verstanden wissen, in die der Körper nach Kontakt mit fremden Eindringlingen - Bakterien oder artfremdes Eiweiß - versetzt wird. Mit dieser genialen Erkenntnis begründete von Pirquet die Allergieforschung. Heute wird der Begriff „Allergie“ etwas anders, nämlich mit einer IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I (Reaktion vom Soforttyp) gleichgesetzt.

IgE-Antikörper werden von B-Zellen produziert und sind das Schlüsselmolekül Typ I-allergischer Erkrankungen. Die Produktion von IgE wird durch zwei Faktoren begünstigt: den Charakter des Antigens und die Art, wie dieses dem Immunsystem präsentiert wird. Obwohl die Wissenschaft noch nach den Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Allergie-auslösenden Antigenen sucht, sind bereits einige allgemeine Prinzipien erkennbar. (1) Die meisten Allergene sind relativ kleine, gut lösliche und stabile Proteine, die auf trockenen Partikeln wie z.B. Pollenkörnern oder Hausstaub transportiert werden. (2) Allergene dringen normalerweise in sehr niedriger Dosis durch Diffusion über die Schleimhäute in den Körper ein. (3) Viele Allergene sind enzymatisch aktiv (z.B. *Der p 1*, eine Cysteinprotease, die im Kot der gewöhnlichen Hausstaubmilbe vorhanden ist und heutzutage den zweithäufigsten Allergieauslöser mit ca. 25% aller Allergien darstellt) (Lehrbücher der Immunologie, z.B. [51])

Als Allergene werden Stoffe bezeichnet, die eine Allergie auslösen. Viele Allergene haben einen natürlichen Ursprung, z.B. Blütenpollen oder Insektengifte. Andere sind chemischen Ursprungs, wie z.B. Autoabgase, Parfüm oder Farbstoffe.

#### 2.1.3.1 Das $T_H1/T_H2$ -Konzept

Spezifische Immunreaktionen wie die Produktion von Antikörpern werden durch aktivierte  $CD4^+$ -T-Helferzellen vermittelt. Mosmann et al. haben 1986 erstmals formal gezeigt, dass  $CD4^+$ -T-Helferzellen auf der Basis der von ihnen produzierten Cytokine weiter unterteilt werden können [70]: Während  $T_H1$ -Zellen (oder inflammatorische  $CD4^+$ -T-Zellen) Interleukin 2 (IL-2) und Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) synthetisieren, produzieren  $T_H2$ -Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 [1] [54] [50]. Nach heutigem Verständnis wird IFN- $\gamma$  eindeutig  $T_H1$ -Zellen und IL-4 dementsprechend den  $T_H2$ -Zellen zugeordnet [1] [54] [50]. Obwohl das  $T_H1/T_H2$ -Konzept die Verhältnisse bei der Immunantwort sicherlich sehr vereinfacht darstellt, ist es dennoch geeignet, gewisse Vorgänge bei einer Immunreaktion auf Infektionen, Allergien und Autoimmunerkrankungen zu klassifizieren und das Zusammenspiel der zellulären und humoralen Komponenten zu verstehen.

#### 2.1.3.2 Die IgE-vermittelte Abwehrreaktion

Allergische Erkrankungen sind eng verbunden mit einer Dominanz von  $T_H2$ -Zellen [49]. Die

Aktivitäten von Cytokinen und kostimulatorischen Signalen von  $T_H2$ -Zellen lösen in B-Zellen den Isotypwechsel von IgM- zu IgE-Antikörpern aus. Allergische Reaktionen werden ausgelöst, wenn Allergene Rezeptor-gebundene IgE-Antikörper auf Mastzellen quervernetzen. IgE-Antikörper werden im Gegensatz zu anderen Antikörper-Klassen (IgM, IgG und IgA) bereits als Monomere vom hochaffinen  $Fc\epsilon$ -Rezeptor ( $Fc\epsilon RI$ ), der für den Fc-Teil des IgE-Antikörpers spezifisch ist, eingefangen. Die auf diesem Weg aktivierten Mastzellen setzen aus ihren Granula präformierte chemische Mediatoren frei und lösen damit die Entzündungsreaktionen aus. Sobald die IgE-Reaktion eingeleitet ist, können zusätzlich Mastzellen sowie basophile und eosinophile Granulozyten rekrutiert werden, die ihrerseits den Entzündungsprozess verstärken (Lehrbücher der Immunologie, z.B. [51]).

Die eigentliche Aufgabe der IgE-vermittelten Abwehrreaktion besteht darin, Infektionen mit Parasiten zu bekämpfen. Aus strategischen Gründen hat die Evolution dieses Abwehrsystem deshalb dort angesiedelt, wo Parasiten normalerweise in den Körper eindringen - unter der Haut, im Respirationstrakt unter den Oberflächenepithelien und in der Submucosa des Darms. Durch die massive Reduktion parasitärer Infektionen in den Industrienationen sind die IgE-vermittelten Abwehrreaktionen fast nur noch an allergischen Reaktionen beteiligt. Allergische Reaktionen kann man demzufolge als pathophysiologisches Pendant einer protektiven Immunantwort auffassen. Häufig sind die allergischen Reaktionen örtlich begrenzt. Ein Beispiel dafür ist der Heuschnupfen oder die Nesselsucht. Bei einer Ausweitung der allergischen Reaktion auf den gesamten Organismus, wie das bei einem anaphylaktischen Schock der Fall ist, kann ein lebensbedrohender Zustand eintreten.

## 2.1.4 Nahrungsmittelallergien

### 2.1.4.1 Allgemeines

Nahrungsmittelallergien können auf Grund des Sensibilisierungswegs (Erstkontakt des Allergens mit dem Organismus) in drei Typen eingeteilt werden [80].

**Typ A** betrifft Kinder unter 3 Jahren, deren Immunsystem noch nicht voll ausgereift ist und infolgedessen nur eine ungenügende orale Toleranz aufweist. Mit zunehmendem Alter bildet sich ein Teil dieser Nahrungsmittelallergien spontan zurück, doch entwickeln betroffene Kinder später meist andere Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis. Allergene mit Rückbildungstendenz sind in der Regel Kuhmilch, Hühnereiweiss und Weizen, während Reaktionen auf Erdnuss, Soja und Fisch typischerweise persistieren.

**Typ B** tritt bei älteren Kindern oder jungen Erwachsenen mit atopischer Neigung auf, wobei die Sensibilisierung unter Umgehung der oralen Toleranz über die Atemwege erfolgt. Es kommt zur Bildung von IgE-Antikörpern, die gegen Inhalationsantigene (z.B. Pollen von Bäumen, Gräsern und Kräutern oder Hausstaubmilben) gerichtet sind und über Kreuzreaktionen Nahrungsmittelproteine erkennen. In letzter Zeit sind diese Nahrungsmittelallergien in den industrialisierten Ländern deutlich häufiger geworden. Die klinische Manifestation der Beschwerden hängt von der Stabilität der auslösenden Proteine ab. Das bedeutet, sehr labile Proteine rufen nur lokale Beschwerden hervor, während stabilere Antigene auch systemische Reaktionen auslösen können.

**Typ C** ist eher selten und kann auch in höherem Alter erworben werden [102]. Im Gegensatz zu den Allergieformen A und B können auch Individuen ohne atopische Diathese den Typ C ausprägen. Das initiale immunologische Geschehen findet nach Ausreifung der oralen Toleranz im Verdauungstrakt statt, wobei die IgE-vermittelte Reaktion in der Regel nur gegen ein einzelnes, verdauungsstabiles

Nahrungsmittelprotein gerichtet ist.

Bei mehr als 40% der betroffenen Individuen äußert sich die Nahrungsmittelallergie mit Symptomen an der Haut. Weitere typische Organmanifestationen sind der Mundteil des Rachens, der Magen-Darm-Trakt und die Atemwege [32]. In der Regel treten die allergisch bedingten Beschwerden innerhalb weniger Minuten nach entsprechender Exposition auf. Die folgenreichste Reaktion auf Nahrungsmittelproteine stellt der anaphylaktische Schock dar. Über Todesfälle wurde insbesondere bei Fisch- und Erdnussallergien berichtet [121].

#### **2.1.4.2 Die Kuhmilch-Allergie**

##### **2.1.4.2.1 Allgemeine Aspekte**

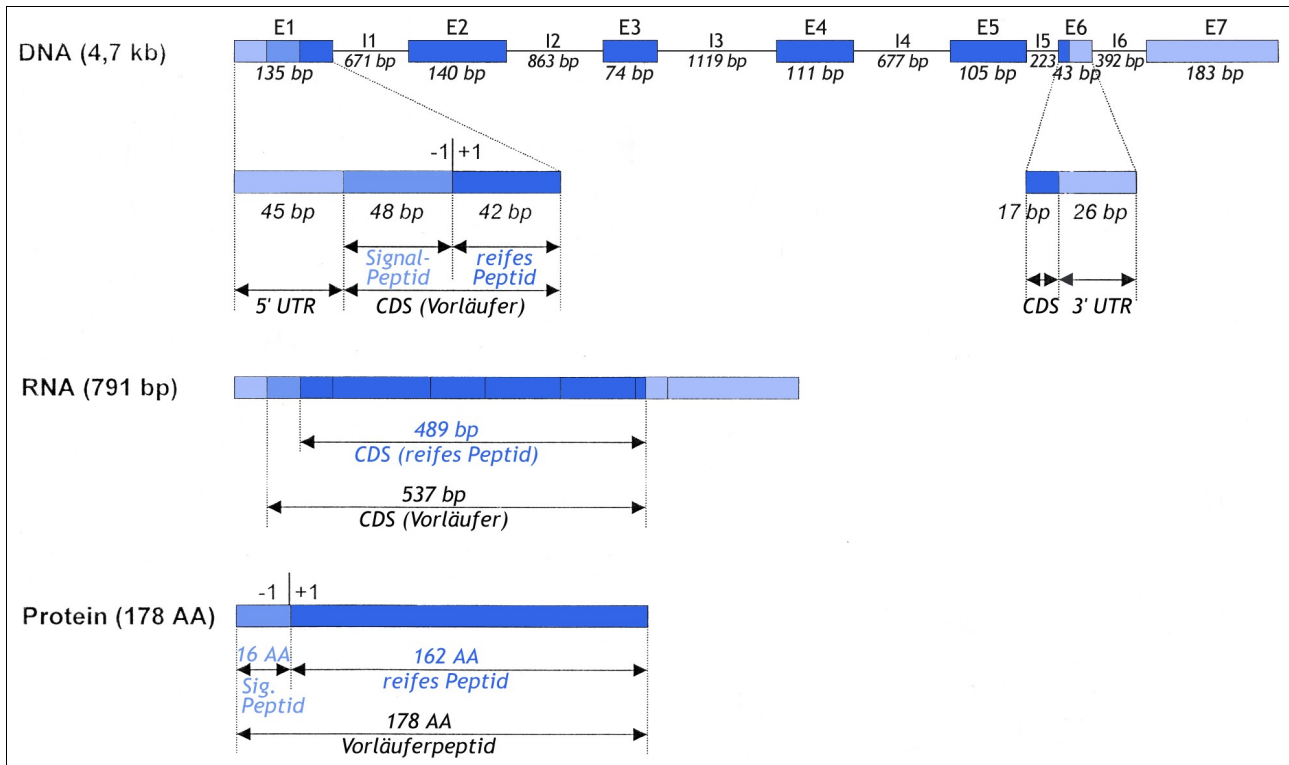
Zahlreichen Untersuchungen zufolge liegt die Prävalenz der Kuhmilch-Allergie in Deutschland für Säuglinge bei 2-5 % [114] [87]. Damit ist die Hypersensitivitätsreaktion gegen Kuhmilchproteine eine der wichtigsten Lebensmittelallergien. Im Kindes- und Erwachsenenalter ist die Häufigkeit der Kuhmilch-Allergie aber deutlich seltener als bei Säuglingen.

Ein kleiner geschichtlicher Rückblick zeigt, dass Unverträglichkeitsreaktionen im Zusammenhang mit Milch kein Phänomen unserer modernen Zeit sind. Bereits Hippokrates (400 v. Chr.) und Galen (200 n. Chr.) berichteten über Fälle, bei denen es sich nach heutigem Wissensstand um allergische Reaktionen gegen Kuhmilch gehandelt haben dürfte [13] [55]. Detailliertere Hinweise zu diesem Themenkomplex finden sich dann zunehmend in der Literatur des ausgehenden Mittelalters.

##### **2.1.4.2.2 Das bovine $\beta$ -Lactoglobulin**

Der Proteinanteil der Kuhmilch (ca. 30-35 g/l) setzt sich im Wesentlichen aus den zwei Fraktionen Casein (ca. 80%) und Molke (Lactoserum, ca. 20%) zusammen [112]. Casein ist das Strukturprotein der Milch und daher der Hauptbestandteil von Quark und Käse. Als Molke gilt die wässrige, grünlich-gelbe Restflüssigkeit, die bei der Käseherstellung entsteht. Sie besteht aus einer Gruppe verschiedener Albumine und Globuline. Dies sind im Einzelnen:  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin, Serumalbumin und Immunglobuline. Die Aminosäuresequenzen dieser Proteine sind bekannt.  $\beta$ -Lactoglobulin macht 10% der Proteinfraction der Milch bzw. 50% der Molke aus, wobei die durchschnittliche Konzentration bei 2-3 g/l liegt. Es kann in der Milch vieler Säuger nachgewiesen werden, so z.B. im Rentier [86], im Schwein [23], im Pferd [22], im Schaf [30], in der Katze [39] und im Hund [79], in der humanen Milch ist es jedoch nicht enthalten [91].  $\beta$ -Lactoglobulin gehört in die Familie der Lipocalin-Proteine und ist eines der Haupt-Milchallergene [113].

Das  $\beta$ -Lactoglobulin-Gen befindet sich auf dem bovinen Chromosom 11 [45] [107]. Es weist eine Länge von 4723 bp auf und besteht aus 7 Exons und 6 Introns (*Gene Bank Accession No. X14710*) [2]. Die ersten 45 bp des ersten Exons und die letzten 26 bp von Exon 6 entsprechen der 5'- bzw. 3'-untranslatierten Region (UTR), ebenso wie das gesamte Exon 7. Auf die 5'-UTR folgen 48 bp, die im Vorläuferprotein für das 16 Aminosäuren lange Signalpeptid codieren. Die ersten 3 bp dieser Signalpeptidsequenz (ATG) stellen den Translationsstartpunkt dar, während die letzten 42 bp von Exon 1 sowie die ersten 17 bp von Exon 6 Anfang und Ende des reifen Proteins bilden. Die mRNA hat eine Länge von 791 bp, wovon 537 bp für das Vorläufer- und 489 bp für das reife Protein codieren. Dies entspricht einer Länge von 178 bzw. 162 Aminosäuren (Abb. 2.2; [36]).



**Abbildung 2.2: bLG-Genort.** Schematische Darstellung des Genorts auf Chromosom 11 mit Organisation auf DNA-, RNA- und Proteinebene. E1-7= Exon 1 bis 7; I 1-6= Intron 1 bis 6; CDS= kodierende Sequenz; UTR= untranslatierte Region; AA= Aminosäuren; bp= Basenpaare; kb= Kilobasenpaare

Unter physiologischen Bedingungen liegt das bovine  $\beta$ -Lactoglobulin (bLG) als dimeres Molekül vor, wobei das Monomer ein globuläres Protein aus 162 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 18 kDa ist (Abb. 2.3; [36]). Eine Besonderheit des bLG sind seine hohe Stabilität unter sauren Bedingungen und Beständigkeit gegenüber der Hydrolyse. Aufgrund dieser Eigenschaften kann das Protein relativ unbeschadet durch den Magen in den Dünndarm gelangen, wo es nach Passage der Dünndarmzotten auf die Abwehrzellen in der Dünndarmschleimhaut trifft. Durch die Bindung des Proteins an spezifische IgE-Antikörper auf der Mastzelloberfläche wird eine überschießende Immunreaktion ausgelöst. Untersuchungen zur Verdauungsstabilität ergaben für die meisten Proteine sehr geringe Halbwertszeiten (HWZ: 50% des Enzyms abgebaut) von weniger als 15 Sekunden im Magen und weniger als 10 Minuten im Dünndarm. Die bekannten allergenen Proteine hingegen weisen wesentlich höhere Halbwertszeiten von bis zu 60 Minuten im Magen und bis zu 24 Stunden im Dünndarm auf [63]. Während die physikalisch-chemischen Eigenschaften des bLG weitgehend bekannt sind, ist die biologische Funktion des Proteins noch nicht endgültig geklärt. Es gehört in die Familie der Lipocalin-Proteine und bindet eine Vielzahl von verschiedenen kleinen hydrophoben Liganden wie z.B. Retinol, Fettsäuren und Vitamine [91] [56] [110]. Daher wird vermutet, dass das bLG, wie viele andere Mitglieder der Lipocalin-Familie auch, eine Funktion bei der Aufnahme und dem Transport von Nährstoffen übernimmt [91] [75].

Bisher wurden sieben verschiedene polymorphe Varianten des bovines bLG beschrieben (Allele A, B, C, D, I, J und W) [38] [37]. Die Varianten A und B sind dabei mit Abstand am häufigsten vertreten. Sie unterscheiden sich nur in zwei Aminosäuren an den Positionen 64 und 118. An Position 64 trägt die

Variante A eine Asparaginsäure und B einen Glycinrest, während an der Position 118 Variante A Valin und B Alanin enthält [91]. Da Asparaginsäure eine große polare, Glycin hingegen die kleinste unpolare Aminosäure ist, werden allein durch diese Modifikation manche Eigenschaften des Moleküls entscheidend verändert. Durch entsprechende Berücksichtigung des bLG-Genotyps von Milchkühen und Bullen bei der Zucht kann die Käsetauglichkeit der Milch deutlich verbessert werden. So ist z.B. der Ertrag an Cheddar-Käse bis zu 10% höher, wenn die Milch von Kühen verwendet wird, die bLG der B- statt der A-Variante exprimieren [47].

Zum Zeitpunkt der Themenstellung für die vorliegende Arbeit ging man davon aus, dass dem bLG ein hohes allergenes Potenzial zukommt. Verantwortlich gemacht dafür wurde ein Schleifenbereich im Protein, der acht Aminosäuren umfasst (*allergenic loop*; von Prolin an Position 48 bis Glutamin an Position 55; Abb. 2.3) [99]. Sharma et al. haben darüber hinaus gezeigt, dass derartige allergene Schleifen in verschiedenen Milchproteinen vorkommen und daraus geschlossen, dass diese charakteristischen dreidimensionalen Strukturen eine entscheidende Rolle bei der allergenen Wirkung spielen [99]. So hatten Sélo et al. zwei Jahre zuvor die Reaktivität von IgE-Antikörpern aus dem Serum von Milchallergie-Patienten gegen verschiedene Peptide des bLG untersucht [97]. Acht allergene Peptide ließen sich aufgrund ihrer Reaktivität in drei Gruppen einteilen, wobei in der ersten Gruppe rund 90% der Serumproben mit einem Peptid reagierte, das den allergenen Schleifenbereich des bLG (Aminosäuren 48-55) enthält.



**Abb. 2.3: Ribbon-Diagramm eines Monomers des bovinen  $\beta$ -Lactoglobulins.** Der allergene Schleifenbereich ist in Rot hervorgehoben (nach [99]).

Viele der Säuger-spezifischen Allergene gehören in die Familie der Lipocalin-Proteine, wobei bLG das einzige Nahrungsmittelallergen ist, während die anderen bekannten Allergene aus der Lipocalin-Familie respiratorische Allergene sind [85]. Der Grund für das allergene Potenzial der Lipocaline ist bisher noch nicht aufgeklärt.

## 2.2 ERZEUGUNG VON IDENTISCHEN DNA-KOPIEN (KLONEN)

Ein Klon ist eine ungeschlechtlich aus einem Mutterorganismus entstandene erbgleiche Nachkommenschaft. Er entsteht unter natürlichen Umständen durch vegetative Vermehrung, also durch Knospung, Sprossung oder durch Regeneration von Teilstücken (Parthenogenese). Diese eingeschlechtliche Vermehrung, bei der die Mitwirkung eines Vaters unterbleibt, ist ein in der Natur durchaus verbreitetes Phänomen. Ein Beispiel aus der Botanik sind Kartoffeln, die in der Regel als Klonpopulationen wachsen. Auch im zoologischen Bereich finden sich natürlicherweise Klone, als genetisch identische Individuen wie z.B. monozygote Zwillinge, Drillinge, etc..

In vitro können Klone auf zwei verschiedene Arten erzeugt werden: durch die Teilung eines bereits vorhandenen Embryos (*embryo splitting*, [5]) oder durch die Generierung eines Embryos mit Hilfe der Zellkerntransfer-Technik. In der Tierzucht wird üblicherweise das Verfahren des *Embryo Splitting* angewendet. Das Verfahren des Zellkerntransfers wurde bereits in den Dreißiger Jahren des vergangenen Jahrhunderts von Spemann vorgeschlagen. Dabei wird in eine enukleierte Eizelle der Kern eines differenten Individuums übertragen. Aus diesem heute als somatischer Kerntransfer (*somatic cell nuclear transfer*, SCNT) bezeichneten Verfahren entsteht ein zum Spender des Zellkerns genetisch praktisch identisches Individuum. So berichteten Briggs und King bereits 1952, dass sich nach dem Transfer von Zellkernen aus Embryonalzellen in enukleierte Froscheier Kaulquappen entwickelten [8]. McGrath und Solter konnten dann im Jahre 1983 zeigen, dass mit Hilfe einer neuen Technik der Austausch sogenannter „Vorkerne“ (frühembryonal) zur Weiterentwicklung führt, während sich Embryonen, die aus „älteren“ Kernen (nach mehreren Teilungen) hervorgegangen waren, nicht weiterentwickelten [67]. Das Dogma der Unmöglichkeit des Klonens mit differenzierten Zellen bei Säugern wurde durch diese Arbeit praktisch belegt.

Heute ist bekannt, dass es nur dann zu einer Entwicklung der rekonstituierten Zellen (Fusionskomplexe aus enukleierten Eizellen [=Cytoplasten] und übertragenen Zellkernen [=Karyoplasten]) kommen kann, wenn die übertragene Kern-DNA durch Reprogrammierung in einen Zustand versetzt wird, der es ihr ermöglicht, das Teilungsschema des Embryos wieder im Stadium der Zygote zu starten. Ein wichtiger Unterschied der DNA in frühembryonalen und differenzierten Zellen besteht in der jeweiligen Transkriptionsaktivität. Die DNA im frühen Embryo wird nicht transkribiert, die ersten Teilungen werden von RNA- und Proteinmolekülen gesteuert, die aus der Eizelle stammen und somit noch – quasi als Starthilfe – vom mütterlichen Organismus bereitgestellt werden. Erst nach - in Abhängigkeit von der Spezies - unterschiedlich vielen Teilungen wird auch das embryonale Genom aktiviert und damit entwicklungsspezifische Gene transkribiert. Bei Kernen, die sich im Expressionsstadium befinden, wird durch Kondensation des Chromatins wie sie im nicht aktivierten Cytoplasten erfolgt, die Transkription gestoppt, vorhandene mRNA degradiert und Translationsvorgänge herunterreguliert.

Mit der Erzeugung des Klonschafs Dolly durch die Übertragung des Zellkerns einer adulten Körperzelle in eine entkernte Eizelle haben Wilmut und Mitarbeiter das bald hundertjährige Dogma der Unmöglichkeit des Klonens aufgehoben [117]. Seither konnte das Verfahren des somatischen Zellkerntransfers bei weiteren Tierarten erfolgreich durchgeführt werden. So entwickelte sich das aus der Klonierung mit Mammaryzellen entstandene Kalb „Uschi“ normal und gilt als die erste erfolgreiche Wiederholung des „Dolly“-Experiments [117] beim Rind [6]. Um zu demonstrieren, dass die



Reproduktion der aus differenzierten und adulten Zellen geklonten Tiere ungestört verläuft, wurde die Kuh „Uschi“ mit dem aus einer Fibroblastenklonierung stammenden Stier „Max“ besamt. Dies führte zur Geburt eines völlig normal entwickelten, gesunden weiblichen Kalbs („Udine“) (nach G. Brem in [6]).

Auch in der humanen Stammzellforschung stößt das Verfahren des somatischen Zellkerntransfer auf außergewöhnlich großes Interesse. Die Begeisterung liegt darin begründet, dass es schon in absehbarer Zeit möglich sein könnte, mit dieser Technologie bestimmte Krankheiten (z.B. Parkinson-Syndrom, Diabetes mellitus, Alzheimer) zu heilen oder sie im Bereich der wiederherstellenden Therapie (Ersatz von normalen Zellen, Gewebe oder Organen) einzusetzen. Als Alternative zur Verwendung von embryonalem Material wird in letzter Zeit versucht, adulte Zellen zu reprogrammieren und so in den Zustand von embryonalen pluripotenten Zellen zurückzusetzen. Die erste Erfolgsmeldung über die Gewinnung menschlicher embryonaler Stammzellen mittels Zellkerntransfer durch den koreanischen Arzt Hwang, stellte sich als gefälscht heraus und wurde inzwischen widerrufen. Mittlerweile konnten Byrne et al. embryonale Stammzellen des Rhesusaffen durch somatischen Zellkerntransfer erzeugen [10]. Parallel zu dieser Arbeit haben zwei weitere Arbeitsgruppen die Problematik von einer anderen Seite aufgerollt. Sie waren in der Lage, durch Expression eines „Cocktails“ von vier Transkriptionsfaktoren, humane adulte somatische Zellen in sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) zu verwandeln, die nahezu identische Eigenschaften wie ES-Zellen zu haben scheinen [104] [120].

### **2.2.1 Vor- und Nachteile des Klonens durch somatischen Kerntransfer**

Kultivierte Primärzellen, wie z.B. fetale Fibroblasten, weisen unter Kulturbedingungen eine definierte proliferative Lebenszeit auf, was als sogenanntes *Hayflick limit* bezeichnet wird [46]. Eine Population von fetalen Fibroblasten des Schafs durchläuft in vitro etwa 80-100 Teilungen, bevor sie die Replikation einstellt [19]. Kerntransfer-Experimente können diesen zellulären Alterungsprozess scheinbar aufheben und auch mit kultivierten Zellen, die sich der Seneszenz nähern, durchgeführt werden [20].

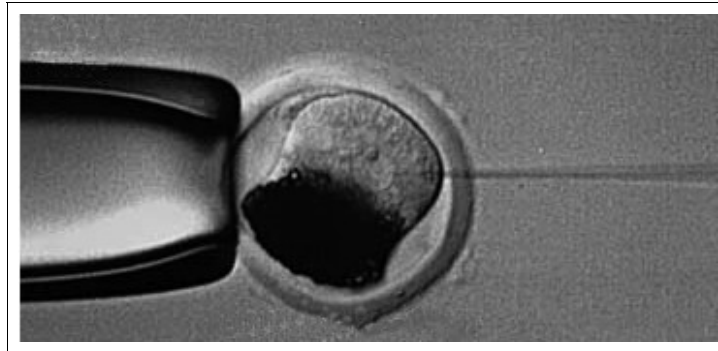
So konnten aus subcutanen Gewebezellen eines greisen Brahman-Bullen (21 Jahre) erfolgreich Nachkommen kloniert werden [48]. Möglicherweise bedeutet dies, dass die Telomerverkürzung unter bestimmten Umständen umkehrbar bzw. aufzuhalten ist, d.h. dass durch Reparaturmechanismen die ursprüngliche Länge wiederhergestellt werden kann [59]. Clark et al. führten dazu im Jahre 2003 Experimente mit Schaf-Fibroblasten durch und konnten dabei zeigen, dass das aktuelle Alter des Donorkerns keinen signifikanten Einfluss auf die Lebensspanne der aus einem Kerntransfer entstandenen Zelllinien hat [20].

Der entscheidende Vorteil des Verfahrens des SCNT liegt darin, dass sich somatische Zellen wie z.B. fetale Fibroblasten leicht von jeder Spezies gewinnen und - abgesehen von ihrer begrenzten Überlebenszeit in vitro - problemlos kultivieren lassen. Auch das Geschlecht kann von vornherein festgelegt werden. Ein überaus wichtiger Aspekt bei der Erzeugung von transgenen Tieren mit Hilfe der SCNT-Technik ist die Möglichkeit, die manipulierten Zellen schon in vitro auf eine erfolgreiche Veränderung testen zu können. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass bereits in der ersten Nachkommengeneration alle Tiere, die aus stabil transfizierten Zellen erzeugt wurden, transgen sind [118].

Das Verfahren des kerntransferbasierten Klonens verheißt vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten sowohl in der grundlagen- als auch in der anwendungsorientierten medizinischen Forschung. In der Landwirtschaft (Nutztierbereich) werden mit der Anwendung dieser Technologie insbesondere in Kombination mit transgenen Techniken Ziele wie z.B. Qualitätssteigerung, *Gene Pharming* (Verwendung transgener Tiere zur Erzeugung therapeutisch nutzbarer humaner Proteine), Steigerung der Krankheitsresistenz und Kostenreduktion verfolgt. Bevor es jedoch zu einer routinemäßigen Anwendung kommen kann, ist es notwendig, neben rechtlichen bzw. rechtsethischen Überlegungen, eine Reihe wichtiger Fragen zu klären. So weiß man bis heute nicht, warum der durchschnittliche Prozentsatz an vitalem Nachwuchs aus kerntransferbasierten Klonen bei nur 1-3% der transferierten, rekonstituierten Embryonen liegt [111] [116]. Neben der erhöhten Abortrate treten bei den überlebenden Tieren auch vermehrt Anomalien auf, die ihre Gesundheit massiv beeinträchtigen. Bei Kälbern, die durch kerntransferbasiertes Klonen erzeugt wurden, kann man öfters eine als *large offspring syndrome* bezeichnete Anomalie beobachten, die mit einem deutlich erhöhten Geburtsgewicht assoziiert ist [115]. Diese Fehlerquellen müssen zuvor genau und im Einzelnen erforscht werden, bevor es zu einer relevanten und effizienten Anwendung dieser Technologie kommen kann.

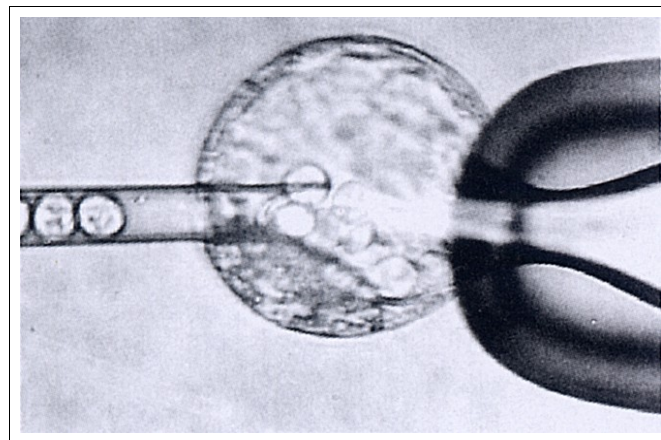
### **2.2.2 Genetische Veränderung von Nutztieren**

Die Isolierung von pluripotenten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) aus Blastozysten der Maus wurde erstmals 1981 von Martin et al. und Evans & Kaufman beschrieben [65] [33]. Embryonale Stammzellen der Maus werden heute routinemäßig für Forschungszwecke, beispielsweise zur Erzeugung von Nachkommen mit gezielten genetischen Veränderungen verwendet. Dies beruht auf der bemerkenswerten Eigenschaft dieser Zellen, nach dem Einbringen in eine Blastozyste (Abb. 2.5) und dem nachfolgenden Transfer in scheinchwangere Mäuse an der Entwicklung aller fetalen Gewebe, inklusive der Keimbahn, beteiligt zu sein. Aus den chimären Nachkommen kann durch entsprechende Kreuzung eine vollständig veränderte Maus generiert werden [81]. Allerdings ist es bislang nur bei der Maus gelungen, genetisch manipulierte ES-Zellen so stabil in die Keimbahn des Empfängertiers zu integrieren, dass die genetische Veränderung an die nächste Generation weitergegeben werden kann [83].



**Abbildung 2.4: Injektion von DNA in eine befruchtete Eizelle.** Im rechten Teil der Abbildung ist die Injektionspipette zu sehen, mit der im linken Teil sichtbaren Haltepipette wird die Eizelle (Mitte) fixiert.

Die Möglichkeit, auch bei anderen Spezies genetische Veränderungen einzubringen, wurde durch die Technik der Mikroinjektion von exogener DNA in den Pronucleus einer befruchteten Eizelle eröffnet (Abb. 2.4; [41] [7]). Trotz der vergleichsweise geringen Effizienz (1-4% transgene Nachkommen pro transferierter mikroinjizierter Zygote) wurde diese Methode bisher erfolgreich bei verschiedenen Nutztieren (Rind, Schaf und Schwein) angewendet [72].



**Abbildung 2.5: Injektion von transfizierten ES-Zellen in eine Blastocyste der Maus.** Im linken Teil der Abbildung ist die Injektionspipette mit den ES-Zellen zu sehen, während die Blastocyste mit Hilfe der Haltepipette (rechter Teil) fixiert wird.

Daneben wurden weitere Methoden zum Einbringen von Fremd-DNA entwickelt, wie z.B. der Spermien-vermittelte DNA-Transfer [35] [15] [60], die intracytoplasmatische Injektion von transgenen Spermienköpfen (ICSI; *intracytoplasmic sperm injection*) [78] [77] und die Verwendung von retroviralen Vektoren zur Injektion bzw. Infektion von Oocyten oder Embryonen [44] [14] [11].

Die Möglichkeit, somatische Zellen *in vitro* genetisch zu verändern und daraus mit Hilfe der Technik des SCNT Tiere zu generieren, stellte eine Alternative zu den beschriebenen Methoden dar. Der

entscheidende Vorteil dabei ist, dass die Integration und Expression des Transgens zuvor *in vitro* überprüft werden kann und alle Zellen der durch Klonierung erzeugten Tiere einen identischen Genotyp aufweisen. Erste Erfolge bei Schaf und Rind wurden bereits in den Jahren 1997 und 1998 von Schniecke et al. und Cibelli et al. publiziert [92] [17]. Diesen beiden Arbeitsgruppen gelang es, stabil mit einem Transgen transfizierte fetale Fibroblasten erfolgreich in ein Kerntransferexperiment einzusetzen. Basierend auf diesen Erfolgen mit willkürlich integrierten DNA-Konstrukten wurde diese Technik daraufhin auch eingesetzt, um Tiere mit einer genetischen Veränderung an einem definierten Locus zu erzeugen. McCreath et al. berichteten im Jahre 2000 von der gezielten Manipulation des ovinen  $\alpha 1$ -Procollagen-Locus (COL1A1), in den das humane  $\alpha 1$ -Antitrypsin-Gen durch homologe Rekombination eingebracht wurde [66]. Mit diesem Experiment wurde zum ersten Mal gezeigt, dass es möglich ist, primäre fetale Fibroblasten *in vitro* gezielt zu verändern und anschließend aus diesen manipulierten Zellen durch Kerntransfer lebensfähige Tiere zu erzeugen. Wenig später wurde von Denning et al. zum ersten Mal ein Gen in fetalen Fibroblasten erfolgreich ausgeschaltet [28]. Der Arbeitsgruppe gelang es, die für die Expression essentiellen Teile der ovinen Gene für die  $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferase (GGTA1) und das Prionprotein (PrP) durch homologe Rekombination mit einem entsprechenden DNA-Konstrukt zu deletieren. Auch aus diesem Experiment gingen mehrere Lämmer hervor, die eine heterozygote Deletion der entsprechenden Genregion aufwiesen. Allerdings überlebte keines der Tiere länger als 12 Tage. Im Jahr 2002 konnte der GGTA1-Locus auch im Schwein ausgeschaltet werden. Die Arbeitsgruppen Lai et al. und Harrison et al. konnten, unabhängig voneinander, das  $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferasegen in fetalen Fibroblasten erfolgreich verändern [58] [43]. Allerdings haben nur Lai et al. über die Geburt von gesunden Ferkeln berichtet. Bis zu diesem Zeitpunkt war nur über die erfolgreiche Deletion von transkriptionell aktiven Genen berichtet worden. Das änderte sich dann im Jahre 2004, als die Gruppe um Kuroiwa das Prionprotein-Gen (PRNP) und das in Fibroblasten transkriptionell inaktive Gen für die schwere Kette eines Immunglobulins (IGHM) in bovinen fetalen Fibroblasten ausschaltete [57]. Bis zum heutigen Zeitpunkt liegt jedoch kein Bericht über die Geburt von doppeltnegativen Kälbern vor.

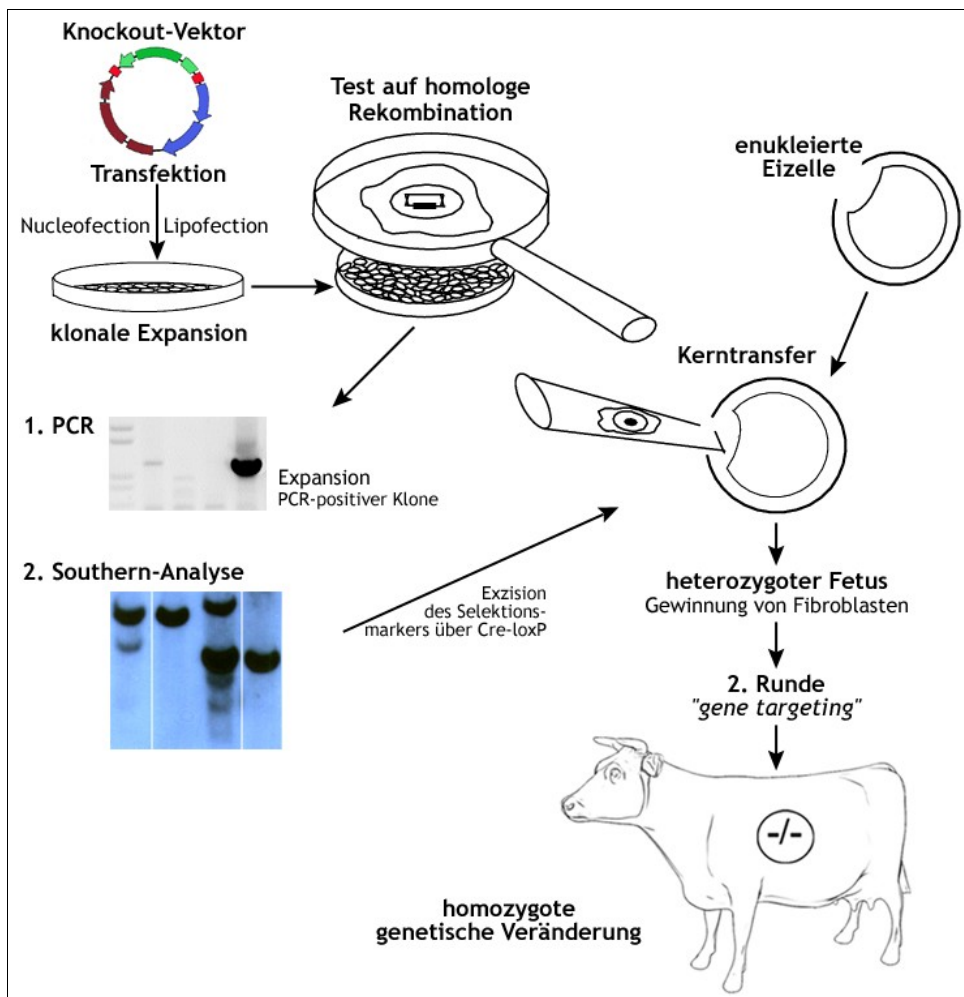
### **2.3 GEZIELTE VERÄNDERUNG EINES DEFINIERTEN GENLOCUS DURCH HOMOLOGE REKOMBINATION**

Austausch und Neu-Arrangement von DNA-Abschnitten sind eine der Ursachen für die genetische Variabilität von Organismen und ein wesentlicher Faktor der Evolution. Dieser natürliche, vom Zufall abhängige Vorgang wird als Rekombination bezeichnet. Von homologer Rekombination spricht man, wenn identische DNA-Bereiche zwischen homologen Chromosomen wechselseitig ausgetauscht werden. Säugerzellen nutzen beispielsweise diese Fähigkeit zur Neukombination des Erbgutes während der Meiose. Für die Entdeckung dieses Mechanismus erhielt Joshua Lederberg 1958 den Nobelpreis. Homologe DNA-Sequenzen können jedoch nicht nur zwischen Chromosomenpaaren ausgetauscht werden. Ein Austausch ist auch zwischen einem Chromosom und einem künstlich in die Zelle eingebrachten DNA-Molekül (Vektor) möglich. Allerdings müssen dafür sowohl der Vektor als auch das Chromosom DNA-Abschnitte mit identischer oder sehr ähnlicher Nukleotidsequenz enthalten.

Durch die bahnbrechenden Arbeiten von Martin Evans, Mario Capecchi und Oliver Smithies, für die ihnen 2007 der Nobelpreis für Medizin und Physiologie verliehen wurde, können Gene heutzutage

gezielt ausgeschaltet werden (*Knockout*-Verfahren, siehe Abb. 2.6). Sie entwickelten die Technologie des *Gene Targeting*, die sich des natürlichen Mechanismus der homologen Rekombination bedient. Durch den *Knockout* einzelner Gene ist es z.B. möglich, ihre Funktion im lebenden Organismus zu untersuchen. Bei dem *Knockin*-Verfahren besteht das Ziel darin, fremde Gene zusätzlich zu exprimieren, endogene Gene (Wildtyp-Gene) durch veränderte Versionen zu ersetzen oder durch Manipulation des endogenen Promoters die Regulation bzw. Expression von Genen zu verfolgen. Bei der gezielten Veränderung eines definierten DNA-Bereichs durch homologe Rekombination greifen mehrere Themenkomplexe ineinander:

- die Art der Manipulation, die eingeführt werden soll (*Knockin*, *Knockout*), was den grundlegenden Aufbau des Vektors vorgibt
- die Selektionsstrategie (Selektionsmarker, Anreicherung)
- die Technik, mit Hilfe derer die Fremd-DNA eingebracht wird (z.B. Nucleofektion, Lipofektion)
- die Nachweismethoden (z.B. PCR, Southern-Analyse)



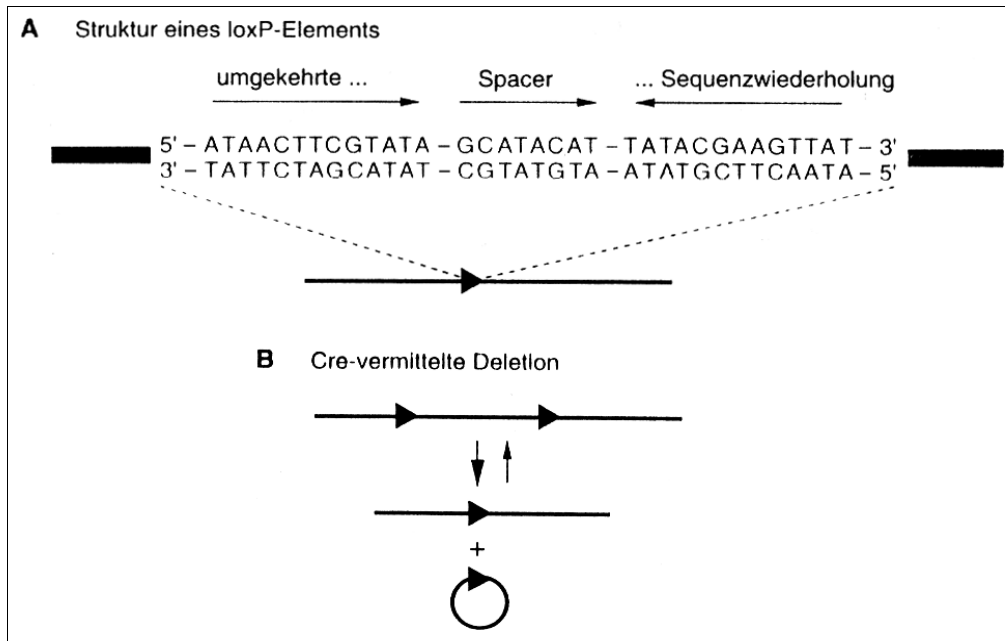
**Abbildung 2.6: Gezielte genetische Veränderung eines Genorts durch homologe Rekombination und anschließenden Kerntransfer.**

Die Konstruktion eines *Knockout*-Vektors steht am Anfang eines jeden *Gene Targeting*-Experiments. Die zum Zielgen weitgehend homologe Nukleotidsequenz des *Knockout*-Vektors wird *in vitro* hergestellt

und dabei so verändert, dass das entstehende Protein nach einer erfolgreichen homologen Rekombination seine Funktion verloren hat oder, wie in der vorliegenden Arbeit vorgesehen, nicht mehr transkribiert werden kann. Zusätzlich enthält der *Knockout*-Vektor DNA-Sequenzen, die in der Nukleotidabfolge mit DNA-Bereichen, die sich vor und hinter dem Zielgen befinden, identisch sind. Diese DNA-Bereiche sichern die Aufnahme (durch homologe Rekombination) des Vektors an der richtigen Stelle im Erbgut des Zielorganismus. Dadurch lässt sich ein definierter Bereich der genomischen DNA durch exogene Vektor-DNA ersetzen.

Da die Transfektionseffizienz und vor allem die *Targeting*-Frequenz sehr niedrig sein können, ist es empfehlenswert, positive und/oder negative Selektionsmarker zu integrieren. Durch sie wird eine starke Selektion für das Rekombinationsprodukt gewährleistet [12]. Der positive Selektionsmarker wird dabei zur Isolierung derjenigen Zellen verwendet, bei denen die Vektor-DNA stabil ins Genom integriert worden ist. Ein negativer Selektionsmarker hingegen wird benutzt, um gegen eine zufällige Integration des *Knockout*-Vektors zu selektieren (Anreicherung homolog rekombinierter Klone). Eine solche Strategie ist bei der Arbeit mit ES-Zellen nicht zwingend erforderlich, da die absolute Häufigkeit eines homologen Rekombinationsereignisses hier um Größenordnungen über der von somatischen Zellen liegt [4] [42] [9]. Bei der Arbeit mit somatischen Zellen wird die Ausbeute, trotz des Einsatzes verschiedener Anreicherungs-Strategien, durch die geringe Frequenz von homologen Rekombinationsereignissen in Säugerzellen und die hohe Rate von zufälliger, also nicht-homologer Integration limitiert. Homologe Rekombination findet im Allgemeinen mit einer Frequenz von einem Ereignis pro  $10^5$  bis  $10^7$  behandelten Zellen statt [90], die Frequenz von nicht-homologer Integration liegt dagegen bei etwa einem Ereignis pro  $10^2$  bis  $10^4$  Zellen [84]. Trotzdem die Vorteile von Anreicherungs-Strategien auf der Hand liegen, können Aufbau und transkriptionelle Aktivität des betreffenden Gens dafür verantwortlich sein, dass auf die Anwendung einer solchen Strategie verzichtet werden muss.

Seit mehreren Jahren wird das Cre-loxP-System des Bakteriophagen P1 zur gezielten Manipulation der genomischen DNA von Säugerzellen eingesetzt. In diesem Kontext hat es insbesondere bei der Herstellung gewebsspezifischer *Knockout*-Mäuse große Bedeutung erlangt. Das Cre-loxP-System wird aber auch eingesetzt, um unerwünschte DNA-Elemente, wie z.B. Selektionsmarker in manipulierten Zellen, sicher zu entfernen. Die Cre-Rekombinase (*causes recombination*) katalysiert die Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen (*locus of crossing over of P1*), wobei das zwischen den loxP-Elementen liegende DNA-Stück herausgeschnitten wird (Abb. 2.7). Als „Fremd-DNA“ verbleibt lediglich eine 34 bp lange loxP-Sequenz im Genom. Wenn die beiden loxP-Sequenzen in gleicher Orientierung auf verschiedenen DNA-Strängen liegen, kann es auch zu Cre-vermittelten Translokationen kommen. Diese Situation tritt beispielsweise bei einem homozygoten *Knockout* auf. Werden aber in die beiden loxP-Elemente geringfügige, individuelle Mutationen eingeführt, können unerwünschte Translokationen verhindert werden.

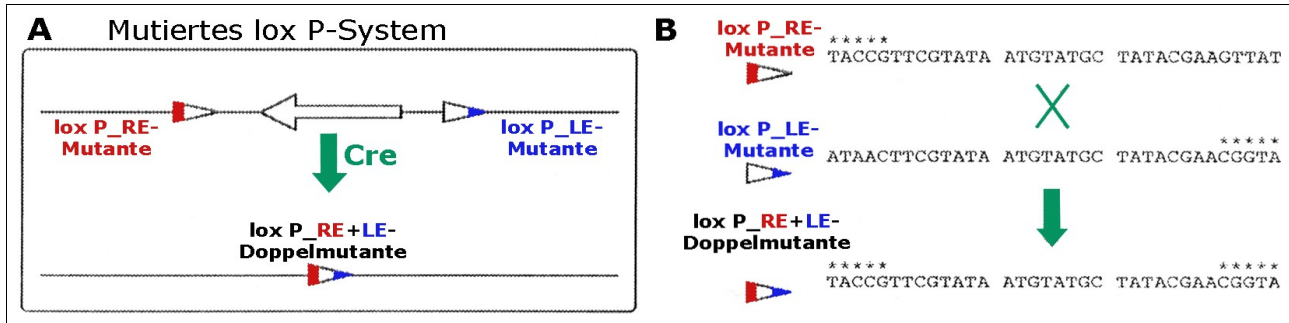


**Abbildung 2.7: Cre-loxP-System.** A- Struktur eines loxP-Elements und B- Cre-vermittelte Exzision eines zwischen zwei loxP-Elementen liegenden DNA-Abschnitts. Ein einzelnes loxP-Element ist 34 bp lang und besteht aus einer 13 bp langen Sequenz, gefolgt von einem 8 bp langen *spacer*, nach dem die anfängliche Sequenz in umgekehrter Abfolge wiederholt wird. Nach einer Cre-bedingten Exzision der DNA verbleibt lediglich ein loxP-Element in der Sequenz.

In der Literatur werden mutierte loxP-Sequenzen beschrieben, bei denen die ersten (loxP\_RE) bzw. die letzten (loxP\_LE) 5 bp abgewandelt sind [3]. Die durch die Rekombination entstandene Sequenz, bei der sowohl die ersten als auch die letzten 5 bp verändert sind, kann von der Cre-Rekombinase nicht mehr erkannt werden (Abb. 2.8).

Darüber hinaus wurden membrangängige Varianten der Cre-Rekombinase entwickelt, wobei das aktive Enzym mit einer Domäne fusioniert wurde, die den Transport über die Zellmembran hinweg vermittelt [53] [76]. Der Vorteil dabei ist, dass diese Form der Cre-Rekombinase dem Kulturmedium der Zellen zugesetzt wird und nicht durch eine erneute Transfektion eingebracht werden muss.

Transgene Tiere sind dadurch definiert, dass sie ein experimentell eingeführtes (Fremd-)Gen stabil in ihrem Genom integriert haben, welches nach den mendelschen Regeln vererbt wird. Dabei waren es insbesondere transgene Mäuse, die sehr viel zum Verständnis grundlegender Zusammenhänge in der Immunologie beigetragen haben. Zum ersten Mal im Jahr 1982 wurde eine derartige Manipulation bei der Maus durchgeführt [73]. Über das erste transgene Nutztier berichteten dann McCreath et al. im Jahr 2000 [66].



**Abbildung 2.8: Cre-loxP-Rekombinase-System mit mutierten loxP\_RE- bzw. loxP\_LE-Elementen.** Das nach einer Cre-vermittelten Exzision in der DNA verbleibende rekombinierte loxP-Element wird von der Cre-Rekombinase nicht mehr erkannt, so dass dieser DNA-Abschnitt im Folgenden nicht mehr verändert werden kann. Asteriske bezeichnen von der ursprünglichen loxP-Sequenz abgewandelte Basen.

In der Grundlagenforschung erhofft man sich von transgenen Tieren einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der in vivo-Regulation und -Funktion von Genen. Zunehmend wurden auch transgene Tiermodelle für menschliche Erkrankungen etabliert. Diese tragen einerseits dazu bei, die Anzahl herkömmlicher Tierversuche zu vermindern, weil sie unter anderem eine viel größere Annäherung an das zu untersuchende Krankheitsbild des Menschen bieten. Andererseits scheint das Potential an Möglichkeiten der Forschung mit transgenen Tieren unerschöpflich zu sein. Als Konsequenz steigen die Tierversuchszahlen an, was durch aktuelle Tierversuchsstatistiken bestätigt wird.

Ist der molekulare Mechanismus für eine Erkrankung verstanden, wird es möglich, gezielt nach Substanzen zu suchen, die diese Krankheit direkt an ihrer molekularen Ursache beeinflussen. Dazu gehört die Entwicklung neuer Arzneimittel, bei deren Produktion transgene Tiere eine immer größere Rolle spielen (*Gene Pharming*).

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet für transgene Tiere findet sich in der Landwirtschaft. Hier besteht ein großes Interesse daran, Tierrassen mit verbesserten agrikulturellen Eigenschaften zu erzeugen. So sollen etwa Arzneimittel- und Impfkosten durch krankheits- und stressresistentere Tiere eingespart werden, eine bessere Futterverwertung und schnelleres Wachstum sollen für eine höhere Gewinnspanne sorgen (z.B. gentechnisch veränderter Lachs). Auch die Fleisch- oder Milchqualität wird den Ansprüchen der Verbraucher angepasst, indem sich beispielsweise fettarme Fleischprodukte und laktosefreie Milch mit Hilfe von Genmanipulation gewinnen lassen.

## 2.4 ZIELSETZUNG

Die bis heute einzige effiziente Therapie bei einer Kuhmilchallergie ist die Eliminationsdiät. Das bedeutet, dass betroffene Personen vollständig auf den Genuss von Kuhmilch, aber auch - auf Grund der Kreuzreaktivität spezifischer IgE-Antikörper durch die hohe Konservierung der allergenen Milchproteine im Verlaufe der Evolution - auf Schaf- und Ziegenmilch, verzichten müssen. Die Hitzebehandlung, der die Milch standardmäßig unterzogen wird, kann die allergenen Eigenschaften der darin enthaltenen Proteine zwar verändern und in vielen Fällen auch verringern. Jedoch kann die Denaturierung durch Hitze und das Entfalten des Proteins neue allergene Epitope zugänglich machen, wie es z.B. beim  $\beta$ -Lactoglobulin-Protein der Fall ist [26] [100].

Vor dem Hintergrund der geschilderten Zusammenhänge war das Ziel der vorliegenden Arbeit,  $\beta$ -Lactoglobulin-freie Milch zu erzeugen, indem das bovine  $\beta$ -Lactoglobulin bzw. entscheidende Teile



davon auf genomischer Ebene entfernt werden. Mit Hilfe eines Knockout-Vektors sollte durch homologe Rekombination in fetalen Fibroblasten eine Zelle generiert werden, in der die für die Transkription des bLG-Gens erforderlichen Elemente in Exon 1 und zusätzlich das Exon 3, das den allergenen Schleifenbereich enthält, eliminiert wurden. Durch anschließenden Kerntransfer in eine enukleierte Eizelle sollte eine Kuh geklont werden, die kein bLG exprimiert, um letztendlich  $\beta$ -Lactoglobulin-freie Milch und Milchprodukte zu gewinnen.

## 3 MATERIAL

### 3.1 ABKÜRZUNGEN

(m)Ak	(monoklonaler) Antikörper
ALF	Automatischer Sequenzierer mit Laserdetektion ( <i>automated laser fluorescence</i> )
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bLG	$\beta$ -Lactoglobulin
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
$\beta_2$ m	$\beta_2$ -Mikroglobulin
BSA	bovines Serumalbumin
CDP-STAR™	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)- tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ] decan}-4-yl)phenyl phosphate
d	Desoxy-
dd	Didesoxy-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<u>E</u> thylend <u>ia</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> ccet <u>a</u> t
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellscanner (Durchflusszytometer)
FCS	fetales Kälberserum
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
IAA	Isoamylalkohol
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ -D-Galactosid
KO	<i>Knockout</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren ( <i>non essential amino acids</i> )
nPCR	<i>nested-PCR</i>

PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PI	Propidiumiodid
RnaseA	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
T <sub>A</sub>	Anlagerungstemperatur ( <i>annealing temperature</i> )
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur ( <i>melting temperature</i> )
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TPE	Tris-Phosphat-EDTA-Puffer (=„Loening E“)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Einheit für die Enzymaktivität ( <i>unit</i> )
üN	über Nacht
UT	untranslatierter Bereich
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
6M-Platte	6-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte
24M-Platte	24-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte
96M-Platte	96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte

### 3.2 CHEMIKALIEN UND ENZYME

Alle Chemikalien und Enzyme wurden im Regelfall vom jeweils preisgünstigsten Anbieter bezogen. Bei Bevorzugung eines bestimmten Herstellers ist dies im Text angegeben.

### 3.3 ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Wasser („MilliQ“) aus einer *MilliQ PLUS*-Anlage (Millipore Corporate Headquarters, 290 Concord Rd. Billerica, MA 01821, USA) angesetzt und anschließend autoklaviert oder aus bereits autoklavierten Stocklösungen hergestellt. Die Laufpuffer für die Gelelektrophorese und Waschpuffer für die Immundetektion wurden mit autoklaviertem, deionisiertem Wasser (H<sub>2</sub>O deion.) angesetzt.

DEPC-behandeltes H <sub>2</sub> O	0,1% DEPC in MilliQ lösen, Inkubation 6 h 37°C, anschließend autoklavieren; für RNA
PBS	139,9 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 einstellen
10x PCR-Puffer <i>Am</i> (Amersham)	100 mM Tris/HCl, pH 9,0 15 mM MgCl <sub>2</sub> 500 mM KCl
10x PCR-Puffer <i>Ag</i> (Agrobiogen)	677 mM Tris/HCl, pH 8,8 166 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 % Tween-20
10x TBE-Puffer	1 M Tris 830 mM Borsäure 10 mM EDTA
50x TAE-Puffer	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
10x TPE-Puffer (Loening E)	360 mM Tris 300 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 10 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 0,1 mM EDTA

### 3.4 ANTIKÖRPER

alkalische Phosphatase-gekoppelter Antikörper für die Southern-Analyse:

Schaf-anti-Digoxigenin, Fab-Fragment aus dem Verdau eines IgG-Moleküls mit Papain (*Roche Diagnostics/ Applied Sciences*, Penzberg, Deutschland)

### 3.5 BAKTERIEN

#### 3.5.1 Bakterienstämme

Es wurden die Bakterienstämme *TOP10F'* (aus dem *TOPO TA Cloning® Kit Version R for Chemical Transfection*) sowie *Subcloning Efficiency™ DH5α™ Chemically Competent E.Coli* und *Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells* von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

*E. coli* DH5α

F<sup>-</sup>, φ80*lacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *bsdR17*(r<sub>K-</sub>, m<sub>K+</sub>), *pboA*, *supE44*, λ *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

*E. coli* TOP10F'

F<sup>'</sup>{*lacI*<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)}<sup>mcrA</sup> Δ(*mrr-bsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15  
Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>)  
*endA1* *nupG*

### 3.5.2 Kulturmedien für Bakterienzellen

MEDIUM	ZUSAMMENSETZUNG
LB-Medium	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 17 mM NaCl; pH 7,5
SOC-Medium	2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM NaOH, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glucose; pH 7,0
2x Einfriermedium (100 ml)	1,26 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,36 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,09 g Na-Citrat, 0,018 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 0,18 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 8,8 ml Glycerol, add 100 ml MilliQ

### 3.6 EUKARYOTISCHE ZELLEN UND GEWEBE

Als Standardmedium wurde DMEM (*high glucose*) mit 4,5 g/l Glucose verwendet und mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 5 mM L-Glutamin (Endkonzentration; in Abhängigkeit von der Firma variiert der bereits im Medium enthaltene Anteil an L-Glutamin), 1 mM Natriumpyruvat, 1x NEAA (*non essential amino acids*), 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin und 0,1 mM β-Mercaptoethanol versetzt. Dieses Medium wird im Folgenden als Kompletmedium bezeichnet. Für die Selektion von mit dem Knockout-Vektor transfizierten Zellklonen wurde dem Medium 1,2 mg/ml G418 zugegeben und die FCS-Konzentration auf 15 % erhöht.

#### 3.6.1 Primäre Zellen

##### 3.6.1.1 Gewinnung von bovinen fetalen Fibroblasten

Die Experimente zur homologen Rekombination wurden mit bovinen fetalen Fibroblasten (BFF) durchgeführt, wobei mit zwei verschiedenen Linien (207 und 209) gearbeitet wurde. Zur Gewinnung der Fibroblasten wurden Deutsche Fleckviehkalbinnen gezielt mit dem Sperma ausgesuchter Fleckviehbullen besamt. Nach festgestellter Trächtigkeit wurden die Kalbinnen mit den Nummern 207 und 209 am 42. Trächtigkeitstag zur Fetengewinnung geschlachtet.

Zur Isolierung der Fibroblasten wurden die Feten auf Eis vom Schlachthof ins Labor transportiert. Sie wurden mehrmals in PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) gewaschen und anschließend Kopf, Gliedmassen und innere Organe entfernt. Die verbliebenen Körperteile wurden mit einer Skalpellklinge bzw. einer spitzen Schere zerkleinert und zur Auflösung des Zellverbandes für ca. 15 min in 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Das verdaute Gewebe wurde mit Pasteurpipetten noch einige Male auf- und abpipettiert, um nach Möglichkeit eine Einzelzellsuspension zu erhalten und danach mit Kulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 200 g für 10 min zentrifugiert. Nach anschließendem Resuspendieren der Zellen in Standard-DMEM wurden sie in 10 cm Kulturschalen ausplattiert und im Inkubator bei befeuchteter Luft in 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C Umgebungstemperatur bis zur Konfluenz kultiviert. Diese Primärkultur wurde als sogenannte P0 (=Passage 0) bezeichnet und entweder weiter kultiviert oder in Einfriermedium cryokonserviert.

Die Isolierung der bovinen fetalen Fibroblasten wurde von Dr. S. Müller am Moorversuchsgut in Oberschleißheim durchgeführt.

Einfriermedium: 90 % FCS, 10 % DMSO

##### 3.6.1.2 Vorversuche mit bovinen fetalen Fibroblasten

Im Jahr 2001 wurden Zellen aus beiden Linien in einem Projekt eingesetzt, das die Erstellung

transgener Rinder zur Produktion von rekombinanten Proteinen zum Ziel hatte. Im Zuge dieses Projekts wurden die Zellen genetisch verändert und anschließend für den Kerntransfer eingesetzt.

Im Rahmen von Vorversuchen für das bLG-Projekt wurden Zellen aus der Linie 209 unverändert, d.h. untransfiziert zur Klonierung mit anschließendem Embryotransfer eingesetzt. Damit sollte die Klonierungseffizienz sowie die Implantationsfähigkeit daraus entstandener Embryonen ausgetestet werden.

Zur Klonierung der Linie 209 wurden Zellen aus der 2. Passage (P2) eingesetzt. Insgesamt hatten sich bis zum Tag 7 nach dem Kerntransfer 108 transfertaugliche Embryonen entwickelt, die in 58 Empfängertiere (1-2 Embryonen pro Tier) übertragen wurden. Nach 28 Tagen konnten acht Tiere als tragend diagnostiziert werden, von denen aber fünf Empfänger innerhalb der ersten zwei Monate abortierten. Drei Trächtigkeiten blieben bis zum Geburtstermin erhalten und es wurden drei Kälber geboren. Ein Kalb musste aufgrund erhöhten Geburtsgewichtes (*large offspring syndrome*) mittels Kaiserschnitt entbunden werden und verstarb nach 24 Stunden. Die beiden verbliebenen Kälber hatten einen physiologischen Geburtsverlauf und zeigten keinerlei Veränderungen.

### 3.6.2 Fetales bovines Gewebe

Zur Gewinnung isogener DNA für die Amplifikation der homologen Vektorarme wurde der Fetus 209 (siehe vorheriger Abschnitt) nach der Entfernung von Kopf, Gliedmassen und innerer Organe und nach der Isolierung der Fibroblasten aus einem Teil des Gewebes in mehrere Gewebestücke zerteilt und bei -80°C konserviert.

### 3.6.3 Zelllinien

Mardin Darbin Bovine Kidney (MDBK)

*Zelltyp:* bovine Nierenzellen

*DSMZ Nr.:* ACC 174

*Herkunft:* Die Zellen wurden 1957 aus der Niere eines normalen adulten Stieres gewonnen und sind nicht mit BDV (*bovine diarrhea virus*) infiziert

*Referenzen:* Madin et al., *Proc Soc Exp Biol Med* 98: 574 (1958), PubMed ID 13567776

*Depositor:* Dr. R. Riebe, Friedrich-Loeffler-Institut, BFA, Insel Riems, Germany

## 3.7 OLIGONUKLEOTIDE

Neben den Bezeichnungen der Oligonukleotide und ihrer Sequenz enthalten die folgenden Tabellen Angaben zu den Reaktionsbedingungen (MgCl<sub>2</sub>-Konzentration und Anlagerungstemperatur T<sub>A</sub>). Die kleingedruckten Basen stehen für Restriktionssequenzen, die aus klonierungstechnischen Gründen an die Oligonukleotide angefügt wurden. Die farbig markierten Nukleotide stellen die loxP-Elemente (Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase) dar.

### Amplifikation bLG-spezifischer Sequenzen

BEZEICHNUNG	SEQUENZ (5'-3')	BEDINGUNGEN (MgCl <sub>2</sub> , T <sub>A</sub> )	RESTRIK- TION
bLG5'frg1s	TTC ACA GGA ACT TGG GAG ACC	2 mM, 62°C	ohne
bLG5'frg2481as	ggt acc <b>ATA ACT TCG TAT AGC ATA CAT TAT</b> <b>ACG AAC GGT AGC CTC TTA GAC AAG GAC</b>	1,5 mM, 60°C	<i>Kpn</i> I

BEZEICHNUNG	SEQUENZ (5'-3')	BEDINGUNGEN (MgCl <sub>2</sub> , T <sub>A</sub> )	RESTRIK- TION
bLG5'frg2as	GCC TCT TAG ACA AGG ACA GGT CA	2 mM, 62°C	ohne
bLG5'frg101s	aga tct AAT GAA GTC CCA GCA CAA CC	2 mM, 61°C	<i>BglII</i>
bLG5'frg946as	CAC AAG TGT CAG ATG CGA GAG GC	2 mM, 61°C	ohne
bLG5'frg232as	aga tct GGA CAG ACC AGT TAC CAG	2 mM, 57°C	<i>BglII</i>
bLG3'frg1s	TGA AGA CGA ACT CTG TCC GC	2 mM, 63°C	ohne
bLG3'frgI.as	GTT AGA TTC ATA GTG ACC GCC G	2 mM, 63°C	ohne
bLG3'frg5023s	atc gat ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAC GGT ATG AAG ACG AAC TCT G	1,5 mM, 58°C	<i>ClaI</i>
bLG3'frg5972as	gaa ttc AAG CTC CCT GCT C	1,5 mM, 58°C	<i>EcoRI</i>
bLG5972s	gtc gac GAG CAG GGA GCT TGA TTC C	3 mM, 70°C	<i>SaI</i>
bLG6158as	gtc gac GTT AGA TTC ATA GTG ACC GCC G	3 mM, 70°C	<i>SaI</i>
bLG5768-E4s	CTT TGA ATG AGA ACA AAG TCC	3 mM, 61°C	ohne
bLG7494-E7as	GAG AGC ACA GGT TTA TGC C	3 mM, 61°C	ohne
bLG7501iK	GAG TCT TTC CTG GAT GAT GG	1,6 mM, 61°C	ohne
bov-gapdh_f	CTT CAC TAC ATG GTC TAC	2 mM, 56°C	ohne
bov-gapdh_rev	ATT CAT TGT CGT ACC AGG	2 mM, 56°C	ohne

Für alle Southern-Analysen wurden bLG-spezifische Sonden eingesetzt. Die in pCR2.1-TOPO einklonierten bLG-Bereiche, die als 5'- und 3'-homologe Vektorarme dienen, wurden in eine Markierungs-PCR mit den Primerpaaren bLG5'frg1s/2as (1717 bp) bzw. bLG3'frg1s/I.as (3'-Sonde, 1136 bp) eingesetzt.

#### Amplifikation (homolog) rekombinierter Sequenzen

BEZEICHNUNG	SEQUENZ (5'-3')	BEDINGUNGEN (MgCl <sub>2</sub> , T <sub>A</sub> )
bLG-6156as	TAG ATT CAT AGT GAC CGC CGG C	2 mM, 63°C
bLG-6095as	TCT CCC AGC CTG TGT GTC TG	2 mM, 64°C
bghP(A)-2560as	TGG GCT CTA TGG CTT CTG AGG	2 mM, 66°C
PGK-3980s	TGG ATG TGG AAT GTG TGC G	2 mM, 63°C
PGK-4052s	ATG CTC CAG ACT GCC TTG G	2 mM, 64°C
iPCR3'loxP	TTC GTC TTC ATA CCG TTC G	1,6 mM, 59°C
Neo-T2	TGC CCA GTC ATA GCC GAA TAG	3 mM, 63°C

#### Amplifikation weiterer vektorieller Sequenzen

SEQUENZ (5'-3')	BEDINGUNGEN (MgCl <sub>2</sub> , T <sub>A</sub> )	RESTRIK- TION
GAG CAA GGT GAG ATG ACA GGA G	3 mM, 64°C	ohne
TAT TCG GCT ATG ACT GGG CAC	3 mM, 64°C	ohne

SEQUENZ (5'-3')	BEDINGUNGEN (MgCl <sub>2</sub> , T <sub>A</sub> )	RESTRIK- TION
TCA GAA GAA CTC GTC AAG AAG GC	2 mM, 64°C	ohne
tct aga tct AGT TAG GGG CGG GAC TAT G	1,5 mM, 65°C	<i>XhoI/BglII</i>
tct aga tct TGT GTG TCA GTT AGG GTG TGG	1,5 mM, 65°C	<i>XhoI/BglII</i>
CTG GCC GTC GTT TTA C	1,5 mM, 51°C	ohne
CAG GAA ACA GCT ATG AC	1,5 mM, 51°C	ohne

Alle Oligonukleotide - mit Ausnahme der Primer bLG5'frg2481as und bLG3'frg5023s - wurden von *MWG Biotech AG* (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Da die Oligonukleotide bLG5'frg2481as und bLG3'frg5023s jeweils eine loxP-Sequenz enthalten und daher sehr lang sind, wurden sie HPLC-aufgereinigt und von *Genset SA* (Paris, Frankreich; [www.gensetoligos.com](http://www.gensetoligos.com)) bezogen.

### 3.8 VEKTOREN UND PLASMIDE

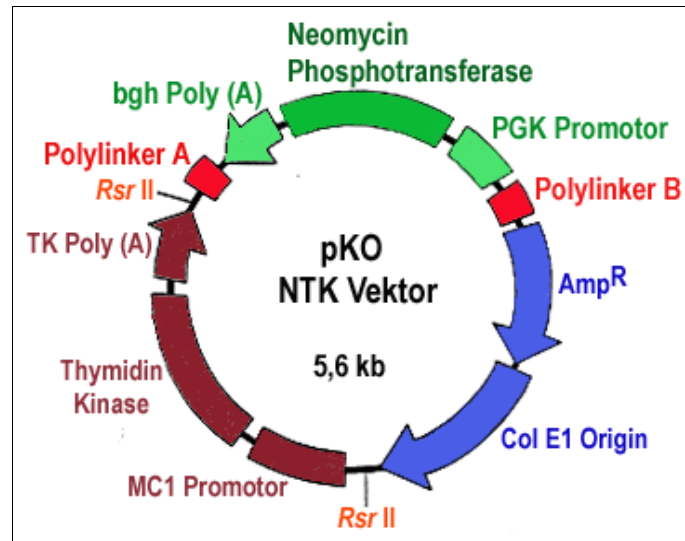
#### 3.8.1 Knockout-Vektor

Der verwendete Ausgangsvektor pKO-NTKV 1901 (*Stratagene*, La Jolla, CA, USA; Abb. 3.1) stammt aus einer Serie von Knockout-Vektoren, die als positiven Selektionsmarker das Neomycin-Resistenzgen (Neomycin-Phosphotransferase) unter der Kontrolle des PGK(Phosphoglyceratkinase)-Promotors und als negativen Selektionsmarker die HSV-Thymidinkinase unter der Kontrolle des MC1(*Mario Capecchi 1*)-Promotors enthalten.

Die beiden die positive Selektionskassette flankierenden Polylinker entsprechen multiplen Klonierungsstellen, die für jeden Vektor der Serie eine andere Kombination von Restriktionsschnittstellen aufweisen. In diese Klonierungsstellen werden die Homologiebereiche des betreffenden Gens eingebracht, die am 3'- und 5'-Ende des zu deletierenden Abschnitts liegen. Diese sollen die Integration des rekombinanten DNA-Abschnittes in das Genom über homologe Rekombination vermitteln, wobei der zwischen ihnen liegende Bereich (das *neo*-Gen) ebenfalls integriert wird.

Neben diesen Strukturen enthält der Vektor alle für die Vermehrung im prokaryontischen System notwendigen Elemente (*origin of replication*, ColE1Ori, und Ampicillin-Resistenzgen, Amp<sup>R</sup>).





**Abb. 3.1: Ausgangsvektor pKO-NTKV.** Nach Entfernung der Thymidin-Kinase-Kassette durch *Rsr* II-Restriktion wurden die bLG-homologen Vektorarme in die Polylinker A und B inkloniert.

### 3.8.1.1 Selektionsmarker und -Agenzien

#### 3.8.1.1.1 Positive Selektion: Neomycin-Phosphotransferase

Die Neomycin-Phosphotransferase vermittelt eine Resistenz gegen G418, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Aminoglycoside, welches sich aufgrund seiner toxischen Wirkung auf Bakterien, Pilze (Hefen), Protozoen und Säugerzellen besonders als selektives Agens in der molekularbiologischen Forschung eignet. Die für die Resistenz codierenden Gene (Aminoglycosid-Phosphotransferase 3' I+II) stammen ursprünglich aus dem Genom von Bakterien, lassen sich jedoch auch in das Genom höherer Zellen (Eukaryoten) einschleusen und dort zur Expression bringen, was zur Ausbildung einer G418-Resistenz führt. Die erforderliche Dosis an G418 für die Selektion resistenter Zellen variiert in Abhängigkeit vom Zelltyp und der aktuellen Phase des Zellzyklus. Dabei wird eine Zelle, die sich in der Interphase befindet, durch G418 weniger in Mitleidenschaft gezogen als eine mitotische Zelle. Doch auch bei teilungsaktiven Zellen tritt der Zelltod erst nach 3-7 Tagen ein.

#### 3.8.1.1.2 Negative Selektion: HSV-Thymidinkinase

Die Thymidinkinase phosphoryliert eine als Gancyclovir bekannte Substanz, die in der Medizin als Virustatikum Anwendung findet. Eukaryotische Zellen erwerben die Sensitivität gegenüber dieser Substanz nur durch Virusinfektion (Herpes Simplex Virus, *HSV*) oder im Experiment durch nicht-homologe Rekombination und können daher durch Kultivierung in Medium, das Gancyclovir enthält, einfach eliminiert werden. Falls eine negative Selektion nicht erwünscht ist, kann die Thymidinkinase-Kassette mit Hilfe des Restriktionsenzym *Rsr* II aus dem Vektor entfernt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die negative Selektionskassette aus dem Ausgangsvektor entfernt und die beiden bLG-homologen Bereiche (5'- und 3'-Vektorarm) in die entsprechenden Polylinker inkloniert. Der Vektor wurde im Verlauf der Arbeit mehrfach variiert: Einerseits um transient mit diesem Konstrukt transfizierte MDBK-Zellen als Positivkontrolle verwenden zu können. Zum anderen wurde der KO-Vektor, initiiert durch eine Publikation von Mir und Piedrahita (2004),

um eine SV40-Kernlokalisierungssequenz erweitert, die für einen effizienten Transport der exogenen DNA ins Zellkerninnere sorgen soll [69].

### **3.8.2 Eukaryotischer Expressionsvektor pEGFP-N1**

Der Expressionsvektor pEGFP-N1 (*GenBank Accession No.* U55762) von *Clontech-Takara Bio Europe* (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) wurde für die Transfektion der bovinen Fibroblastenlinie 209 verwendet, um die optimale Konzentration des liposomalen Reagens *Lipofectamine2000*<sup>TM</sup> zu ermitteln.

### **3.8.3 Prokaryontische Klonierungsvektoren (Subklonierung von PCR-Produkten)**

Für die Subklonierung von PCR-Produkten wurden die Vektoren pCR<sup>TM</sup>2.1-TOPO und pCR<sup>TM</sup>II-TOPO (Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz; *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

### **3.9 DIGOXIGENIN-MARKIERTE DNA-SONDEN**

Für die Southern-Analysen wurde die bLG-spezifische 3'-Sonde (950 bp) eingesetzt. Dazu wurde der in den oben beschriebenen pCR<sup>TM</sup>2.1-TOPO einklonierte bLG-Bereiche, der als 3'-homologer Vektorarm dient, in eine Markierungs-PCR (Primerpaar bLG3'frg1s/I.as) eingesetzt und das erhaltene Amplifikat auf bovine genomische DNA hybridisiert.

## 4 METHODEN

### 4.1 ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN

Um eine Kontamination der DNA mit DNasen zu vermeiden, werden alle verwendeten Lösungen, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen durch Autoklavieren sterilisiert.

#### 4.1.1 Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren

##### 4.1.1.1 Phenolextraktion

Um organische Verunreinigungen, die bei weiteren enzymatischen Reaktionen mit der DNA stören können, aus wässrigen Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurden diese mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25/24/1) gründlich gemischt. In der Lösung enthaltene Proteine werden durch das Phenol denaturiert und verbleiben nach Zentrifugation in der unteren organischen Phase oder bilden eine Interphase. Die obere wässrige Phase, in der sich die Nukleinsäuren befinden, wurde zur Entfernung von Phenolresten einer Chloroformextraktion unterzogen. Danach erfolgte die Präzipitation der Nukleinsäuren.

##### 4.1.1.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurelösung wurde mit NaCl (Endkonzentration 150-200 mM) versetzt und mit 2,5 Vol. 100 %igem Ethanol für mindestens eine Stunde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder  $\text{üN}$  bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Alternativ wurde die Fällung mit 0,6 Vol. Isopropanol durchgeführt, wobei die Präzipitation in diesem Fall nicht in der Kälte erfolgte. Nach Zentrifugation wurde das Präzipitat zweimal mit 70 % Ethanol zur Entfernung der Salze gewaschen, kurz luftgetrocknet, bis der restliche Alkohol sich verflüchtigt hatte, und die DNA schließlich in  $\text{H}_2\text{O}$  oder TE gelöst.

#### 4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

##### 4.1.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte UV-photospektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Da das Photometer ebenfalls die Extinktion bei 280 nm misst, kann man aufgrund des Verhältnisses der beiden Extinktionen ( $A_{260/280}$ ) die Reinheit der gemessenen Probe und die Herkunft eventueller Kontaminationen (z.B. mit Phenol oder Proteinen) abschätzen. Da dieser Wert abhängig ist vom pH-Wert, wurden alle Nukleinsäuren üblicherweise mit 10 mM Tris, pH 7,5 verdünnt und gegen diesen Puffer als Leerwert gemessen. Bei einem Lichtweg der verwendeten Kunststoff-Einmalküvette von 10 mm entspricht eine Extinktion von 1,0 einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  doppelsträngiger DNA und 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNA.

##### 4.1.2.2 Gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung

Bei geringen Nukleinsäurekonzentrationen und Volumina wurde die DNA-Menge anhand der Signalintensität auf dem Agarosegel abgeschätzt. Dabei diente der DNA-Längenstandard „1 kb Plus“ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), bei dem die DNA-Menge pro Bande bekannt ist, als Vergleich.

### 4.1.3 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 4.1.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Zellen und Gewebe nach der Aussalzmethode

Die mit PBS gewaschenen Zellen (ca.  $3\text{-}5 \times 10^7$ ) wurden direkt aus der Kultur oder aus tiefgefrorenen Zellsedimenten in 3 ml Kernlysepuffer (10 mM Tris, pH 8,0; 400 mM NaCl, 10 mM EDTA) resuspendiert, durch Zugabe von 0,5 % SDS lysiert und anschließend für mindestens 1 h bei 37°C mit RNase A (20 µg/ml) inkubiert. RNase A wird wie alle Enzyme von SDS inhibiert; bei einer Konzentration von 0,5 % wird die enzymatische Aktivität jedoch nur mäßig eingeschränkt und kann durch Zugabe eines überschusses an RNase A kompensiert werden. Danach wurden die lysierten Zellen für mindestens 2 h bei 37°C mit 200 µg/ml Proteinase K verdaut. Im Anschluss an den Proteinverdau wurden die Proteine durch Zugabe von 1,25 M NaCl und unter Inkubation auf Eis für 30 min gefällt und schließlich 10 min bei 3000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) abzentrifugiert. Der Überstand wurde einem zweiten Zentrifugationsschritt unterzogen und die darin befindliche DNA mit 0,6 Vol. Isopropanol präzipitiert. Anschließend wurde sie zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und schließlich in TE gelöst.

Falls genomische DNA aus Gewebe isoliert werden soll, muss dieses vorher homogenisiert werden. Dazu wurde das Gewebe in einem ausreichenden Volumen Kernlysepuffer (ca. 1 g in 3 ml) mit Hilfe des Dounce-Homogenisators in eine Einzelzellsuspension überführt, zu der dann wie oben beschrieben SDS, RNase A und später Proteinase K gegeben wurden. Der weitere Ablauf entspricht dem oben beschriebenen.

#### 4.1.3.2 Präparation von genomischer DNA in 96M-Platten (Proteinase K-Verdau)

Zur Untersuchung von klonal expandierten Zellen auf Vorliegen einer homologen Rekombination mittels *nested*-PCR und Southern-Analyse wurde die DNA jedes Klons direkt in der Vertiefung einer 96M-Platte, in der der Klon kultiviert wurde, isoliert. Dazu wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend in bei 56°C mit 50 µl/Vertiefung Proteinase K-Lysepuffer in einem befeuchteten Wärmeschrank inkubiert. Nachdem das Zelllysate etwa 1 h bei RT abgekühlt war, erfolgte die Präzipitation der DNA durch Zugabe von 100 µl 100 % Ethanol pro Vertiefung. Nachdem die 96M-Platte eine weitere Stunde möglichst erschütterungsfrei bei RT belassen wurde, kann die DNA (bei ausreichender Menge) im Mikroskop betrachtet und danach gewaschen werden. Dazu wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgeschüttelt, damit die DNA am Material der Platte haften bleibt und in jede Vertiefung 100 µl 70 % Ethanol pipettiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und die DNA anschließend luftgetrocknet. Für die Analyse in der PCR wurde sie in je 25 µl TE gelöst, für die weitere Verwendung in der Southern-Analyse wurde direkt der Restriktionsmix dazugegeben (siehe Punkt 4.1.6.1).

PBS: 139,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

Proteinase K-Lysepuffer: 10 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5 % Natriumlauryl-Sarcosine, 0,4 mg/ml Proteinase K (vor Verwendung des Puffers frisch zugeben)

#### 4.1.3.3 Plasmidisolierung

##### 4.1.3.3.1 Schnelle Plasmidisolierung nach Chowdhury [16]

Zur schnellen Überprüfung einer größeren Anzahl von Transformanten auf erfolgreiche Insertion mit Hilfe eines Restriktionsverdaus empfiehlt sich diese wenig aufwändige Art der Plasmidpräparation im

kleinen Maßstab. Der Reinheitsgrad der isolierten DNA ist für robuste enzymatische Reaktionen (wie viele Restriktionsverdauungen und PCR) ausreichend. Hierzu wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit demselben Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) eine Minute lang gründlich gemischt und 5 min zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit 1 Vol. Isopropanol versetzt und sofort 10 min zentrifugiert, das Sediment mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 50 µl TER (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, 20 µg/ml RNase A) gelöst. 5 bis 10 µl dieser DNA wurden dann in den Restriktionsverdau eingesetzt.

#### 4.1.3.3.2 Modifizierte Alkalische Lyse/PEG-Präzipitation

Die Anleitung für diese Art der Plasmidisolierung, die sehr reine DNA hauptsächlich für Transfektion und Sequenzierung liefert, wurde dem Protokoll des *ABI Prism™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit* von *Perkin Elmer* entnommen. Für die Präparation im kleinen Maßstab wurden bis zu 5 ml einer üN-Kultur bei 4000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) für 15 min zentrifugiert, das Sediment gründlich in 200 µl GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert, die Bakterienzellen mit 300 µl frisch angesetzter 0,2 N NaOH/1 % SDS lysiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die Lyse erfolgt durch vorsichtiges Kippen der Lösung, da sonst die bakterielle DNA geschert wird, was zu Verunreinigungen der Plasmid-DNA führt. Durch Zugabe von 300 µl 3,0 M Kalium-Acetat pH 4,8 wurde die Lösung neutralisiert und erneut 5 min auf Eis inkubiert, wodurch die Proteine ausfallen. Anschließend wird das Lysat 10 min bei RT zentrifugiert und der Überstand nach Zugabe von RNase A (Endkonzentration 20 µg/ml) 20 min bei 37°C inkubiert. Nach zwei Extraktionsschritten mit jeweils 400 µl Chloroform folgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und sofortige Zentrifugation für 10 min bei RT. Die präzipitierte (Plasmid-) DNA wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und wiederum in 32 µl H<sub>2</sub>O gelöst. In dem sich anschließenden zweiten Präzipitationsschritt wird nur die exogene Plasmid-DNA gefällt, indem die gelöste Gesamt-DNA mit 8 µl 4 M NaCl und 40 µl 13 % PEG<sub>8000</sub> versetzt, für 20 min auf Eis inkubiert und danach für 15 min bei 4°C zentrifugiert wurde. Die sedimentierte Plasmid-DNA wurde erneut mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10:0,1 TE gelöst.

Für die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden 50 ml üN-Kultur eingesetzt und die Bakterienzellen 10 min bei 6.000 g und 8°C (Suprafuge 2.0) zentrifugiert. Die Mengen der eingesetzten Lösungen wurden um den Faktor 10 erhöht und die Inkubationszeiten beibehalten.

#### 4.1.3.3.3 Plasmidisolierung mit dem *NucleoSpin® PlasmidKit*

In die Plasmidisolierung wurden bis zu 5 ml einer Übernachtskultur eingesetzt und nach Anleitung des Herstellers (*Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland) vorgegangen.

#### 4.1.3.4 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung von RNA aus sedimentierten eukaryotischen Zellen wurde der *peqGold TriFast®*-Kit (*PeqLab Biotechnologie GmbH*, Erlangen, Deutschland) verwendet. Der Kit enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einer einphasigen Lösung. Nach der Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf. In der oberen wässrigen Phase ist die RNA enthalten, während sich die DNA in der organischen und der Interphase befindet. Die Proteine kommen nur in der organischen Phase vor. Die Isolierung der RNA erfolgte genau nach Angabe des Herstellers.

Da RNasen ubiquitär vorkommen, schwer zu denaturieren sind und die RNA rasch abbauen, wird die

RNA in mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztem Wasser gelöst. DEPC sorgt dafür, dass der Imidazol-Stickstoff der Histidin-Reste ethyliert wird, was wiederum zur Inaktivierung der RNasen führt. Die isolierte und gelöste RNA wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.1.4 Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren

##### 4.1.4.1 Restriktionsverdau von DNA

Für die Restriktion von DNA wurden, wenn nicht anders angegeben, die vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer und -bedingungen verwendet. Das Volumen des Reaktionsansatzes wurde so gewählt, dass eine DNA-Konzentration von  $100\text{ ng}/\mu\text{l}$  und das eingesetzte Volumen des Enzyms von  $1/10$  des Reaktionsansatzes nicht überschritten wurden. Die Vollständigkeit des Verdau (Qualitätsgarantie: 1 U Restriktionsenzym verdaut  $1\text{ }\mu\text{g}$  DNA pro Stunde) wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

##### 4.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Amplifikationen wurden nach der von Saiki et al. beschriebenen Methode durchgeführt [88]. Die verwendeten Oligonukleotide mit den dazugehörigen Reaktionsbedingungen sind unter Punkt 3.7 aufgeführt.

Eine Standard-PCR-Reaktion wurde in einem Vol von  $20\text{ }\mu\text{l}$  durchgeführt und enthielt die DNA-Matritze ( $50\text{-}200\text{ ng}$  genomischer DNA,  $1\text{-}5\text{ ng}$  Plasmid oder  $1\text{ }\mu\text{l}$  cDNA), 1x PCR-Puffer,  $1,5\text{-}3\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0,2\text{ mM}$  jedes dNTP,  $5\text{-}7,5\text{ pmol}$  jedes Primers und  $0,5\text{-}1\text{ U}$  Taq-DNA-Polymerase. Die eingesetzte  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration hängt von den verwendeten Oligonukleotiden ab und wurde - ebenso wie die optimale Anlagerungstemperatur - für jedes Primerpaar experimentell ermittelt.

Die Berechnung der Schmelztemperatur für die Oligonukleotide erfolgte nach einer Formel von MWG (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland):

$$T_M = 69,3^{\circ}\text{C} + 0,41x (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650/\text{Primerlänge}; T_A = T_M + 3\text{-}5^{\circ}\text{C}$$

10x dNTP: jeweils  $2\text{ mM}$  dATP, dTTP, dCTP und dGTP in MilliQ

10x PCR-Puffer:  $100\text{ mM}$  Tris, pH 9,0,  $15\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $500\text{ mM}$  KCl

##### 4.1.4.2.1 Nachweis einer Insertion in rekombinanten Bakterien

Zur Untersuchung von transformierten Bakterien auf Aufnahme eines spezifischen Plasmids mit der richtigen Insertion wurde eine Kolonie mit einer gelben Pipettenspitze von der Agarplatte abgenommen und in  $100\text{ }\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gründlich resuspendiert.  $1\text{ }\mu\text{l}$  dieser Suspension wurde in eine Standard-PCR entweder mit vektorspezifischen M13-Primern oder mit insertionsspezifischen Primern eingesetzt, bei der die Anfangsdenaturierung auf  $10\text{ min}$  verlängert wurde, um die bakterielle Zellwand aufzubrechen.

##### 4.1.4.2.2 semi-nested- und nested-PCR zum Nachweis eines homologen

##### Rekombinationsereignisses

Diese beiden Formen der PCR basieren auf zwei separaten PCR-Runden, wobei ein Teil des PCR-Produkts aus der 1. Runde in die 2. Runde eingesetzt wird. Im Falle der *semi-nested*-PCR wird eines der beiden Oligonucleotide in beiden PCR-Runden eingesetzt, während der zweite, gegenläufige Primer so gewählt wird, das er in der 2. Runde innerhalb der Sequenz bindet, die in der 1. Runde amplifiziert wurde. Bei der *nested*-PCR (=„verschachtelte“ PCR) werden beide Oligonucleotide der 2. Runde in der Sequenz sozusagen nach innen versetzt. Mit Hilfe einer solchen PCR soll zum einen eine

höchstmögliche Sensitivität erreicht, zum anderen unspezifische Amplifikation weitgehend vermieden werden.

Für den Nachweis eines homologen Rekombinationsereignisses mittels einer *semi-nested*- oder *nested*-PCR ist es erforderlich, die verwendeten Oligonucleotide so zu wählen, dass in beiden PCR-Runden jeweils einer der beiden „genomisch“ bindet, d.h. innerhalb der bLG-Sequenz und der andere in der vektoruellen Sequenz, sodass eine Amplifikation über den rekombinierten Bereich hinweg erfolgt. Bei der hier vorwiegend durchgeführten *nested*-PCR stammen beide Oligonucleotide, die im vektoruellen Bereich binden, aus der PGK-Promotorsequenz und sind in dieser durch ca. 70 bp getrennt. Die Oligonucleotide aus dem bLG-Bereich liegen stromabwärts des als 3'-homologen Vektorarm verwendeten Bereichs.

<b>NESTED-PCR-ANSATZ</b> <b>1. UND 2. RUNDE</b>	2,0 µl	10x PCR-Puffer <i>Ag</i>
	2,0 µl	10x dNTP
	1,6 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	1,0 µl	Primer PGK-3980s bzw. PGK-4052s (5 pmol/µl)
	1,0 µl	Primer bLG-6156as bzw. bLG-6095as (5 pmol/µl)
	0,1 µl	Taq-Polymerase (10 U/µl)
	2-4 µl	genomische DNA bzw. Reaktionsansatz aus 1. Runde
	add 20 µl	H <sub>2</sub> O

<b>PCR-PROGRAMM (1. UND 2. PCR-RUNDE UNTERSCHIEDEN SICH NUR IN DER ANLAGERUNGSTEMPERATUR)</b>			
Anfangsdenaturierung		5 min	95°C
30 Zyklen	<i>Denaturierung</i>	30 sec	94°C
	<i>Anlagerung</i>	30 sec	63° bzw. 64°C
	<i>Elongation</i>	1 min	72°C
Endelongation		10 min	72°C

#### 4.1.4.2.3 Die inverse PCR

Das Prinzip der inversen PCR besteht darin, einen unbekanntem DNA-Bereich, der einen Bereich bekannter DNA-Sequenz enthält, zu amplifizieren, um ihn anschließend sequenzieren oder in weitere Analysen einsetzen zu können. Zu diesem Zweck erfolgt die Restriktion der genomischen DNA mit der Endonuclease *Nsp*I, die nicht innerhalb der bekannten Sequenz schneidet, die von den unbekanntem Bereichen umgeben ist. Das verwendete Restriktionsenzym sollte allerdings im gesamten Genom relativ häufig schneiden, damit die Fragmente nicht zu lang sind und hinterher in einer PCR amplifiziert werden können. Die so behandelte DNA wird auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt und anschließend in eine Ligation mit einem Endvolumen von 10 µl eingesetzt, bei der die einzelnen Restriktionsfragmente zirkularisieren werden sollen. Danach wurde auf die gesamte Ligation 40 µl des vorbereiteten PCR-Gemisch gegeben und der Ansatz bei den entsprechenden Reaktionsbedingungen inkubiert (siehe unten).

Die verwendeten Primer (iPCR3'loxP und bLG-5768E4s) liegen in dem bekannten Abschnitt und weisen entgegengesetzte Orientierung auf, sodass letztendlich das zirkularisierte Fragment (mitsamt der

darin enthaltenen unbekanntem Sequenz) amplifiziert wird.

Alle Ligationen wurden in Duplikaten angesetzt, wovon ein Ansatz in die inverse PCR mit gerade genannten Primern eingesetzt wurde, der andere in eine genauso konzipierte inverse PCR mit Primern (bLG-7501iK und bLG-7494E7as), die in einem anderen *Nsp* I-Fragment innerhalb des bLG-Gens binden, dessen Sequenz also vollständig bekannt ist. Diese zweite PCR, bei der immer ein definiertes Amplifikat entsteht, dient somit als interne Kontrolle für die gesamte Methode.

<b>PCR-GEMISCH (40 µL/ANSATZ):</b>	4,5 µl	10x PCR-Puffer <i>Ag</i>
	10,0 µl	dNTP (je 2 mM)
	3,2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	0,5 µl	iPCR3'loxP bzw. bLG-7501iK (100 pmol/µl)
	0,5 µl	bLG-5768E4s bzw. bLG-7494E7as (100 pmol/µl)
	0,5 µl	Taq-Polymerase (10 U/µl)
	20,8 µl	H <sub>2</sub> O

#### 4.1.4.2.4 Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden

Der Reaktionsansatz entspricht dem einer Standard-PCR-Reaktion. Es wird jedoch ein spezieller Nukleotidgemisch verwendet, in dem sich DIG-markiertes dUTP befindet, das anstelle von dTTP in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Der Erfolg der Markierungsreaktion wird auf einem Agarosegel getestet (durch den Einbau des DIG sind die PCR-Produkte größer als unmarkierte Amplifikate mit der gleichen Anzahl an Nukleotiden und laufen im Agarosegel daher langsamer) und die Menge der PCR-Sonde wie unter Punkt 4.1.2.2 beschrieben abgeschätzt.

Für die Herstellung von DIG-markierten Sonden mit einer Länge von mehr als ca. 700 bp wurden die normalen dNTP 1:1 mit einem DIG-dNTP-Gemisch [Endkonzentrationen je 0,2 mM dATP, dCTP und dGTP, 0,13 mM dTTP, 0,07 mM DIG-11-dUTP (Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphat, Alkali-labil) versetzt und die Extensionszeit auf etwa das Doppelte der für diese Amplifikation üblichen Bedingungen verlängert. Um Sonden mit definierten Enden zu erhalten, wurde als Matrize ein PCR-Produkt eingesetzt, das aus einer Amplifikation mit den für die Markierungs-PCR verwendeten Primern hervorgegangen war.

DIG-dNTP-Gemisch: 2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 1,3 mM dTTP, 0,7 mM DIG-11-dUTP (*Roche Diagnostics/ Applied Sciences*, Penzberg, Deutschland)

#### 4.1.4.2.5 Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)

Da die üblichen Taq-Polymerasen RNA nicht als Matrize für die DNA-Synthese nutzen können, kann eine RNA-Sequenz nicht direkt durch eine PCR amplifiziert werden. Daher muss die RNA vorher mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden.

Das hierbei angewandte Prinzip der cDNA-Synthese mit Hilfe des *SUPERSCRIPT<sup>TM</sup> II RT-PCR*-Kit von *Invitrogen* beruht darauf, dass mit wenigen Ausnahmen fast alle eukaryotischen mRNA-Moleküle polyadenyliert sind. Die Synthese der cDNA geht dabei von einem Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer aus, der sich an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA anlagert.

Üblicherweise wurden zu 100 ng Gesamt-RNA nacheinander 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (500 µg/ml) und 1 µl 10 mM dNTP gegeben und der Ansatz mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Volumen von 12 µl



gebracht. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 65°C wurde der Ansatz sofort auf Eiswasser abgekühlt und 4 µl 5x Erststrang-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT sowie 1 µl *RnaseOUT<sup>TM</sup>* (40 U/µl; RNase-Inhibitor) hinzu pipettiert. Im Anschluss an eine 2-minütige Inkubation bei 42°C wurde 1 µl *SUPERSCRIPT<sup>TM</sup>II*-Reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzugegeben und der gesamte Ansatz für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte abschließend bei 70°C für 15 min.

1-2 µl der so erzeugten cDNA wurden in eine RT-PCR für weitere Analysen eingesetzt. Dabei wurde für jeden RT-PCR-Ansatz eine sogenannte Mock-Kontrolle ohne Reverse Transkriptase mitgeführt, um eine Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA auszuschließen, falls die Amplifikate in beiden Fällen gleich groß sind.

#### 4.1.4.3 Reinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde entweder mit dem *High Pure<sup>TM</sup> PCR Product Purification Kit* (Roche Diagnostics/Applied Sciences, Penzberg, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers, oder wie unter Punkt 4.1.1 „Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren“ beschrieben durchgeführt.

#### 4.1.4.4 Klonierung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten

Die Subklonierung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten erfolgte mit dem *TA Cloning Kit* der Firma *Invitrogen* (Karlsruhe, Deutschland) in die Vektoren pCR<sup>TM</sup>2.1- und pCR<sup>TM</sup>II-TOPO nach den Angaben des Herstellers.

#### 4.1.4.5 Ligation von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase, welche die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei DNA-Strängen katalysiert, können überstehende, zueinander komplementäre Enden zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente miteinander verknüpft werden. Dazu benötigt das Enzym eine freie OH-Gruppe am 3'-Ende des einen DNA-Strangs und eine Phosphatgruppe am 5'-Ende des anderen.

Teilweise wurden Ligationsansätze und Restriktionsfragmente nicht in die Subklonierung eingesetzt, sondern in eine anschließende PCR (inverse PCR) oder zur Klonierung in den KO-Vektor. Üblicherweise wurde dabei eine forcierte Klonierung durchgeführt, d.h. die Ligation der Insertion(en) mit dem Vektor in der richtigen Orientierung wird durch Verwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme an allen zu ligierenden Übergängen bevorzugt stattfinden. Dadurch kann auch eine Rezirkularisierung des Vektors ohne Einbau einer Insertion verhindert werden.

Es wurden entweder die T4-DNA-Ligase von *Roche Diagnostics/Applied Sciences* (Penzberg, Deutschland) (1 U/µl) oder von *New England Biolabs* (Frankfurt a. M., Deutschland) (400 U/µl; Verdünnung 1:100 in 1x Ligase-Puffer) verwendet.

<b>LIGATIONANSATZ FÜR DIE INVERSE PCR (10 µL)</b>	1 µl	10x OPA+
	1 µl	ATP (10 mM)
	1 µl	T4-DNA-Ligase (4 U/µl, NEB)
	6 µl	H <sub>2</sub> O
	1 µl	<i>Nsp</i> I-verdaute genomische DNA (100 ng/µl)

Die enzymatische Reaktion erfolgt bei 16°C über Nacht. Bevor der Ansatz in die inverse PCR eingesetzt wird, muß die T4-DNA-Ligase für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert werden.

10x OPA+ (*One-Phor-All-Buffer+*, Amersham Biosciences): 100 mM Tris/Acetat pH 7,5, 100 mM Mg-Acetat, 500 mM K-Acetat

10x T4-DNA-Ligase-Puffer (*New England Biolabs*): 500 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 10 mM ATP, 250 µg/ml BSA, pH 7,5 @ 25°C

<b>LIGATIONANSATZ FÜR DIE KLONIERUNG IN DEN KO-VEKTOR (10 µL)</b>	1 µl	10x T4-DNA-Ligase-Puffer
	1 µl	T4-DNA-Ligase (1 U/µl)
	1-3 µl	Fragment 1
	0-3 µl	Fragment 2
	1-2 µl	KO-Vektor
	add	H <sub>2</sub> O

Es wurden 50 ng des linearisierten Vektors eingesetzt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Fragment sollte etwa 1:3 betragen. Die Berechnung der einzusetzenden Fragmentmenge bei einem Vektor-Insertions-Verhältnis von 1:1 und 50 ng eingesetztem Vektor erfolgte nach folgender Formel:

Fragmentmenge (ng) = Länge des Fragments (bp) x 50 ng Vektor x 3/Länge des Vektors (bp)

Die Ligation erfolgte für 2 h bei RT. 2 µl des Ansatzes wurden anschließend in die Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt.

10x T4-DNA-Ligase-Puffer (*Roche Diagnostics/Applied Sciences*): 660 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 10 mM ATP

## 4.1.5 Agarosegelelektrophorese

### 4.1.5.1 Analytische elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Das Agarosepulver wird – je nach Anwendung - in 1x TBE-, 1x TAE- oder 1x TPE-Puffer (versetzt mit 150 µg/l Ethidiumbromid; s.u.) durch Aufkochen gelöst. Nach Erstarren des Agarose werden die DNA- oder RNA-Proben mit 6x Auftragspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA, 30 % Ficoll 4000, 4 % (w/v) Orange G) versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Spannung wurde zwischen 30 und 120 Volt gewählt. Dem Laufpuffer wurde ebenfalls Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 150 µg/l zugesetzt. EtBr ist ein organischer Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert und nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert, so dass die Bandenmuster mit Hilfe eines Transilluminators sichtbar gemacht werden können.

### 4.1.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um anschließende Reaktionen, in die die isolierten Fragmenten eingesetzt werden sollen, möglichst wenig zu beeinträchtigen, wird die Agarosegelelektrophorese in diesem Fall mit TAE-Puffer durchgeführt, da hierin weniger Salze und EDTA enthalten sind als in TBE- oder TPE-Puffer. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird die betreffende Bande unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell so ausgeschnitten, dass möglichst wenig überschüssige Agarose daran bleibt. Für die folgende Aufreinigung wurden entweder der *NucleoTrap*<sup>®</sup>-Kit (*Machery-Nagel*, Düren, Deutschland) oder der *Quantum Prep*<sup>™</sup> *Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction-Kit* von *Bio-Rad Laboratories*, München, Deutschland) verwendet, wobei in beiden Fällen genau nach den Angaben des Herstellers vorgegangen wurde.

### 4.1.6 Nichtradioaktive Hybridisierung

Die nichtradioaktive Hybridisierung basiert auf dem von *Boehringer Mannheim* entwickelten Digoxigenin(DIG)-System und wurde von Engler-Blum in Hinblick auf Sensitivität und Hintergrundprobleme der Detektion verbessert [31]. DIG-markiertes dUTP wird in die DNA-Sonde eingebaut und mit Hilfe einer Immundetektion über mit alkalische Phosphatase (AP) gekoppelte, gegen DIG gerichtete  $F_{ab}$ -Fragmente und anschließender Chemolumineszenzreaktion nachgewiesen. Um Hintergrundsignale zu vermeiden, sollten alle Lösungen mit sterilem, deionisiertem Wasser angesetzt werden. Die Blotmembran darf nie mit bloßen Händen berührt oder während der Immundetektion trocken werden. Außerdem ist darauf zu achten, dass alle verwendeten Gefäße sauber sind.

#### 4.1.6.1 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Die Restriktion erfolgte -sofern sie nicht wie unten beschrieben in 96M-Platten durchgeführt wurde- wie unter Punkt 4.1.4.1 erläutert.

#### Restriktion genomischer DNA in 96M-Platten:

Zu diesem Zweck wurden entweder *EcoR* I, *Nco* I oder *Sac* I mit ihren jeweiligen 10x Puffersystemen verwendet.

Der Restriktionsansatz wird direkt auf die in den Vertiefungen gewaschene und getrocknete DNA pipettiert und die entsprechenden Vertiefungen gut abgedichtet. Danach wird die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert.

<b>RESTRIKTIONSANSATZ: (35 µL/VERTIEFUNG)</b>	3,5 µl	10x Restriktionspuffer
	0,35 µl	BSA (10 mg/ml)
	0,35 µl	Spermidin (100 mM)
	0,35 µl	DTT (100 mM)
	5 U/Ansatz	Restriktionsenzym
	ad 35 µl	H <sub>2</sub> O

Alle Ansätze werden mit 6x Auftragspuffer versetzt und für die Southern-Analyse gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu werden 0,7 %ige TPE-Gele (TPE-Puffer=Loening E) verwendet. Loening E hat gegenüber dem TBE-Puffer den Vorteil, dass er mehr Salze enthält und so die Auftrennung von Proben, die mit unterschiedlichen Restriktionspuffern versetzt sind, verbessert und eine schnelle Auftrennung großer Fragmente erlaubt. Vor dem Transfer der DNA auf eine Nylonmembran wird das Gel zur Dokumentation fotografiert, um später die Signale auf dem Röntgenfilm mit der elektrophoretischen Auftrennung der DNA abgleichen zu können.

#### 4.1.6.2 Transfer von DNA auf eine Nylonmembran

Die Inkubationen wurden alle bei RT und zur gleichmäßigen Verteilung der Lösungen auf einem Schüttler durchgeführt. Die TAE-Agarosegele werden für den Kapillartransfer vorbereitet [101], indem sie 10 min mit 0,25 M HCl behandelt werden, was bewirkt, dass die DNA ca. alle 3000 bp depuriniert und infolgedessen der Doppelstrang gebrochen wird. Große Fragmente, wie sie bei Restriktion von genomischer DNA entstehen, werden so verkürzt und können besser aus dem Gel auf die Membran transferiert werden. Danach wird für 30 min mit Denaturierungslösung inkubiert. Währendessen werden Filterpapiere und Zellstoff auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten, ebenso die

Nylonmembran. Dann wird die Transferlösung in eine Plastikschaale gefüllt und auf diese ein Gitter gelegt, auf dem sich ein Filterpapierstreifen in der Breite des Gels befindet, dessen Enden in die Transferlösung tauchen. Diese „Brücke“ aus Filterpapier sorgt für den Flüssigkeitsstrom, durch den der Transfer der DNA aus dem Gel auf die Nylonmembran erfolgt. Die „Brücke“ wird mit Transferlösung getränkt, anschließend das vorbereitete Gel darauf gelegt und auf dieses die Transfermembran. Auf die Membran kommen mehrere Stapel Filterpapier und zuoberst eine Lage Zellstoff. Der Aufbau wird mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Der Transfer genomischer DNA erfolgt in der Regel über Nacht oder für mindestens sechs Stunden. Nach Ablauf der Transferzeit nimmt man die Membran ab, wäscht sie 5 min in 2x SSC, lässt sie zwischen Filterpapier lufttrocknen und fixiert danach die DNA durch Inkubation für 1 h bei 80°C. Danach kann die Membran mit einer Sonde hybridisiert werden.

Depurinierungslösung: 0,25 M HCl

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH

Transferlösung: 0,4 M NaOH

Whatman-Filterpapier (*Whatman*, Dassel, Deutschland)

Nylonmembran: Hybond N+ (*Amersham Biosciences*, Piscataway, NJ, USA)

#### **4.1.6.3 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden**

Die bei 80°C „gebackenen“ Membranen werden mit 2x SSC befeuchtet, in Plastikfolie eingeschweißt und für eine Stunde bei 68°C im Schüttelwasserbad mit Prähybridisierungslösung äquilibriert. Unterdessen denaturiert man die DIG-markierte Sonde (2,5 ng Sonde pro ml Hybridisierungslösung) in einem Volumen von 100 µl MilliQ: sie wird 10 min im Wasserbad aufgeköcht, 5 min in Eiswasser inkubiert und dann zu der benötigten Menge 68°C-temperierter Prähybridisierungslösung pipettiert. Nach etwa einer Stunde entfernt man die Prähybridisierungslösung, gibt die Hybridisierungslösung zur Membran und inkubiert über Nacht bei 68°C im Schüttelwasserbad.

Prähybridisierungslösung: 0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2, 1 mM EDTA, 20 % SDS, 0,5 % Blocking-Reagenz (*Roche Diagnostics/ Applied Sciences*); vor Verwendung auf 68°C erhitzen

Hybridisierungslösung: Prähybridisierungslösung mit 2,5 ng/ml DIG-markierter denaturierter Sonde

#### **4.1.6.4 Immundetektion**

Nach der Hybridisierung über Nacht wird unspezifisch gebundene Sonde durch stringentes Waschen (dreimal mit vorgewärmtem Hyb-Waschpuffer für jeweils 20 min) bei 65°C im Schüttelwasserbad entfernt. Alle folgenden Schritte werden bei RT auf einem Schüttler durchgeführt. Zunächst wäscht man die Membran 5 min mit Waschpuffer I (WP I) und inkubiert danach zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Membran eine Stunde mit Blockierungspuffer. Danach wird das DIG-spezifische, AP-gekoppelte Antikörperkonjugat (Verdünnung 1:20.000 mit WP I) zugegeben und für 30 min inkubiert. Überschüssiges Konjugat wird durch viermaliges Waschen mit WP I (jeweils 10 min) entfernt. Um den pH-Wert und die Salzkonzentration für die alkalische Phosphatase einzustellen, äquilibriert man die Membran 5 min in Substratpuffer bevor man schließlich das Substrat zugibt. Das CDP\* wird auf eine Endkonzentration von 0,24 mM in Substratpuffer verdünnt, auf die Membran gegeben und diese zwischen Folie gelegt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten und zu verhindern, dass die Membran austrocknet. Nach 5 min wird überschüssige Substratlösung entfernt, die Plastikfolie zugeschweißt und auf einen Röntgenfilm gelegt. Die

Expositionszeiten lagen zwischen 2-3 h und einigen Tagen, je nach Menge der eingesetzten DNA, Qualität der Sonde und Überstrahlung durch Hintergrundsignal.

Hyb-Waschpuffer: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1 % SDS

Waschpuffer I (WP I): 0,1 M Maleinsäure, 3 M NaCl, 0,3 % Tween 20

Blockierungspuffer: 0,5 % Blocking-Reagenz (*Roche Diagnostics/ Applied Sciences*) in WP I

Konjugatpuffer: anti-DIG-F<sub>ab</sub>-Fragment 1:20.000 in Blockierungspuffer

Substratpuffer: 0,1 M Tris/HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>

Substrat: 0,24 mM CDP\* in Substratpuffer verdünnt

#### **4.1.6.5 Entfernen DIG-markierter DNA-Sonden von hybridisierten Membranen (stripping)**

Um eine Membran nach Hybridisierung und Immundetektion erneut mit einer DIG-markierten DNA-Sonde hybridisieren zu können, muss man die zuvor gebundene Sonde entfernen.

Da das eingebaute DIG alkalilabil ist, erfolgt die Dehybridisierung mit NaOH. Die Membran wird für 2x 15 min bei 37°C mit Dehybridisierungslösung inkubiert und anschließend 5 min mit 2x SSC gewaschen. Danach kann die Membran erneut prähybridisiert und hybridisiert werden.

Dehybridisierungslösung: 0,2 N NaOH, 0,1 % SDS

#### **4.1.7 Sequenzierung**

Für eine Sequenzierung von PCR-Produkten wurden diese gereinigt und die Menge auf einem Agarosegel abgeschätzt. Plasmid-DNA wurde ebenfalls gereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt. Anschließend wurden 20 ng DNA pro 100 bp bei PCR-Produkten bzw. 1 µg Gesamt-DNA bei Plasmiden luftgetrocknet. Die Sequenzierungen wurden von der Firma *MWG-Biotech* (Ebersberg, Deutschland) oder mit dem *ALFexpress<sup>TM</sup>* (*Amersham Biosciences*, Piscataway, NJ, USA) vor Ort durchgeführt.

##### **4.1.7.1 Sequenzierung mit dem ALFexpress<sup>TM</sup>**

Die DNA-Sequenzierung basiert darauf, dass bei der Neusynthese eines DNA-Strangs von einer festgelegten Primer-Stelle ausgegangen wird, das Ende jedoch nicht definiert ist, sondern zufällig durch den Einbau eines Didesoxynukleotids (ddNTP) bestimmt wird, da die DNA-Polymerase nur dNTPs miteinander verknüpfen kann. Abhängig davon, welches ddNTP der Reaktion zugegeben wird, erhält man unterschiedliche Fragmente, die jeweils mit einer bestimmten Base enden. Wenn diese Fragmente mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, lassen sie sich bei elektrophoretischer Auftrennung durch einen Laser detektieren. Anhand der Laufreihenfolge kann man anschließend die zugrunde liegende Sequenz bestimmen.

Hier wurde mit dem *Thermo Sequenase<sup>TM</sup> Cy<sup>TM</sup>5 Dye Terminator Kit* von *Amersham Biosciences* nach Angaben des Herstellers gearbeitet, wobei die ddNTP Cy5-markiert sind und beliebige unmarkierte Primer verwendet werden können.

Die notwendigen Gele wurden mit *ReproGel<sup>TM</sup> High Resolution* (*Amersham Biosciences*) gegossen, wobei jeweils genau nach Angaben des Herstellers vorgegangen wurde. Zur eigentlichen Sequenzierung wurde der *ALFexpress<sup>TM</sup> DNA Sequencer* ebenfalls von *Amersham* benutzt; auch die Bedienung des Gerätes erfolgte genau nach Vorgaben des Herstellers.

Laufpuffer: 0,5x TBE

## 4.2 ARBEITEN MIT BAKTERIEN

### 4.2.1 Lagerung

Bakterien in Flüssigkulturen oder auf Agarplatten können für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden. Für die Langzeitlagerung erfolgte der Zusatz von 1 Vol 2x Einfriermedium zu einer Übernacht-Kultur der Bakteriensuspension und die Verwahrung bei -80°C.

### 4.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Die bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-4 µl des Ligationsansatzes versetzt und eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers bei 42°C für 30 sec (TOP10F') bzw. 45 sec (DH5α). Danach wurde der Ansatz sofort für 2 min auf Eis gekühlt, mit 250 µl bzw. 1 ml SOC-Medium (RT) versetzt und anschließend eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Unterschiedliche Volumina der Transformationsansätze wurden dann auf LB-Platten (LB-Medium mit 1,5 % Bacto Agar) mit dem erforderlichen Selektionsmedium (50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert.

Bei der Transformation von TOP10F' wurde für die Blau-Weiß-Selektion auf den Platten außerdem 40 µl X-Gal (40 mg/ml in Dimethylformamid) und 40 µl IPTG ausgestrichen.

## 4.3 ARBEITEN MIT SÄUGERZELLINIEN

### 4.3.1 Kultivierung und Cryokonservierung

Säugerzelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre im entsprechenden Medium inkubiert. Zur Passagierung adhärenter Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Inkubation mit Trypsin/EDTA bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt. Das Auszählen von Zellen erfolgte in der Neubauer-Zählkammer. Für die Lebendlagerung wurden Zellen sedimentiert (1100 rpm, 10 min, Heraeus Megafuge 1.0R), 2-3x 10<sup>6</sup> Zellen in 1ml Einfriermedium resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Die Cryokonservierung basiert auf der Zugabe von DMSO zu den Zellen, welches das H<sub>2</sub>O aus der Zellmembran verdrängt und so deren Schädigung durch die Ausdehnung des Wassers verhindert. Da DMSO andererseits auch toxisch für den Zellstoffwechsel ist, müssen alle Schritte beim Einfrieren und Auftauen schnell durchgeführt werden. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Kultivierung tiefgefrorener Zellen wurden diese rasch auf 37°C erwärmt, einmal mit Medium gewaschen und in eine geeignete Zellkulturflasche überführt.

PBS: 139,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

Trypsin/EDTA: 0,05% Trypsin/1 mM EDTA in PBS

Einfriermedium: 90% FCS, 10% DMSO

### 4.3.2 Bestimmung der Mindestkonzentration eines Selektionsagens im Medium

Um die notwendige Konzentration des Selektionsagens - in diesem Fall G418 - im Selektionsmedium zu bestimmen, wurden BFF 207 und 209 parallel mit unterschiedlichen Konzentrationen an G418 (0,8 mg/ml bis 1,4 mg/ml in 200-µg-Schritten) inkubiert und die Entwicklung der Zellen über einen Zeitraum von 7 Tagen lichtmikroskopisch verfolgt. So lässt sich feststellen, welche Konzentration an Selektionsagens mindestens nötig ist, um untransfizierte Zellen abzutöten.

### 4.3.3 Transfektion von Säugerzellen

Für die Erzeugung eines homolog rekombinierten Klons wurden BFF der Linien 209 und 207 in Transfektionen mit dem Nucleofector™ (*Amaxa*) und *LipofectAMINE™ Reagent* bzw. *Lipofectamine 2000™ Reagent* (*Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt. Dabei wurden Zellen verwendet, die drei bis maximal fünf mal passagiert worden waren; spätere Passagen wurden aufgrund der fortschreitenden Seneszenz der Zellen nicht verwendet, da sonst nicht gewährleistet werden kann, dass die transfizierten Klone nach Abschluss des Prozederes von Expansion und Cryokonservierung noch teilungsaktiv sind.

#### 4.3.3.1 Vorbereitung des Knockout-Vektors

Es ist bekannt, dass die Effizienz bei stabilen Transfektionen (im Gegensatz zu transienten) durch die Verwendung eines linearisierten Vektors gesteigert werden kann. Exogene linearisierte DNA kann durch zelleigene DNasen zwar leichter abgebaut werden als zirkuläre, doch wird sie dafür effizienter in die genomische DNA inseriert. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen KO-Konstrukte mit Restriktionsenzymen verdaut, die je eine einzelne Schnittstelle innerhalb des Vektors aufweisen. Der Vektor pKO-NV1901 5'/3' wurde entweder mit *Sal*I oder *Pvu*I linearisiert, das um das SV40nls erweiterte Konstrukt (pKO-NV1901 5'/3'-SV40nls) mit *Hpa*I. Die Reaktionen wurden wie unter Punkt 4.1.4.1 beschrieben angesetzt und die restringierte DNA vor der Transfektion mit Phenol/Chloroform/IAA aufgereinigt, in der Kälte gefällt und anschließend unter sterilen Bedingungen in TE gelöst.

#### 4.3.3.2 Elektroporation mittels Nucleofector™ (*Amaxa*)

Bei dem von *Amaxa* beschriebenen Verfahren werden sehr hohe Feldstärken von 2-10 kV/cm angelegt, sodass DNA oder andere biologisch aktive Moleküle über die Kernhülle hinweg und somit unabhängig von der Zellteilung in den Kern gelangen können. Diese Feldstärken liegen weit über den für Elektroporationen üblichen Werten von durchschnittlich 1 kV/cm. Durch einen kurzen, starken Impuls von 10-200 µs soll die Überlebensrate der Zellen optimiert werden. Einige Veröffentlichungen weisen auf die Effizienz des Nucleofector-Verfahrens hin [40] [61].

Da die Firma *Amaxa* für bovine embryonale Fibroblasten bisher kein optimiertes Transfektionsprotokoll zur Verfügung stellen konnte, wurden hauptsächlich zwei verschiedene Nucleofectionsprogramme („U-20“ für normale humane neonatale dermale Fibroblasten = „NHDF-Neo“ bzw. „U-23“ für normale humane adulte dermale Fibroblasten = „NHDF-Adult“; beim Nucleofector lassen sich keine Parameter, sondern nur auf bestimmte Zelllinien oder -arten optimierte Programme einstellen; die einzelnen Parameter sind nicht bekannt) mit dem KO-Konstrukt und BFF verwendet, um nach Möglichkeit herauszufinden, welches der beiden sich besser für die Herstellung homolog rekombinierter Transfektanten eignet.

Bei den Nucleofectionen wurde das vom Hersteller mitgelieferte Versuchsprotokoll des jeweiligen Programms genau eingehalten (U-20: 0,5-1x 10<sup>6</sup> Zellen/1-5 µg DNA; U-23: 4-5x 10<sup>5</sup> Zellen/2-3 µg DNA), im angegebenen Rahmen wurden die Zellzahl und die eingesetzte Menge an linearisiertem Vektor variiert.

Direkt nach der Nucleofection wurden die Zellen mit Kompletmedium in 6M-Platten überführt und für mindestens 48 Stunden unter Normalbedingungen kultiviert. Anschließend wurden sie in Abhängigkeit von Vitalität und Proliferationsverhalten vereinzelt und unter Selektion genommen (siehe Punkt 4.3.4).

### 4.3.3.3 Transfektion mittels liposomaler Transfektionsreagenzien

#### 4.3.3.3.1 LipofectAMINE™ Reagent und Lipofectamine 2000™ Reagent

Die Lipofection bewirkt lediglich einen Transport der exogenen DNA durch die Zellmembran ins Zytoplasma. Im Idealfall werden die Komplexe dort aus den endocytotischen Vesikeln freigesetzt, sodass die DNA im Verlaufe der nächsten Zellteilung indirekt in den Kern gelangen kann, wenn die Kernhülle während der Mitose vorübergehend aufgelöst wird.

Die verwendeten Lipofections-Reagenzien *LipofectAMINE™ Reagent* und *Lipofectamine 2000™ Reagent* der Firma *Invitrogen* gehören in die Gruppe der auf kationischen Lipiden basierenden Transfektionskomponenten. Sie bestehen aus zwei Hauptkomponenten, die in einem Verhältnis von 3:1 vorliegen: aus dem polykationischen Lipid DOSPA (2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium-trifluoracetat) und dem neutralen Lipid DOPE (dioleoyl-phosphatidyl-ethanolamin). Bei physiologischem pH sind die vier Aminogruppen des Spermins positiv geladen. Über diese positiven Ladungen wird das kationische Lipid an die negativ geladene DNA gebunden, was zur Kondensierung der DNA und zur Bildung von DNA:Lipid-Komplexen führt, die oberflächlich eine Lipidhülle tragen. Diese Komplexe werden von den Zellen endocytotisch aufgenommen. Da die Bildung der DNA:Lipid-Komplexe durch Proteine gestört wird, muss die Komplexbildung unter serumfreien Bedingungen erfolgen.

Diese beiden Lipofectionsreagenzien wurden für die stabile Transfektion von BFF mit dem KO-Konstrukt eingesetzt. Bevor mit dem eigentlichen KO-Vektor transfiziert werden konnte, musste die optimale Konzentration an Lipofectionsreagens ermittelt werden (Effizienz vs. Toxizität). Zu diesem Zweck wurden 24 Stunden vor dem Experiment pro Ansatz  $2 \times 10^5$  Zellen in die Vertiefungen einer 6M-Platte ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Lipofectamine (4-24  $\mu\text{l}$  in 4  $\mu\text{l}$ -Schritten) inkubiert. Dabei wurden die Parameter DNA-Konzentration und Inkubationszeit (entsprechend der Empfehlung des Herstellers 5 Stunden) konstant gehalten. Um die Effizienz der Transfektion möglichst einfach und schnell bestimmen zu können, wurde der eukaryotische Expressionsvektor pEGFP-N1 in die Zellen eingebracht und diese anschließend auf GFP-Expression im FACS analysiert (die Analyse am FACS wurde freundlicherweise von Dr. E. May durchgeführt).

Im Folgenden wurden pro Ansatz  $2-3 \times 10^5$  Zellen mindestens 24 Stunden vor der Transfektionen ausgesät (die Zellen sollten 50-80% konfluent sein) und für 5 Stunden mit 16  $\mu\text{l}$  Lipofectamine und 1,5  $\mu\text{g}$  linearisiertem Vektor inkubiert. Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Danach erfolgte ein Mediumwechsel und eine weitere Inkubation bei normalen Kulturbedingungen für 48 Stunden.

#### 4.3.3.3.2 Metafectene™ (Biontex)

Das Reagenz *Metafectene™* stammt ebenfalls aus der Gruppe der polykationischen Transfektionsreagenzien, die in Kombination mit einem neutralen Kolipid in liposomaler Form vorliegen. Auch hier kommt es zur Komplexbildung zwischen Reagenz und DNA, die dabei eine sehr kompakte Struktur annimmt.

*Metafectene™* wurde für die transiente Transfektion von MDBK mit einer Variante des KO-Vektors verwendet. 24 Stunden vor der Lipofection wurden je  $6 \times 10^4$  Zellen in die Vertiefungen einer 24M-Platte ausgesät. Vor Beginn der Prozedur wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 0,5 ml Kompletmedium pro Vertiefung zugegeben. Die Transfektion erfolgte genau nach Angaben des



Herstellers, wobei 1 µg zirkulärer Vektor mit 3 µl des Lipofectionsreagenz pro Ansatz eingesetzt wurden. Die Zellen wurden 48 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend für die Verwendung als Positivkontrolle in der PCR lysiert. Dazu wurden sie abtrypsiniert, in je 200 µl Kawasaki-Puffer resuspendiert und anschließend für 90 min bei 60°C inkubiert. Die im Puffer enthaltene Proteinase K muss, bevor das Lysat in eine PCR eingesetzt wird, für 10 min bei 95°C hitzeinaktiviert werden.

Kawasaki-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 0,5% (v/v) Tween-20, 0,2 mg/ml Proteinase K (vor Verwendung des Puffers frisch zugeben)

### **4.3.4 Selektion und klonale Expansion von transfizierten BFF**

#### **4.3.4.1 Lipofektionen**

Unabhängig vom weiteren Ablauf wurde nach 48 Stunden unter normalen Kulturbedingungen mit der Selektion begonnen und die Zellen vereinzelt. In einem früheren Stadium des Projekts wurden die Zellen zur Gewinnung von Einzelklonen 1:10 geteilt und in 6M-Platten bis zur fast vollständigen Konfluenz weiterkultiviert. 1/3 der Zellen jeder Vertiefung wurde in Kawasaki-Puffer (s.o.) lysiert und in die *nested*-PCR eingesetzt. Im Falle eines positiven Ergebnisses wurde ein Teil der Zellen des betreffenden Ansatzes als Population für die Gewinnung von DNA zur Southern Blot-Analyse expandiert, der andere Teil zur Gewinnung von Einzelklonen in je sechs 96M-Platten mit einer Zellzahl von 5, 10 bzw. 15 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die optimale Zelldichte pro Vertiefung wurde dabei empirisch ermittelt, da die Ansätze hintereinander bearbeitet und die Beobachtungen aus einem Ansatz auf den nächsten übertragen wurden. Die verbliebenen 2/3 der Zellen aus weiteren PCR-positiven Ansätzen wurden bis zur weiteren Bearbeitung cryokonserviert. Die G418-resistenten Klone in den 96M-Platten wurden bis zur Konfluenz kultiviert und 1/3 bis 1/2 der Zellen für die Analyse in der *nested*-PCR in Kawasaki-Puffer lysiert. Die restlichen Zellen wurden cryokonserviert und im Falle eines positiven PCR-Ergebnisses unter Umständen in eine Klonierung eingesetzt.

Bei den späteren Ansätzen wurde die Vereinzelnung anders durchgeführt: 2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen entweder in einer Dichte von  $2 \times 10^2$  pro Vertiefung in eine 96M-Platte überführt und weiter wie oben beschrieben mit den Klonen verfahren (Lyse in Kawasaki-Puffer) oder die Zellen wurden mit einer Zellzahl von  $2-3 \times 10^3$  pro Vertiefung in eine 96M-Platte ausgesät. In diesem Fall wurden die G418-resistenten Klone, nachdem der überwiegende Teil annähernd konfluent war (etwa am 14. Tag nach der Transfektion), 1:3 geteilt (Triplikate der ursprünglichen 96M-Platte) und nachdem diese wiederum ausreichend konfluent waren (etwa 4-5 Tage später), je eine der Triplikat-Platten cryokonserviert und die anderen beiden für die Verwendung der DNA in PCR oder Southern Blot aufbereitet (siehe Punkt 4.1.3.2).

#### **4.3.4.2 Nucleofektionen**

Bei der ersten Nucleofektion wurden die Zellen jedes Ansatzes am 2. Tag nach der Transfektion 1:10 geteilt und mit 1,2 mg/ml G418 weiter in 6M-Platten kultiviert, bis sie nahezu konfluent waren. Dann wurde von jeder Vertiefung 1/3 der Zellen in Kawasaki-Puffer lysiert und in eine PCR eingesetzt, die entweder dem Auffinden eines homologen Rekombinationsereignisses dienen sollte (Primerpaar Neo-T2/bLG3'frgI.as) oder (bei negativem Ergebnis) zeigen sollte, ob der 3'-homologe Arm des Vektor in den Lysaten nachweisbar ist (Primerpaar Neo-T2/bLG5972as). Von den restlichen Lysaten wurden je 9

Ansätze (nach Entnahme eines Drittels für die PCR) cryokonserviert, während je einer zur Gewinnung von Einzelklonen mit einer Dichte von 3-30 Zellen pro Vertiefung in 96M-Platten ausgesät und weiter unter Selektionsbedingungen kultiviert wurde.

Später (nach Verwendung einer anderen Linearisierungsstelle für den Vektor) wurden die transfizierten BFF direkt mit einer Dichte von  $2-3 \times 10^3$  Zellen pro Vertiefung in 96M-Platten vereinzelt (Verwendung des Selektionsmediums mit 15 % FCS). Der genaue Zeitpunkt von Vereinzeltung und Selektionsbeginn hing vom morphologischen Erscheinen und der Teilungsaktivität der Zellen ab, teilweise wurde mit der Selektion schon vor der Vereinzeltung der Zellen begonnen. Der weitere Ablauf entspricht dem oben für die Lipofection beschriebenen (Anfertigung von Triplikaten der ursprünglichen 96M-Platte, letzter Abschnitt).

Selektionsmedium: DMEM komplett (10 % bzw. 15 % FCS) mit 1,2 mg/ml G418

### 4.3.5 Zellsynchronisierung und Nachweis

#### 4.3.5.1 Zellzyklusarrest durch Thymidin-Block

Agencien wie Thymidin oder Hydroxyurea werden üblicherweise benutzt, um proliferierende Zellen in der S-Phase des Zellzyklus zu synchronisieren. Dabei greifen beide Substanzen am gleichen Punkt an: sie verhindern das Fortschreiten der Replikationsgabel bei der Verdopplung der DNA in der S-Phase. Thymidin depletiert dCTP in den Zellen, d.h. der Nachschub an DNA-Bausteinen wird blockiert. Im Gegensatz zu Hydroxyurea, das nicht nur ein Desoxyribonucleosid-Triphosphat depletiert und so die Replikationsgabel komplett zum Erliegen bringt, wird bei Thymidin-behandelten Zellen der Einbau von Nucleotiden in die DNA und somit die Replikation nicht vollständig unterbunden sondern lediglich stark verzögert [62].

Um BFF vor einer Transfektion in der S-Phase zu synchronisieren, wurde dem Komplettmedium 2 mM Thymidin (*Sigma-Aldrich*) zugesetzt und die Zellen für 24 Stunden unter normalen Bedingungen kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde zum Nachweis der erfolgreichen Synchronisation mit Propidiumjodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (s.u.).

#### 4.3.5.2 Färbung synchronisierter Zellen und durchflusszytometrische Analyse

Zur Überprüfung der Zellsynchronisation wurden je  $2-3 \times 10^5$  Thymidin-behandelte und unbehandelte Zellen (Negativkontrolle) in je 250  $\mu$ l einer Propidiumjodid-haltigen Färbelösung aufgenommen und für 1 Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen direkt durchflusszytometrisch analysiert. Propidiumjodid (PI) ist ein Fluorochrom, das die intakte Zellmembran nicht passieren kann, weshalb der Färbelösung ein schwaches Detergenz zugesetzt werden muss, das die Membran teilweise permeabilisiert. Dadurch kann das PI in den Zellkern gelangen und mit der DNA interagieren. Darüber hinaus enthält die Lösung RnaseA, da PI auch doppelsträngige RNA färbt. Über die im Durchflusszytometer gemessene Lichtemission des PI kann der DNA-Gehalt jeder Zelle bestimmt werden, was wiederum Aufschluss darüber gibt, welcher Anteil der Population sich in welcher Phase des Zellzyklus (G0/G1, S-Phase, G2/M) befindet. Die maximale Anregung von DNA-gebundenem PI liegt bei 536 nm (optimal Blau- oder Grünlichtlaser), die Emission bei 617 nm.

Die Messungen am Durchflusszytometer wurden freundlicherweise von Nicole Kotzias durchgeführt.

PI-Färbelösung: 0,05 mg/ml Propidiumjodid; 0,1% Triton X-100; 0,2 mg/ml RNase A in PBS

## 5 ERGEBNISSE

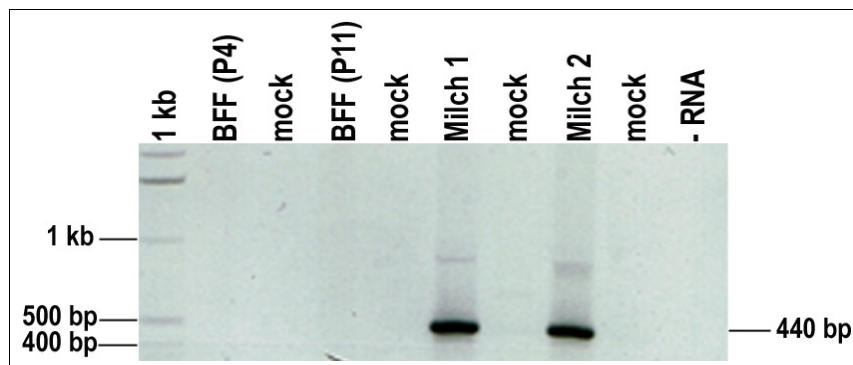
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich im wesentlichen in drei Abschnitte unterteilen. Der erste Teil beschreibt die Konstruktion des Knockout-Vektors, die im Vorfeld der experimentellen Durchführung intensive Planung und entsprechende praktische Vorbereitungen erforderte. Dabei war es entscheidend, die richtige Vorgehensweise fest zu legen, die die Beschaffenheit des bovinen  $\beta$ -Lactoglobulin-Genorts und die Existenz eines Pseudogens berücksichtigt. Im zweiten Teil wurde dieses Knockout-Konstrukt in Transfektionen mit bovinen fetalen Fibroblasten (BFF) der Linien 207 und 209 eingesetzt. Die transfizierten Zellen wurden anschließend auf ein homologes Rekombinationsereignis untersucht. Der letzte Teil der Arbeit konzentriert sich auf die Analyse von Feten, die aus Klonierungsexperimenten mit potentiell homolog rekombinierten Zellen hervorgegangen waren.

### 5.1 KONSTRUKTION DES KNOCKOUT-VEKTORS

#### 5.1.1 Vorbereitungen

##### 5.1.1.1 Überlegungen zur Anwendung von Anreicherungs-Strategien

Es hat sich herausgestellt, dass die Frequenz von nicht-homologen im Vergleich zu homologen Rekombinationsereignissen in mitotischen Säugerzellen deutlich höher ist. Dies hat zur Entwicklung von Vektoren geführt, die eine Anreicherung von homolog rekombinierten Klonen bewirken (*genetic enrichment*). Die Anreicherungs-Strategie, die bisher am erfolgreichsten zur Erzeugung genetisch veränderter Nutztiere eingesetzt wurde, wird als *promoterless-trap* bezeichnet (Abb. 6.1).



**Abb. 5.1: RT-PCR zur Überprüfung der bLG-Expression in BFF.** Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit dem Primerpaar bLG-5768E4s/-7494E7as. Eingesetzt wurde RNA aus BFF der Passagen 4 bzw. 11 und RNA aus Zellen, die aus frischer Milch gewonnen wurden (Milch 1 bzw. 2). Zu jedem Ansatz wurde eine Mock-Kontrolle, der keine Reverse Transkriptase zugegeben wurde, mitgeführt. bLG-mRNA konnte in keiner der beiden untersuchten Passagen von BFF nachgewiesen werden. P4 bzw. P11 = Passage 4 bzw. 11; - RNA=Ansatz ohne RNA

Die Expression des Zielgens ist eine der beiden Voraussetzungen für die Anwendung dieser Strategie. In einem ersten Schritt wurde daher die Expression von  $\beta$ -Lactoglobulin (bLG) in BFF der Linie 209 auf RNA-Ebene überprüft.

Im Experiment wurde Gesamt-RNA von BFF verschiedener Passagen (P4 bzw. P11) mit Hilfe einer

RT-PCR untersucht. Das hierzu verwendete Primerpaar bLG-5768E4s/-7494E7as (Abb. 5.28) wurde so gewählt, dass bei Einsatz von genomischer DNA als Matrize ein etwa 1,7 kb langes Amplifikat entsteht. Im Gegensatz dazu ist das PCR-Produkt nur 440 bp lang, wenn als Matrize cDNA eingesetzt wird, da in diesem Fall die zwischen den Exons 4 bis 7 liegenden Introns fehlen. So kann eine Kontamination der Reaktion mit genomischer DNA – zusätzlich zur Mitführung einer Mock-Kontrolle – ausgeschlossen werden. Als Positiv-Kontrolle diente die RNA aus abgeschilferten Milchdrüsenzellen, die durch Zentrifugation aus frischer Milch gewonnen wurden.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass in den untersuchten BFF keine bLG-mRNA vorhanden ist (Abb. 5.1). Bei der Sensitivität dieser Nachweismethode kann man davon ausgehen, dass BFF das bLG-Gen nicht exprimieren.

Für eine erfolgreiche Anwendung der *promoterless*-Strategie wird darüberhinaus vorausgesetzt, dass ein ausreichender Abstand zwischen dem Promotorbereich und dem Transkriptionsstartpunkt des zu verändernden Gens gegeben ist. Dieser Abstand entspricht der maximalen Länge eines der beiden homologen Vektorarme und sollte daher eine Länge von 1 kb nicht unterschreiten. Im Fall des bLG-Gens liegt der Promotorbereich direkt vor dem ersten Exon, in dem sich auch der Transkriptionsstartpunkt befindet (Abb. 5.3). Ein ausreichend langer Vektorarm würde entweder einen Teil des Promotors oder den Transkriptionsstartpunkt enthalten.

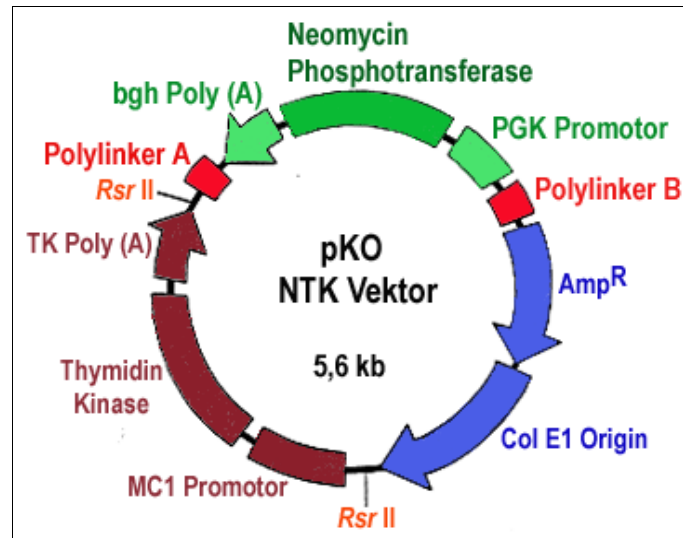
Da beide Voraussetzungen nicht gegeben sind, konnte die *promoterless*-Strategie für die Veränderung des bLG-Gens nicht angewendet werden.

Eine andere Anreicherungs-Strategie, die insbesondere bei der Manipulation von ES-Zellen erfolgreich eingesetzt wird, ist die Positiv-Negativ-Selektion (PNS; Abb. 6.1). Durch die „positive“ Selektion werden alle Zellen, die die exogene DNA aufgenommen haben, weitergeführt. Erst im zweiten Schritt, der „negativen“ Selektion, kann zwischen homologer Rekombination und nicht-homologer Integration unterschieden werden. Empirische Daten, z.B. von Prof. M. Müller aus Wien, haben jedoch gezeigt, dass dieser zweite Selektionsschritt primäre Zellen, wie z.B. fetale Fibroblasten, in einen Zustand der Teilungsinaktivität treiben kann. Aus diesem Grund wurde zugunsten der Vitalität der Zellen auf den Einsatz dieser Strategie verzichtet.

Da die *promoterless*-Strategie nicht angewendet werden konnte und die PNS-Strategie wenig erfolgversprechend erschien, wurde auf eine Anreicherungs-Strategie völlig verzichtet.

#### **5.1.1.2 Modifikation des Ausgangsvektors pKO-NTKV 1901 (Stratagene)**

Der Ausgangsvektor pKO-NTKV 1901 (5,6 kb) der Firma *Stratagene* ist in seiner ursprünglichen Form für die Durchführung der PNS-Strategie ausgelegt und verfügt daher sowohl über eine positive als auch eine negative Selektionskassette. Aus den eben dargelegten Gründen wurde die negative Selektionskassette durch einen Restriktionsverdau mit *Rsr* II entfernt. Dabei wurde der Vektor pKO-NTKV 1901 um rund 2 kb auf etwa 3,6 kb verkürzt und im folgenden als pKO-NV 1901 bezeichnet. Die einzelnen Elemente des Ausgangsvektors sind in der Abbildung 5.2 dargestellt.



**Abb. 5.2:** Schematische Darstellung des Ausgangsvektors pKO-NTKV. Die Thymidin-Kinase-Kassette wurde durch eine *Rsr II*-Restriktion entfernt. Somit verbleibt der positive Selektionsmarker (Neomycin-Phosphotransferase), flankiert von einem Promotor und einer Polyadenylierungssequenz, im Vektor, ebenso wie die zur Vermehrung im prokaryotischen System benötigten Elemente (Ampicillin-Resistenzgen, Replikationsursprung). In die Polylinker werden die beiden homologen Bereiche des zu verändernden Gens kloniert.

## 5.1.2 Das bLG-Gen: Klonierungsstrategie

### 5.1.2.1 Das bLG-Pseudogen

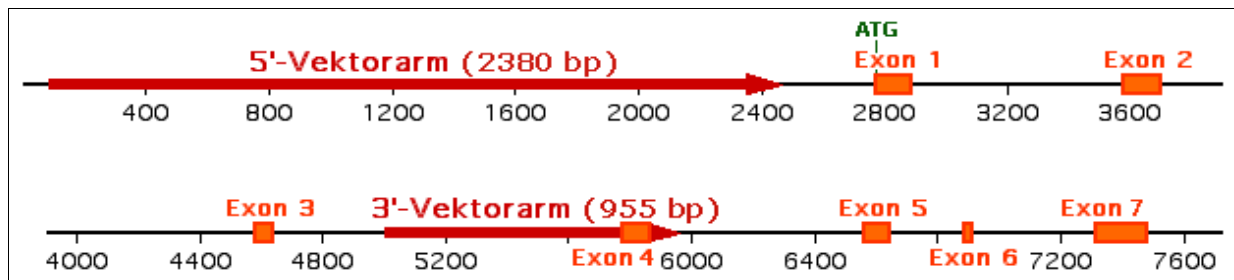
Neben dem funktionstüchtigen bLG-Gen enthält das bovine Genom eine bLG-Pseudogen-Sequenz. Zu bedenken ist in diesem Zusammenhang, dass das Pseudogen mit einem *Knockout*-Experiment interferieren könnte, wenn das KO-Konstrukt auch mit dem Pseudogen homolog rekombinieren kann. Deshalb sollten die homologen Vektorarme aus einem Genbereich stammen, der eine möglichst geringe - bestenfalls keine - Homologie mit dem Pseudogen aufweist.

Vor diesem Hintergrund wurden die verfügbaren Sequenzen des bLG-Gens (*bLG Variant B*, 9432 bp, NCBI Nucleotide Search Accession No. Z48305) und seines Pseudogens (5520 bp, NCBI Nucleotide Search Accession No. Z36937) miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass vor allem der Bereich des bLG-Gens von Intron 4 bis hinter Exon 7 (etwa von Position 6300-7533) eine große Homologie zum Pseudogen aufweist. Dagegen ist im Bereich zwischen Exon 3 und Exon 4 kaum eine Homologie zwischen Gen und Pseudogen zu finden (siehe Sequenz 7.1). Somit eignet sich dieser Abschnitt optimal für den Einsatz als Vektorarm (3'-Vektorarm; Abb. 5.3).

Da zum damaligen Zeitpunkt keine Sequenzinformation für das Pseudogen im Bereich stromaufwärts von Exon 1 vorlag, konnte eine mögliche Homologie zwischen Gen und Pseudogen in diesem DNA-Abschnitt (geplanter 5'-Vektorarm; Abb. 5.3) nicht ausgeschlossen werden. Dies wurde statt dessen experimentell mit Hilfe der Southern-Analyse überprüft. Dazu wurden zwei Amplifikate (5'-homologer Arm Teil I und Teil II), die zusammen den gesamten Bereich des bLG-Gens bis etwa zur Position 2400 abdecken, markiert und als Sonden verwendet. Nach Hybridisierung mit der genomischen DNA

würden diese Sonden bei Bindung an das Pseudogen ein zusätzliches Fragment identifizieren. Es waren in allen Ansätzen nur die erwarteten bLG-Fragmente zu sehen (Daten nicht gezeigt). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Amplifikate aus der Promotorregion des bLG-Gens bei der angewendeten Stringenz der Reaktion nicht im Pseudogen binden. Dieser Bereich vor dem ersten Exon eignet sich also als Vektorarm.

### 5.1.2.2 Die bLG-homologen Vektorarme



**Abb. 5.3: Organisation des bLG-Genorts.** Rot markiert sind die Bereiche des bLG-Gens, die als homologe Arme in den KO-Vektor kloniert wurden. Der als 5'-Vektorarm verwendete Bereich entspricht dem bLG-Promotor, der Transkriptionsstart (ATG) liegt in Exon 1.

Für die homologe Rekombination werden zwei bLG-homologe Bereiche benötigt, die vor und hinter der Selektionskassette in den Vektor pKO-NV 1901 eingebaut werden. Dabei handelt es sich um einen 2380 bp langen Abschnitt aus dem Promotorbereich des bLG-Gens vor dem ersten Exon (5'-Vektorarm). Der zweite Bereich umfasst einen 955 bp langen Abschnitt, der sich von Intron 3 bis Intron 4 erstreckt und Exon 4 beinhaltet (3'-Vektorarm). Das Schema in Abbildung 5.3 zeigt den bLG-Genort mit den beiden Bereichen, die als Vektorarme vorgesehen sind.

Die homologen Vektorarme werden in die als Polylinker A bzw. B bezeichneten Bereiche des KO-Vektors inseriert (Tab. 5.1.1). Sie enthalten die Erkennungssequenzen von jeweils fünf verschiedenen Restriktionsendonukleasen. In der nachfolgenden Tabelle ist die jeweilige Abfolge (5'→3'-Richtung) der Restriktionssequenzen in den beiden Polylinkerbereichen des Vektors pKO-NTKV 1901 aufgezeigt.

Polylinker A:	<i>Hpa</i> I	<i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Kpn</i> I	<i>Xho</i> I
Polylinker B:	<i>Bam</i> H I	<i>Cla</i> I	<i>Eco</i> R I	<i>Sac</i> II	<i>Sma</i> I

**Tab. 5.1.1:** In den Polylinkern A und B des Vektors pKO-NTKV 1901 enthaltene Restriktionssequenzen.

#### 5.1.2.2.1 Der 5'-homologe Vektorarm

Der 5'-homologe Arm erstreckt sich über den gesamten Bereich der bekannten bLG-Sequenz vor Exon 1 und dem zu Beginn dieses Exons liegenden Transkriptions-Startpunkt. Bis zur Bekanntgabe der vollständigen Sequenz des bovinen Genoms im Jahre 2005 war dies ein Bereich von etwa 2,7 kb. Der 5'-Vektorarm setzt sich aus einem 852 bp-Fragment und einem 1717 bp-Fragment zusammen, die in zwei getrennten Schritten amplifiziert und anschließend zusammengefügt wurden. Die Amplifikation zweier kürzerer Fragmente statt eines großen Gesamtfragments war erforderlich, da es aufgrund der Verwendung einer Taq-Polymerase ohne Korrekturlesefunktion schwierig sein kann, ein derart langes Amplifikat ohne durch die Polymerase verursachte Mutation in entscheidenden Sequenzbereichen zu

bekommen. Das kleinere der beiden Fragmente (Teil I) wurde mit dem Primerpaar 5'frg101s/-946as, das größere (Teil II) mit den Oligonukleotiden 5'frg1s/-2481as aus fetaler DNA amplifiziert (Abb. 5.4). Über eine in beiden Teilen vorhandene *Aat* II-Schnittstelle erfolgte die Ligation der beiden Fragmente, wobei eine etwa 180 bp lange überlappende Sequenz entfernt wurde. Der komplette 5'-Vektorarm hat eine Länge von 2380 bp und besitzt für die Klonierung in den Polylinker A des KO-Vektors der an seinem 5'-Ende eine *Bgl* II- und am 3'-Ende eine *Kpn* I-Schnittstelle.

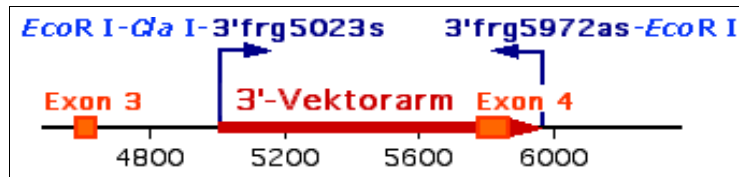


**Abb. 5.4: Schematische Darstellung des 5'-Vektorarms (rot).** Der 5'-homologe Vektorarm wurde aus zwei Teilen über die *Aat* II-Schnittstelle (orange) zusammengesetzt. Für die Klonierung in den KO-Vektor verfügt der Primer 5'frg101s über eine *Bgl* II-Schnittstelle, während an den Primer 5'frg2481as eine *Kpn* I-Schnittstelle angehängt ist.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass der 5'-Vektorarm das ATG-Codon, welches für den Beginn der Translation erforderlich ist, nicht enthält. So kann eine Translation von Genfragmenten im Fall einer homologen Rekombination im Bereich des 5'-Vektorarms ausgeschlossen werden.

#### 5.1.2.2.2 Der 3'-homologe Vektorarm

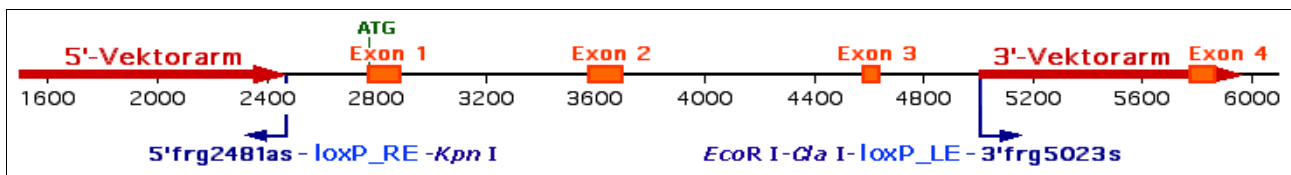
Der 3'-homologe Arm beginnt im Intron 3 und endet stromabwärts von Exon 4 (Abb. 5.5). Damit ist sichergestellt, dass der im Exon 3 enthaltene allergene Schleifenbereich (*allergenic loop*), der für ein Haupt-Milchallergen kodiert [99] [96], durch homologe Rekombination entfernt werden kann. Die Amplifikation aus fetaler DNA erfolgte mit den Oligonukleotiden 3'frg5023s/-5972as. Dieses Fragment hat eine Länge von 955 bp und besitzt am 5'-Ende eine *Cla* I- und am 3'-Ende eine *Eco*R I-Schnittstelle. Aufgrund einer Methylierung im Bereich der *Cla* I-Erkennungssequenz war es jedoch nicht möglich, diese Schnittstelle zu verwenden. Für die Klonierung in den Polylinker B des KO-Vektors wurde stattdessen ebenfalls eine *Eco*R I-Schnittstelle verwendet, die aus dem prokaryotischen Klonierungsvektor stammt. Da eine gerichtete Klonierung somit nicht möglich war, war es notwendig, die Orientierung des 3'-Vektorarms im KO-Vektor über eine zusätzliche Restriktionsanalyse zu ermitteln.



**Abb. 5.5:** Schematische Darstellung des 3'-Vektorarms (rot). Für die Klonierung in den KO-Vektor verfügt der Primer 3'frg5023s über eine *Cla*I-Schnittstelle, die jedoch nicht verwendet wurde. Stattdessen erfolgte die Klonierung über die zusätzlich am Ende befindliche *Eco*R I-Restriktionsstelle. Der Primer 3'frg5972as verfügt an seinem 3'-Ende ebenfalls über eine *Eco*R I-Schnittstelle.

### 5.1.2.3 Der KO-Vektor: Einbau von mutierten loxP-Sequenzen

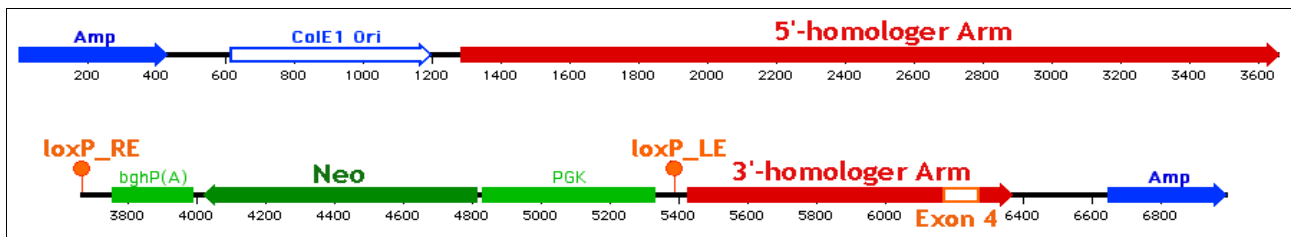
Im Falle eines erfolgreichen homologen Rekombinationsereignisses würde der Bereich des bLG-Gens zwischen den beiden homologen Vektorarmen (Exon 1-3) durch die positive Selektionskassette (hier das Neomycin-Resistenzgen) ersetzt werden, die somit im bovinen Genom verbliebe. Um diese später wieder entfernen zu können, wurden modifizierte loxP-Elemente vor und hinter der Neomycin-Resistenzkassette eingebaut. Diese Modifikation betrifft die vorderen 5 bp des ersten loxP-Elements (loxP\_RE) bzw. die hinteren 5 bp des zweiten loxP-Elements (loxP\_LE; siehe Punkt 2.8). Für den Einbau dieser loxP-Elemente in den KO-Vektor war es notwendig, die Primer bLG-5'frg2481as und bLG-3'frg5023s zu verändern. Dabei wurde ersterer um die loxP\_RE-Sequenz und letzterer um die loxP\_LE-Sequenz erweitert. Mit diesen Oligonukleotiden wird an das 3'-Ende des 5'-Vektorarms das loxP\_RE-Element und an das 5'-Ende des 3'-Vektorarms das loxP\_LE-Element angefügt (Abb. 5.6).



**Abb. 5.6:** Schematische Darstellung der Lokalisation der loxP-Elemente. Gezeigt sind die beiden homologen Vektorarme (rot) mit dem jeweiligen Primer, der um das entsprechende loxP-Element erweitert wurde. Am Ende der loxP-Sequenzen befinden sich die für die Klonierung in den KO-Vektor benötigten Restriktionsschnittstellen.

Nach der Amplifikation der Vektorarme wurden diese sequenziert, um sicherzustellen, dass die Nukleotid-Abfolge korrekt ist und die entsprechenden Restriktionsschnittstellen und loxP-Elemente enthalten sind. Im letzten Schritt wurden die kompletten Vektorarme in die beiden Polylinker des KO-Vektors inseriert. Der erfolgreiche Einbau der beiden Vektorarme in den KO-Vektor wurde jeweils in einer PCR mit den Primern 5'frg101s/-2481as bzw. 3'frg5023s/-5972as, die bereits für die Amplifikation des jeweiligen Vektorarms verwendet wurden, überprüft. Der fertige Vektor pKO-bLG ist schematisch in Abbildung 5.7 dargestellt.





**Abb. 5.7: Schematische Darstellung des Vektors pKO-bLG.** In Rot dargestellt sind die homologen Vektorarme, die Neomycin-Resistenzkassette (Neo=Neomycin-Resistenzgen, PGK=PGK-Promotor, bghP(A)=Polyadenylierungs-Sequenz) ist grün abgebildet und wird von den beiden loxP-Elementen flankiert. Der Vektor wurde im Ampicillin-Resistenzgen (Amp) linearisiert. ColE1 Ori=bakterieller Replikationsursprung

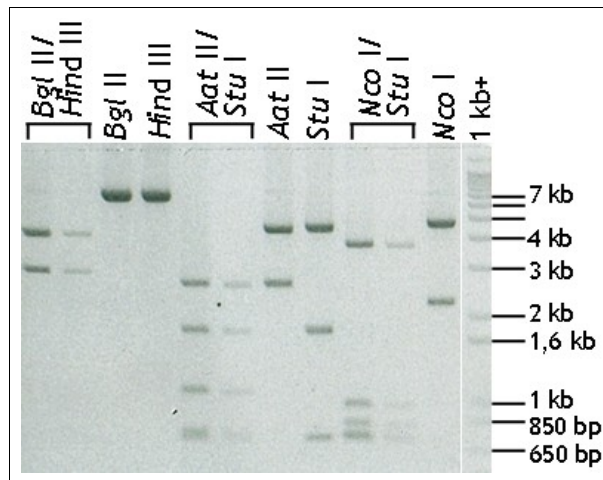
### 5.1.3 Der Vektor pKO-bLG

Um Abweichungen im Aufbau des Vektors pKO-bLG zu erfassen, die nicht mit der PCR auf der Basis der Primer 5'frg101s/-2481as bzw. 3'frg5023s/-5972as (s.o.) aufgedeckt werden können (z.B. die Integration mehrerer Kopien eines Vektorarms), wurde der Vektor abschließend in verschiedenen Einzel- und Doppelrestriktionen analysiert. Dazu wurden die in Tabelle 5.1.2 aufgeführten Endonukleasen verwendet.

ENDONUKLEASE(N)	ERWARTETE FRAGMENTGRÖSSE(N)
<i>Bgl</i> II	6994 bp
<i>Hind</i> III	6994 bp
<i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III	4203 bp, 2791 bp
<i>Aat</i> II	4459 bp, 2535 bp
<i>Stu</i> I	4580 bp, 1740 bp, 674 bp
<i>Aat</i> II/ <i>Stu</i> I	2535 bp, 1740 bp, 1313 bp, 732 bp, 674 bp
<i>Nco</i> I	4817 bp, 2177 bp
<i>Nco</i> I/ <i>Stu</i> I	3870 bp, 947 bp, 793 bp, 710 bp, 674 bp

**Tab. 5.1.2:** Erwartete Fragmentgrößen für den Vektor pKO-bLG nach Restriktion mit den aufgeführten Endonukleasen.

Die in Abbildung 5.8 gezeigten Restriktionen stimmen alle mit den erwarteten Fragmentgrößen überein (siehe Tabelle 5.1.2). Das Konstrukt konnte somit für die geplanten Transfektionen von BFF verwendet werden.



**Abb. 5.8: Gelelektrophoretische Analyse des Vektors pKO-bLG nach Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen.** Alle Banden entsprechen den in Tabelle 5.1.2 aufgeführten Fragmentgrößen. In den Doppelrestriktionen sind jeweils zuerst der Originalansatz und daneben eine Verdünnung des Ansatzes aufgetragen.

#### 5.1.4 Der Vektor pKO-bLG-SV40nls

Die Arbeit von Mir und Piedrahita hat gezeigt, dass die Effizienz einer gezielten Veränderung des Genoms durch homologe Rekombination in primären fetalen Fibroblasten signifikant gesteigert werden kann, wenn ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, nls) im Knockout-Konstrukt enthalten ist und die Zellen zudem vor der Transfektion in der S-Phase synchronisiert werden [69]. Daraufhin wurde beschlossen, dieses vielversprechende Verfahren im Rahmen der vorliegenden Arbeit anzuwenden. Dazu wurde die als Kernlokalisierungssignal fungierende Sequenz aus dem SV40-Promotor des eukaryontischen Expressionsvektors pEGFP-N1 mit den Oligonukleotiden SV40nls-90s und SV40nls-244as amplifiziert.

Beide Primer verfügen an ihrem 5'-Ende über eine *Bgl*/II-Erkennungssequenz, über die die SV40-Kernlokalisierungssequenz in die *Bgl*/II-Schnittstelle direkt vor dem 5'-Vektorarm inkloniert wurde (Abb. 5.9), wobei die Orientierung der Kernlokalisierungssequenz dabei nicht relevant ist.

Die korrekte Nukleotidabfolge der Kernlokalisierungssequenz wurde vor dem endgültigen Einbau in den KO-Vektor in einer Sequenzanalyse bestätigt.

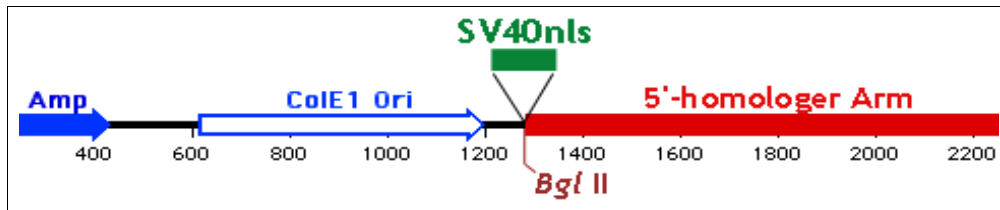


Abb. 5.9: Schematische Darstellung des Insertionsorts der SV40-Kernlokalisierungssequenz im Vektor pKO-bLG. Die SV40 Kernlokalisierungssequenz (SV40nls, grün) wurde ungeachtet ihrer Orientierung in die *Bgl* II-Schnittstelle inkliniert. Der daraus resultierende Vektor wurde als pKO-bLG-SV40nls bezeichnet.

## 5.2 ETABLIERUNG VON PCR UND SOUTHERN-ANALYSE ZUM NACHWEIS EINER HOMOLOGEN REKOMBINATION

Die PCR ist die Methode der Wahl, um eine große Anzahl an Klonen in relativ kurzer Zeit auf ein homologes Rekombinationereignis zu testen. Dabei muss für einen der beiden Primer ein Bindungsmotiv gewählt werden, das nur im Vektor enthalten ist, während der andere Primer in einem genomischen Bereich binden muss, der nicht im Vektor vorhanden sein darf. Um die Ergebnisse aus der PCR zu verifizieren und zu spezifizieren bedarf es einer weiteren Nachweismethode. Dies ist üblicherweise und auch in der vorliegenden Arbeit die Southern-Analyse der DNA des betreffenden Klons.

### 5.2.1 Die nested-PCR

#### 5.2.1.1 Generierung einer Positiv-Kontrolle

Eine essentielle Komponente für das PCR-Nachweisverfahrens ist eine geeignete Positiv-Kontrolle. Diese diente zunächst dazu, die PCR zu optimieren. Nachdem die nested-PCR etabliert war, wurde die Positiv-Kontrolle dabei routinemäßig mitgeführt.

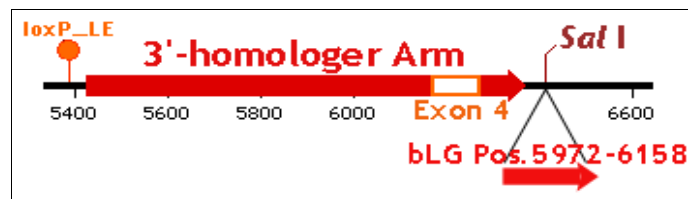
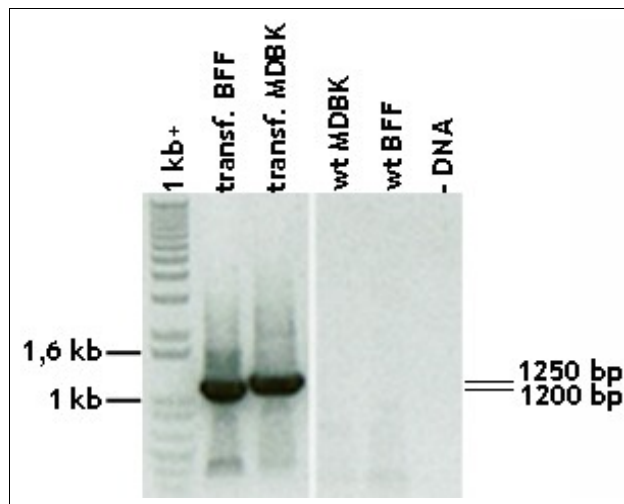


Abb. 5.10: Erweiterung des Vektors pKO-bLG zur Verwendung als Positiv-Kontrolle in der PCR. Für das PCR-Nachweisverfahren wurde ein Bereich des bLG in die *Sal* I-Schnittstelle des KO-Vektors im Anschluss an den 3'-homologen Arm inkliniert. In dem resultierenden Vektor pKO-bLG-poko3' sind beide Bindungsmotive für das Primerpaar der Nachweis-PCR enthalten.

In einem ersten Schritt wurden die Bereiche festgelegt, innerhalb derer die Bindungsstellen der beiden Primer für das PCR-Nachweisverfahren liegen sollten. Ausgewählt wurden dazu der Promotor der Selektionskassette (vektorielle Sequenz) und die bovine Sequenz, die an den 3'-homologen Vektorarm

anschließt. Im zweiten Schritt wurde der KO-Vektor so verändert, dass er die Bindungsmotive für beide Primer enthält. Zu diesem Zweck wurde ein 186 bp-Fragment der bLG-Sequenz, das stromabwärts des 3'-Vektorarm liegt, über die *Sal*I-Schnittstelle in den Vektor eingeführt (Abb. 5.10). Mit diesem Konstrukt (pKO-bLG-poko3') wurde eine bovine Nierenzelllinie (*Mardin Darbin Bovine Kidney*, MDBK) transient transfiziert.

Die PCR mit dem Lysat dieser transfizierten Zelllinie lieferte ein Amplifikat, das um etwa 50 bp länger ist als das PCR-Produkt, welches bei einem regelrechten homologen Rekombinationsereignis entsteht würde. Diese Größendifferenz kommt dadurch zustande, dass sich zwischen dem Ende des 3'-homologen Arms und der *Sal*I-Schnittstelle ein kleiner Bereich vektorierter DNA befindet, der mitamplifiziert wird, was auch auf dem Agarosegel sichtbar ist (Abb. 5.11). Auf diese Weise können später mögliche Kontaminationen mit der Positiv-Kontrolle problemlos aufgedeckt werden.



**Abb. 5.11: Größenunterschied zwischen den PCR-Amplifikaten aus homolog rekombinierter DNA und der verwendeten Positivkontrolle.** Gezeigt sind die Amplifikate aus einem PCR-Ansatz mit dem Primerpaar PGK-4052s/bLG-6095as. Neben dem Größenstandard ist das Lysat von BFF aufgetragen, die mit dem KO-Konstrukt (pKO-bLG) transfiziert wurden und daneben das Lysat der etablierten Positiv-Kontrolle (transient mit dem Konstrukt pKO-bLG-poko3' transfizierte MDBK). Als Negativ-Kontrollen wurde je ein Ansatz eines Lysats aus untransfizierten MDBK bzw. BFF (wtMDBK, wtBFF) und ein Ansatz ohne DNA (-DNA) mitgeführt.

### 5.2.1.2 Etablierung und Optimierung der nested-PCR

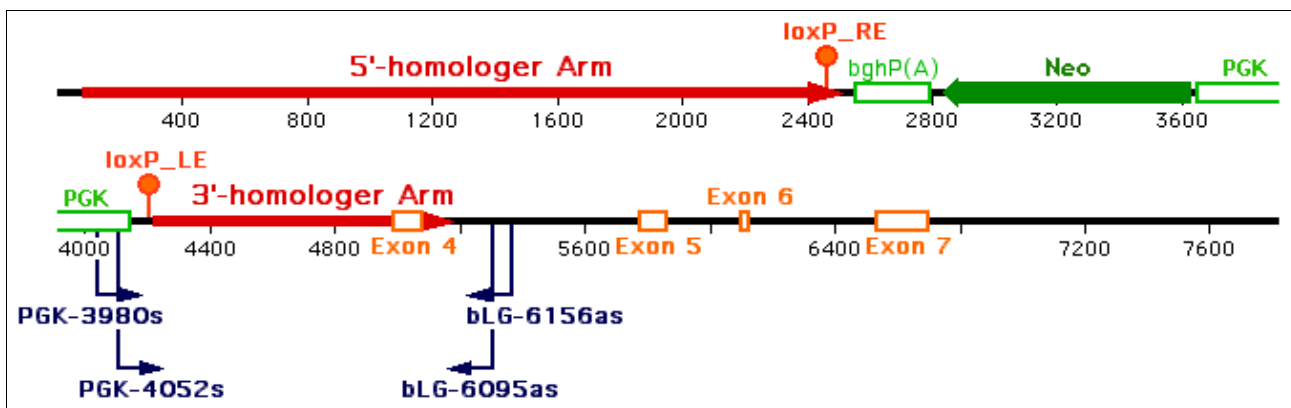
#### 5.2.1.2.1 Allgemeine Aspekte

Verwendet man das Produkt einer klassischen PCR als Matrize für eine weitere PCR mit anderen, innerhalb des ersten Amplifikats liegenden Primern, so wird dieses Verfahren als verschachtelte (=nested) PCR bezeichnet. Da in der nested-PCR (nPCR) zwei exponentielle Amplifikationen hintereinander geschaltet werden, können mit diesem Verfahren sehr geringe Mengen an DNA

nachgewiesen werden. Parallel zur Sensitivität wird durch diese Methode auch die Spezifität verbessert, da nahezu alle unspezifischen Produkte der ersten Reaktion in der zweiten Runde unberücksichtigt bleiben.

### 5.2.1.2.2 Konzeption und Durchführung der *nested*-PCR

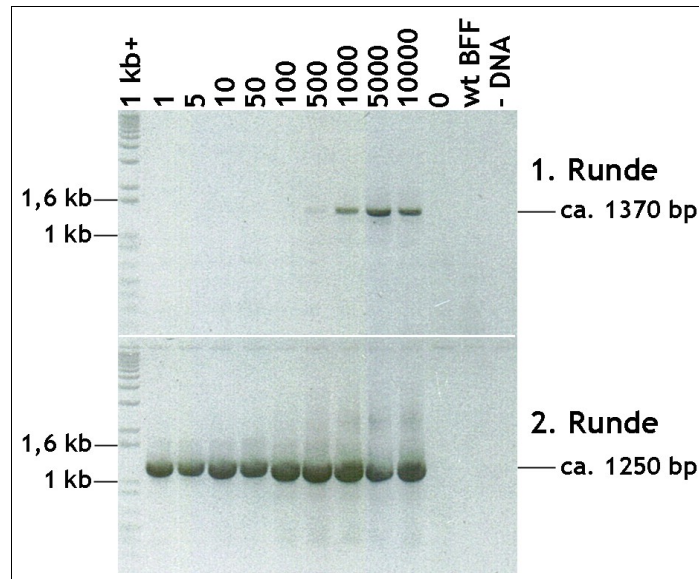
Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte nPCR beruht auf einem Standard-PCR-Protokoll, das entsprechend optimiert wurde. Dazu wurde die unter Punkt 5.2.1.1 beschriebene Positiv-Kontrolle (transfizierte MDBK) eingesetzt. In der ersten Runde wurden die äußeren Primer PGK-3980s und bLG-6156as verwendet, die ein Fragment mit einer Länge von ca. 1370 bp (Abb. 5.13, oberer Teil) aus einem Bereich amplifizieren, der den 3'-Vektorarm enthält (Abb. 5.12). In der darauf folgenden zweiten Runde der PCR wird ausgehend von diesem DNA-Abschnitt ein weiteres, kürzeres Fragment von ca. 1250 bp (Abb. 5.13, unterer Teil) amplifiziert. Für diesen Teil der PCR wurde das innere Primerpaar (PGK-4052s/bLG-6095as) eingesetzt (Abb. 5.12).



**Abb. 5.12: bLG-Genort nach homologer Rekombination mit dem Vektor pKO-bLG.** Die Exons 1 bis 3 wurden durch die Neomycin-Selektionskassette (grün) ersetzt. Außerdem ist die Position des äußeren (PGK-3980s/bLG-6156as) und inneren (PGK-4052s/bLG-6095as) Primerpaars für die nPCR eingezeichnet.

In Abbildung 5.13 ist die hohe Sensitivität der nested-PCR gut zu erkennen, die nach diversen Optimierungsschritten erreicht werden konnte. So war es möglich, eine einzelne mit dem Konstrukt pKO-bLG-poko3' transfizierte MDBK-Zelle unter  $1 \times 10^4$  Wildtyp-Zellen zu detektieren.

Zur Vermeidung von Kontaminationen sind eine Reihe von Maßnahmen unerlässlich. So wurde von Beginn an auch negatives Probenmaterial in die PCR eingesetzt (DNA aus untransfizierten Zellen). Des Weiteren wurde bei jeder PCR-Reaktion eine negative Kontrolle, d.h. ein Ansatz ohne DNA-Zugabe, mitgeführt. Die nPCR wurde in dieser beschriebenen Form immer als erstes Nachweisverfahren für ein homologes Rekombinationsereignis verwendet. Zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse wurde die betreffende DNA anschließend mit Hilfe des zweiten Nachweisverfahrens, der Southern-Analyse, untersucht.



**Abb. 5.13: nPCR mit einer Verdünnungsreihe der Positiv-Kontrolle (transient mit dem Vektor pKO-bLG-poko3' transfizierte MDBK).** Im oberen Teil der Abbildung ist die erste Runde mit dem äußeren Primerpaar PGK-3980s/bLG-6156as aufgetragen, im unteren Teil die zweite Runde mit dem inneren Primerpaar PGK-4052s/bLG-6095as. Die rechnerische Anzahl an transfizierten Zellen, die in die PCR eingesetzt wurde, ist über der Abbildung angegeben. Die Verdünnungsreihe wurde durch Mischen eines entsprechenden Volumens des Lysats der Positivkontrolle mit dem von untransfizierten MDBK hergestellt, sodass immer das Lysat von  $1 \times 10^4$  Zellen in die PCR eingesetzt wurde. Der Wert 0 entspricht dem Lysat von  $1 \times 10^4$  untransfizierten MDBK.

### 5.2.2 Die Southern-Analyse

Für die verwendete bLG-spezifische Sonde diente der 3'-homologe Bereich als Matrize, der auch als Vektorarm eingesetzt wurde, weshalb sie im Folgenden als 3'-Sonde bezeichnet wird. Sie wurde mit dem Primerpaar bLG3'frg1s/I.as amplifiziert und hat eine Länge von 1136 bp.

Für die Southern-Analyse wurde genomische DNA isoliert und anschließend mit geeigneten Restriktionsenzymen in handhabbare Fragmente geschnitten, da z. B. zu große Fragmente schlecht auf die Nylon-Membran transferiert werden können. Um beurteilen zu können ob eine homologe Rekombination stattgefunden hat, muss zudem eine Restriktionsschnittstelle innerhalb der vektorialen Sequenz und eine zweite im genomischen Bereich liegen. Die Wahl dieser Schnittstellen resultiert in Fragmenten unterschiedlicher Größe, die aussagekräftige Rückschlüsse auf die verschiedenen Möglichkeiten der Integration des KO-Vektors zulassen. Für die nachfolgenden Situationen entstehen Fragmente, deren Größen sich eindeutig zuordnen lassen:

1. Die Wildtyp-Form des bLG-Gens bleibt erhalten
2. Der KO-Vektor oder Teile davon werden an einer beliebigen Stelle in die DNA inseriert
3. Der KO-Vektor wird über homologe Rekombination aufgenommen

Die unter dem ersten Punkt genannte Situation ist immer nachweisbar - also auch bei einer homologen

Rekombination - da es äußerst unwahrscheinlich ist, dass der Vektor mit beiden Allelen gleichzeitig rekombiniert. Der Nachweis des Wildtyp-bLG-Allels dient somit als interne Kontrolle für die erfolgreiche Durchführung der Methode. Darüberhinaus kann anhand der Signalintensität des nachgewiesenen Wildtyp-Allels die erwartete Signalstärke des erfolgreich umgelagerten zweiten Allels vorhergesagt werden.

Die unter dem zweiten Punkt aufgeführte nicht-homologe Integration des Vektors in das bovine Genom kann nur im 3'-homologen Bereich untersucht werden, da innerhalb dessen die verwendete 3'-Sonde bindet. Wurde der 3'-homologe Vektorarm vollständig integriert, so entstehen definierte Fragmente (siehe Tabelle 5.2.1). Wurden nur Teile dieses Vektorarms in die genomische DNA aufgenommen, sind in der Southern-Analyse kleinere Fragmente zu sehen.

	<b>WILDTYP</b>	<b>HOMREK</b>	<b>VEKTOR</b>
<b><i>EcoR I</i></b>	4444 bp	3505 bp	1007 bp
<b><i>Nco I</i></b>	3126 bp	2878 bp	2177 bp
<b><i>Kpn I</i></b>	3440 bp	3970 bp	>4560 bp
<b><i>Sac I</i></b>	4524 bp	5845 bp	>4267 bp

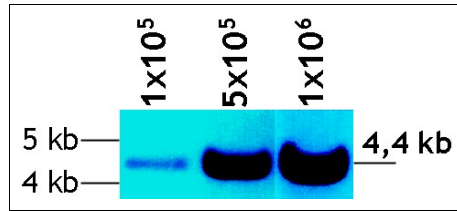
**Tab. 5.2.1: In der Southern-Analyse erwartete Fragmentgrößen nach Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen.** Nach Hybridisierung mit der 3'-Sonde können die aufgelisteten Fragmente des Wildtyp-bLG-Allels, des homolog rekombinierten bLG-Allels (homRek) und des vollständig integrierten 3'-Vektorarms (Vektor) detektiert werden.

Im Experiment wurde die DNA zunächst mit den Endonukleasen *EcoR I* und *Nco I* geschnitten, auf eine Membran transferiert und mit der spezifischen Sonde hybridisiert. Da erst Anfang des Jahres 2005 die vollständige Sequenzinformation für das bovine Genom zur Verfügung stand, konnten ab diesem Zeitpunkt zwei weitere Restriktionsenzyme (*Kpn I* und *Sac I*; Tab. 5.2.1) für die Southern-Analyse verwendet werden. Die Schnittstellen der in Tabelle 5.2.1 aufgeführten Endonukleasen und die entstehenden Fragmente für die eben beschriebenen drei Situationen sind im Anhang (Abb. 7.1) zusammengefasst.

### **5.2.2.1 Bestimmung der Nachweisgrenze der verwendeten 3'-Sonde**

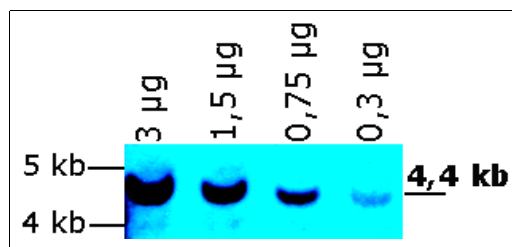
Um eine Vorstellung von der Sensitivität der verwendeten 3'-Sonde zu bekommen, wurden untransfizierte BFF mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  ausgesät. Eine Dichte von  $1 \times 10^5$  entspricht der Anzahl an Zellen in der Vertiefung einer 96M-Platte im konfluenten Zustand. Für das Experiment wurden die Zellen anschließend in den Kavitäten der 96M-Platte lysiert, die DNA isoliert und mit *EcoR I* verdaut. Nach dem Transfer auf die Membran wurde mit der 3'-Sonde hybridisiert.

Abbildung 5.14 zeigt, dass bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  und einer Expositionszeit von 2-3 h die erwartete Bande des Wildtyp-bLG-Allels bei 4,4 kb in guter Intensität detektiert werden konnte.



**Abb. 5.14: Southern-Analyse zur Bestimmung der Sensitivität der 3'-Sonde.** Eingesetzt wurde *EcoR* I-verdaute DNA aus untransfizierten BFF. Die Zellen wurden mit der angegebenen Zellzahl in 96M-Platten ausgesät und anschließend für die Restriktion aufbereitet.

In einem zweiten Schritt wurde eine Southern-Analyse mit definierten DNA-Mengen durchgeführt. Dazu wurde DNA aus Wildtyp-BFF ebenfalls mit *EcoR* I geschnitten. Dabei zeigte sich, dass mit der spezifischen Sonde das 4,4 kb-Fragment auch bei der geringsten DNA-Menge von 0,3  $\mu\text{g}$  in deutlicher Intensität nachgewiesen werden kann (Abb. 5.15). Dieser Vorversuch mit der DNA-Verdünnungsreihe beruht auf der Überlegung, dass eine normale eukaryontische Zelle etwa 6  $\mu\text{g}$  DNA enthält, was bei einer Zellzahl von etwa  $1 \times 10^5$  einer Gesamt-DNA-Menge von ca. 0,6  $\mu\text{g}$  entspricht.



**Abb. 5.15: Southern-Analyse zur Bestimmung der Nachweisgrenze der 3'-Sonde.** Es wurde DNA aus Wildtyp-BFF mit *EcoR* I verdaut und in den angegebenen Mengen aufgetragen.

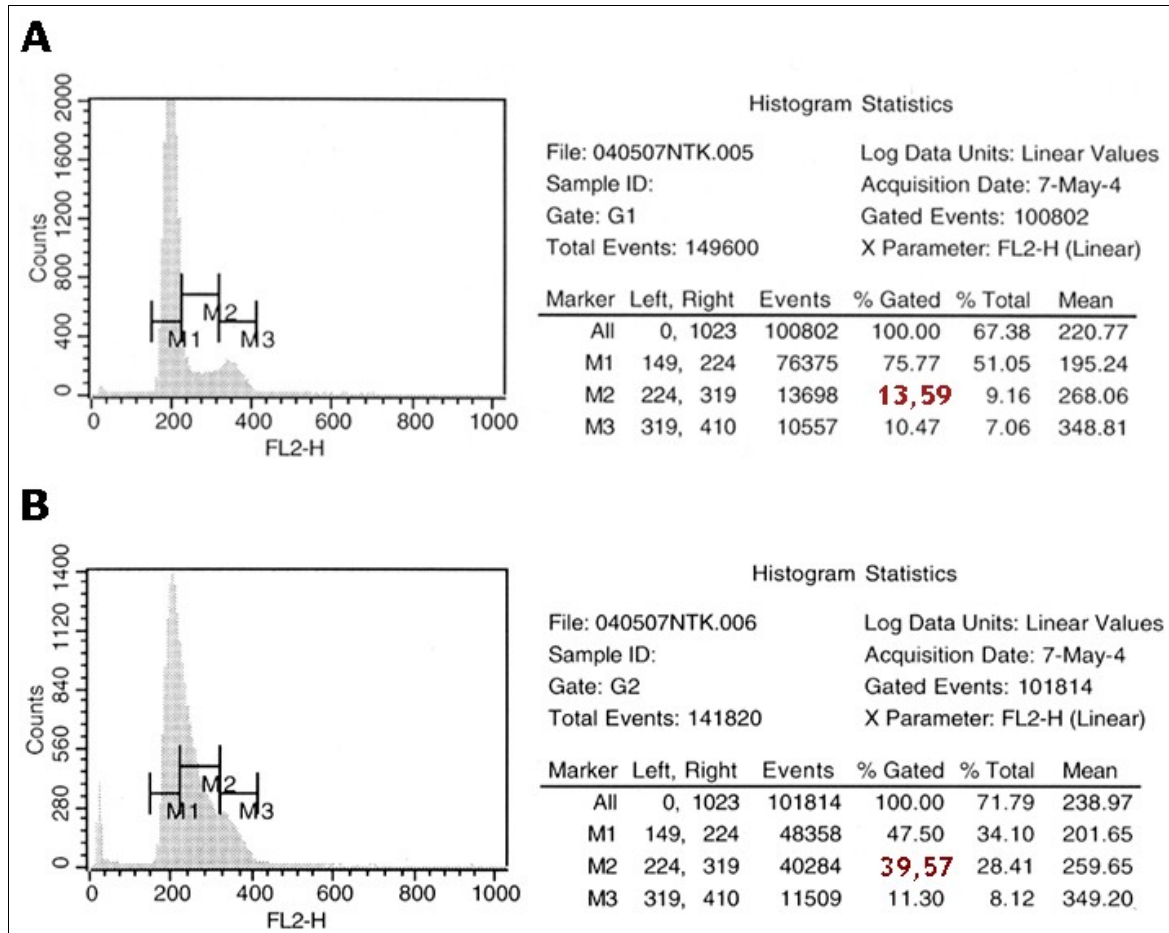
Bei dem geringen Ausmaß an unspezifischem Hintergrundsignal war es problemlos möglich, die Expositionszeit wesentlich zu verlängern. Für die späteren KO-Experimente wurde dies auch erforderlich, da sich bei einer homologen Rekombination die Intensität des in den Abbildungen 5.14 und 5.15 gezeigten 4,4 kb-Fragments zwangsläufig auf zwei Banden aufteilen würde (4,4 kb und 3,5 kb; siehe Tab. 5.2.1). Mit einer Verlängerung der Expositionszeit auf 40 h kann sowohl die eben beschriebene Situation sicher erfasst werden, als auch Fälle, bei denen die Klone zum Zeitpunkt der Analyse deutlich von der idealen Zellzahl von  $1 \times 10^5$  abweichen.

### 5.3 S-PHASE-SYNCHRONISIERUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE

Mir und Piedrahita konnten in einer Arbeit aus dem Jahre 2004 zeigen, dass die Anzahl an homolog rekombinierten Klonen signifikant gesteigert werden kann, wenn die Fibroblasten in der S-Phase



synchronisiert werden und das KO-Konstrukt zudem ein Kernlokalisierungssignal enthält [69]. In Anlehnung an diese Arbeit wurden BFF vor der Transfektion durch Inkubation mit Thymidin in der S-Phase synchronisiert und dieser Anteil nach Färbung der Zellen mit Propidiumjodid (PI) durchflusszytometrisch bestimmt.



**Abb. 5.16: Zellzyklus-Analyse von unbehandelten und Thymidin-synchronisierten BFF mittels Durchflusszytometer.** Die Zellen wurden mit PI gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. **A-** unbehandelte BFF. **B-** S-Phase-synchronisierte BFF nach Inkubation mit 2 mM Thymidin für 24 Stunden. Der Bereich M2 entspricht dem Anteil der in der S-Phase befindlichen Zellen (Werte in Rot).

Bei unbehandelten BFF ist ein Anteil von ca. 75 % in der G0/G1-Phase (Bereich M1), 13,6 % befinden sich in der S-Phase (Bereich M2) und 10,5 % in der G2- bzw. Mitose-Phase (Bereich M3). Nach S-Phase-Synchronisierung durch Inkubation der Zellen mit 2 mM Thymidin für 24 h ist der Anteil in M1 auf 47,5 % gesunken, während sich nun annähernd 40 % der Zellen in der S-Phase (M2) befinden (Abb. 5.16). Der Anteil der in der S-Phase befindlichen Zellen konnte also im Gegensatz zu unbehandelten Zellen fast um das dreifache gesteigert werden. Der Anteil der mitotischen und in der G2-Phase befindlichen Zellen liegt nahezu unverändert bei rund 11 %. Dieses Ergebnis konnte durch weitere Analysen bestätigt werden. Wichtig ist dabei auch die Beobachtung, dass Thymidin-synchronisierte Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen weder vor noch nach den Transfektionen eine veränderte Überlebensrate oder Morphologie zeigten.

Das Ergebnis dieser Zellzyklus-Analyse stimmt sehr gut überein mit den Werten, die Mir und Piedrahita für die Zell-Synchronisierung von bovinen fetalen Fibroblasten mittels Thymidin-Block angeben [69]. Die Autoren fanden einen Anteil von 71,1 % der unbehandelten Fibroblasten in der G0/G1-Phase (M1), der bei den Thymidin-behandelten auf 37,6 % sank. Dagegen stieg der Prozentsatz von Zellen, die sich in der S-Phase befinden von 15,2 auf 53,9. Der Anteil der mitotischen und in der G2-Phase befindlichen Zellen änderte sich ebenfalls nur geringfügig (Absenkung von 13,7 % auf 8,5 %).

## 5.4 TRANSFEKTION VON BOVINEN FETALEN FIBROBLASTEN

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das  $\beta$ -Lactoglobulin (bLG) in bovinen fetalen Fibroblasten (BFF) ausgeknockt werden. Dazu wurden die Zellen mit einem KO-Konstrukt transfiziert. Für diese Transfektionen wurden die beiden gängigsten Methoden, Elektroporation und Lipofektion, angewendet und bezüglich ihrer Effizienz bei der genetischen Manipulation von eukaryontischen Zellen miteinander verglichen werden. Die Methode der „Nucleofection“ der Firma *Amaza* wurde dabei als Sonderform der Elektroporation gewählt. Diese Technologie kombiniert die herkömmliche Elektroporation mit optimierten Parametern und Puffern für jeden Zelltyp, und garantiert eine hohe Transfektionseffizienz durch Einbringen der exogenen DNA direkt in den Zellkern. Die Lipofektionen wurden mittels liposomaler Transfektionsreagenzien der Firma *Invitrogen* durchgeführt.

Die Zellen jedes einzelnen Transfektions-Ansatzes wurden zunächst als Gesamtpopulation propagiert und anschließend vereinzelt. Selektionsbeginn und Vereinzlung wurden in der Regel in einem Schritt durchgeführt.

### 5.4.1 Vorbereitung des KO-Vektors

Der in Bakterien vermehrte und daraus isolierte zirkuläre KO-Vektor muss vor einer Transfektion linearisiert werden, damit es überhaupt zu einer homologen Rekombination zwischen exogener und genomischer DNA kommen kann. Bei dem anfänglich verwendeten Konstrukt pKO-bLG wurde dafür in der ersten Nucleofektion das Restriktionsenzym *Sal*I verwendet (Abb. 5.17). Aufgrund der in diesem Experiment gewonnenen Erkenntnisse (siehe Punkt 5.4.2.1) wurde dieser Vektor für folgende Transfektionen mit *Pvu*I (Abb. 5.17) linearisiert. Das in den späteren Versuchen eingesetzte Konstrukt pKO-bLG-SV40nls wurde analog zu der Arbeit von Mir und Piedrahita direkt vor der Kernlokalisierungssequenz mit *Hpa*I linearisiert (Abb. 5.17; [69]).

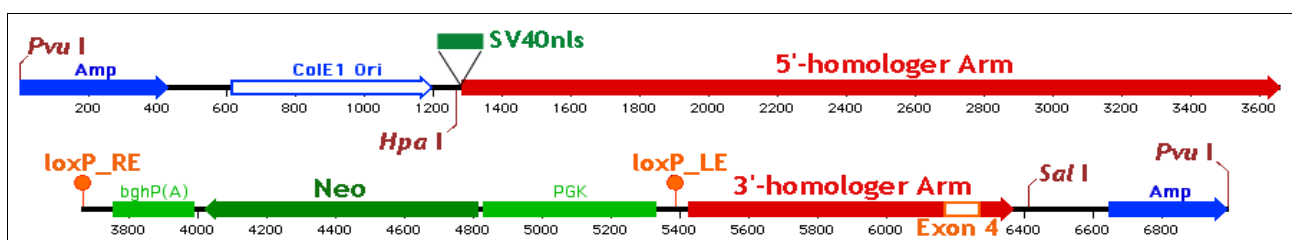


Abb. 5.17: Schematische Darstellung der Restriktionsschnittstellen für die Linearisierung. Der Vektor pKO-bLG wurde zuerst mit *Sal*I und später mit *Pvu*I linearisiert, der Vektor pKO-bLG-SV40nls mit *Hpa*I.

## 5.4.2 Nucleofectionen

Für die Transfektion mit dem Nucleofector™ wurden vordefinierte Programme verwendet, die jeweils für eine bestimmte Zelllinie optimiert sind. Im einzelnen wurden die Programme U-20 (optimiert für normale humane **neonatale** dermale Fibroblasten), U-23 und P-22 (optimiert für normale humane **adulte** dermale Fibroblasten) ausgewählt, da sie den verwendeten primären bovinen fetalen Fibroblasten am ehesten entsprechen.

### 5.4.2.1 Nucleofectionen von bovinen fetalen Fibroblasten der Linie 209

Die Tabellen 5.4.1 bis 5.4.3 geben eine Zusammenfassung der wichtigsten Daten der auswertbaren Nucleofectionen von BFF der Linie 209. Die vorangestellten Nummern (N1-N5) beziehen sich auf am selben Tag durchgeführte Ansätze mit Zellen, die gemeinsam aufgetaut und kultiviert wurden. Die im Versuch eingesetzte Zellzahl wurde - entsprechend der Vorgaben des Herstellers - weitgehend konstant gehalten ( $0,5-1 \times 10^6$  für U-20;  $4-5 \times 10^5$  für U-23), gleiches gilt für die verwendete DNA-Menge ( $1-5 \mu\text{g}$  für U-20,  $2-3 \mu\text{g}$  für U-23).

Nr.	PROGRAMM	ZELLZAHL	DNA-MENGE	LINEARISIERUNG	NACHWEISMETHODE	
					nPCR	SOUTHERN
N1	U-20	$1 \times 10^6$	$5 \mu\text{g}$	<i>Sal</i> I	0/10 (Pop.)	
	U-23	$1 \times 10^6$	$5 \mu\text{g}$	<i>Sal</i> I	0/10 (Pop.)	
N2	U-20	$5 \times 10^5$	$2,5 \mu\text{g}$	<i>Pvu</i> I	1/29	---
N3	U-20	$5 \times 10^5$	$1 \mu\text{g}$	<i>Pvu</i> I	2/259	0/2
	U-23	$5 \times 10^5$	$2 \mu\text{g}$	<i>Pvu</i> I	5/291	0/5

**Tab. 5.4.1: Nucleofectionen von BFF (Linie 209) mit dem Vektor pKO-bLG.** Neben den Ausgangsbedingungen (verwendetes Programm, Zellzahl, DNA-Menge und Linearisierungsstelle des KO-Konstrukts) ist die Gesamtanzahl an G418-resistenten Klonen und die Anzahl an Klonen mit positivem nPCR-Ergebnis angegeben. Mit den positiven Klonen aus dem Versuch N3 wurden in einer Southern-Analyse untersucht. Pop.=Populationen

Bei der ersten Nucleofection (N1) wurden die beiden Programme U-20 und U-23 unter sonst gleichen Bedingungen direkt miteinander verglichen. Nach der Transfektion erfolgte die Vereinzelung der Zellen über einen Zwischenschritt. Dazu wurden die beiden Transfektionsansätze nach zwei Tagen je 1:10 geteilt und jeweils ein Teil dieser insgesamt 20 Populationen in der nPCR getestet. Es konnte in keinem Fall ein positives PCR-Ergebnis nachgewiesen werden. Auch eine anschließende PCR mit spezifischen Primern zur Amplifikation des 3'-homologen Vektorarms war für alle Populationen negativ. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass dieser Vektorarm bedingt durch die unmittelbare Nähe zur Linearisierungsstelle im Verlauf der Transfektion teilweise abgebaut wurde (Abb. 5.17). Daher wurde für die folgenden Transfektionen eine andere Linearisierungsstelle gewählt. Die restlichen Zellen der Populationen wurden aufgrund des negativen nPCR-Ergebnisses verworfen.

Beginnend mit der zweiten Nucleofection (N2) erfolgte die Vereinzelung der transfizierten Zellen ohne Zwischenschritt direkt aus dem ursprünglichen Transfektionsansatz. Dabei wurden die Zellen in einer Dichte von  $2-3 \times 10^3$  pro Vertiefung einer 96M-Platte ausgesät (dieser empirische Wert wurde von Dr. R. Klose übernommen, in deren Arbeitsgruppe ebenfalls *Knockout*-Experimente mit bovinen Fibroblasten durchgeführt werden). Die Zellen wurden dann in der Regel am 2. bis 4. Tag nach der

Transfektion vereinzelt, wobei der genaue Zeitpunkt von der Vitalität der Zellen abhängig gemacht wurde. Von den in der nPCR getesteten 29 G418-resistenten Klonen konnte ein positiver identifiziert werden. Aufgrund seiner mangelnden Vitalität konnte dieser Klon allerdings nicht expandiert werden. Deshalb war es nicht möglich, das positive Ergebnis der nPCR in einer Southern-Analyse zu überprüfen. Auch bei dieser Nucleofection wurde ein Ansatz mit dem Programm U-23 durchgeführt, der jedoch aufgrund einer Fehlermeldung während des elektrischen Pulses nicht ausgewertet werden konnte.

Die dritte Nucleofection (N3) wurde wiederum mit beiden Programmen und analog den Bedingungen von N2 durchgeführt. Die PCR-Analyse des Ansatzes mit dem Programm U-20 identifizierte zwei positive von 259 getesteten G418-resistenten Klonen, während es im Ansatz mit dem Programm U-23 fünf positive Klone von 291 waren. Die sieben PCR-positiven Klone wurden anschließend in der Southern-Analyse überprüft. Das positive PCR-Ergebnis konnte jedoch für keinen Klon bestätigt werden, d.h. ein homologes Rekombinationereignis konnte in keinem Fall detektiert werden. Stattdessen bestätigte die Southern-Analyse bei den fünf Klonen aus dem Ansatz mit dem Programm U-23 eine (nicht-homologe) Integration des KO-Konstrukts (Abb. 5.19). Für die beiden Klone aus dem U-20-Ansatz konnte dagegen keine Integration des Vektors nachgewiesen werden (Abb. 5.19). Aufgrund dieser Befunde wurde beschlossen, weitere Nucleofektionen vorzugsweise mit dem Programm U-23 durchzuführen.

Bei den bisherigen Versuchen konnte beobachtet werden, dass der Vorteil der in N3 gezeigten höheren Transfektionseffizienz mit dem Programm U-23 durch den Nachteil einer höheren Mortalität gegenüber dem Programm U-20 kompensiert wird. Bei den Nucleofektionen mit dem Programm U-20 hat etwa die Hälfte der verwendeten BFF der Linie 209 die Prozedur der Transfektion nicht überlebt, mit U-23 waren es deutlich mehr als die Hälfte. Darüberhinaus waren die transfizierten Zellen aus den Ansätzen mit U-20 schon zu einem früheren Zeitpunkt wieder morphologisch in einem guten Zustand, d.h. sie regenerierten schneller und traten früher wieder in die Proliferationsphase ein. Somit scheint U-20 für diese Zellen das „schonendere“ Programm zu sein.

Ab der Nucleofection N4 wurde das Verfahren von Mir und Piedrahita mit Thymidin-synchronisierten Zellen und dem um die SV40-Kernlokalisierungssequenz erweiterten Konstrukt pKO-bLG-SV40nls angewendet [69].

Nr.	PROGRAMM	ZELLZAHL	DNA-MENGE	nPCR
N4	U-20	1x 10 <sup>6</sup>	2 µg	0/9

**Tab. 5.4.2: Nucleofection von Thymidin-synchronisierten BFF (Linie 209) mit dem Vektor pKO-bLG-SV40nls.** Neben eingesetzter Zellzahl und DNA-Menge ist die Gesamtanzahl an G418-resistenten Klonen und die Anzahl an Klonen mit positivem nPCR-Ergebnis angegeben.

Da die Autoren dieser Arbeit als Ergebnis ihrer Transfektions-Experimente eine Reduktion der Anzahl an G418-resistenten Klonen um einen Faktor 54 beschreiben, wurde für die Transfektion N4 das „schonendere“ Programm U-20 gewählt. Aus dieser Transfektion gingen neun G418-resistente Klone hervor, die jedoch in der nPCR alle negativ waren. Im Vergleich mit der vorherigen Nucleofection N3 konnte allerdings die von Mir und Piedrahita beschriebene Reduktion der Anzahl an Klonen mit einer nicht-homologen Integration des KO-Vektors bestätigt werden.

Nachdem durch die Thymidin-Behandlung kein negativer Effekt auf das Wachstum der transfizierten Zellen zu beobachten war, wurde für die folgende Nucleofektion (N5) wieder das Programm U-23 gewählt (Tab. 5.4.3). Bei dieser Nucleofektion wurden je  $5 \times 10^5$  Thymidin-synchronisierte BFF mit drei verschiedenen DNA-Mengen (2  $\mu\text{g}$ , 2,5  $\mu\text{g}$  und 3  $\mu\text{g}$ ) transfiziert. Die Ansätze mit 2  $\mu\text{g}$  und 3  $\mu\text{g}$  DNA wurden jeweils dreimal, der Ansatz mit 2,5  $\mu\text{g}$  DNA viermal hintereinander ausgeführt, d.h. die Anzahl an G418-resistenten Klonen muss zum Vergleich mit anderen Versuchen durch drei bzw. vier geteilt werden.

Nr.	ANSÄTZE	ZELLZAHL	DNA-MENGE	nPCR
N5	3	$5 \times 10^5$	2 $\mu\text{g}$	0/249
	4	$5 \times 10^5$	2,5 $\mu\text{g}$	0/384
	3	$5 \times 10^5$	3 $\mu\text{g}$	0/180

**Tab. 5.4.3: Nucleofektionen von Thymidin-synchronisierten BFF (Linie 209) mit dem Vektor pKO-bLG-SV40nls und Programm U-23.** Neben eingesetzter Zellzahl und DNA-Menge pro Ansatz ist die Gesamtanzahl an G418-resistenten Klonen und die Anzahl an Klonen mit positivem nPCR-Ergebnis für alle drei bzw. vier Ansätze angegeben.

Aus der Nucleofektion N5 gingen insgesamt 813 G418-resistente Klone hervor, von denen keiner in der nPCR positiv war (Tab. 5.4.3).

Der von Mir und Piedrahita beschriebene Effekt, dass bei Transfektion von Thymidin-synchronisierten Zellen mit einem um eine Kernlokalisierungssequenz erweiterten KO-Konstrukt deutlich weniger G418-resistente Klone entstehen, konnte im Vergleich mit der Nucleofektion N3 auch hier wieder bestätigt werden. Allerdings wurde die von den Autoren beschriebene Reduktion um einen Faktor 54 in diesem Experiment bei weitem nicht erreicht.

Aus den mit BFF der Linie 209 durchgeführten Nucleofektionen N1-N5 gingen insgesamt 1401 G418-resistente Klone hervor, wovon acht in der nPCR positiv waren. Sieben dieser acht Klone konnten anschließend in der Southern-Analyse überprüft werden.

#### 5.4.2.2 Nucleofektionen von bovinen fetalen Fibroblasten der Linie 207

Parallel zu den Transfektionen mit BFF der Linie 209 wurde eine Nucleofektion von Dr. S. Müller am Moorversuchsgut in Oberschleißheim mit BFF der Linie 207 durchgeführt. Bei dieser Nucleofektion wurde zusätzlich zu den Standard-Programmen (U-20 und U-23) das Programm P-22 verwendet, das ebenfalls für normale humane adulte dermale Fibroblasten entwickelt wurde und eine hohe Überlebensrate der Zellen gewährleisten soll.

Nr.	PROGRAMM	ZELLZAHL	DNA-MENGE	NACHWEISMETHODE	
				PCR	SOUTHERN
N1	U-20	$1 \times 10^6$	5 $\mu\text{g}$	1/70	---
	U-23	$1 \times 10^6$	5 $\mu\text{g}$	8/467	0/7
	P-22	$1 \times 10^6$	5 $\mu\text{g}$	18/487	1/8
$\Sigma$				27/1024	1/15

**Tab. 5.4.4: Nucleofektion von BFF der Linie 207** (*Pvu* I-linearisierter Vektor pKO-bLG). Neben den Ausgangsbedingungen (verwendetes Programm, Zellzahl und DNA-Menge) ist die Gesamtanzahl an G418-resistenten Klonen und die Anzahl an Klonen mit positivem nPCR-Ergebnis angegeben. Mit den PCR-positiven Klonen wurde nach Möglichkeit eine Southern-Analyse durchgeführt.

Bei diesem Experiment konnten 1024 G418-resistente Klone generiert werden, wobei die mit Programm P-22 durchgeführte Nucleofection zu überdurchschnittlich vielen nPCR-positiven Klonen führte ( $18/487=3,7\%$ ).

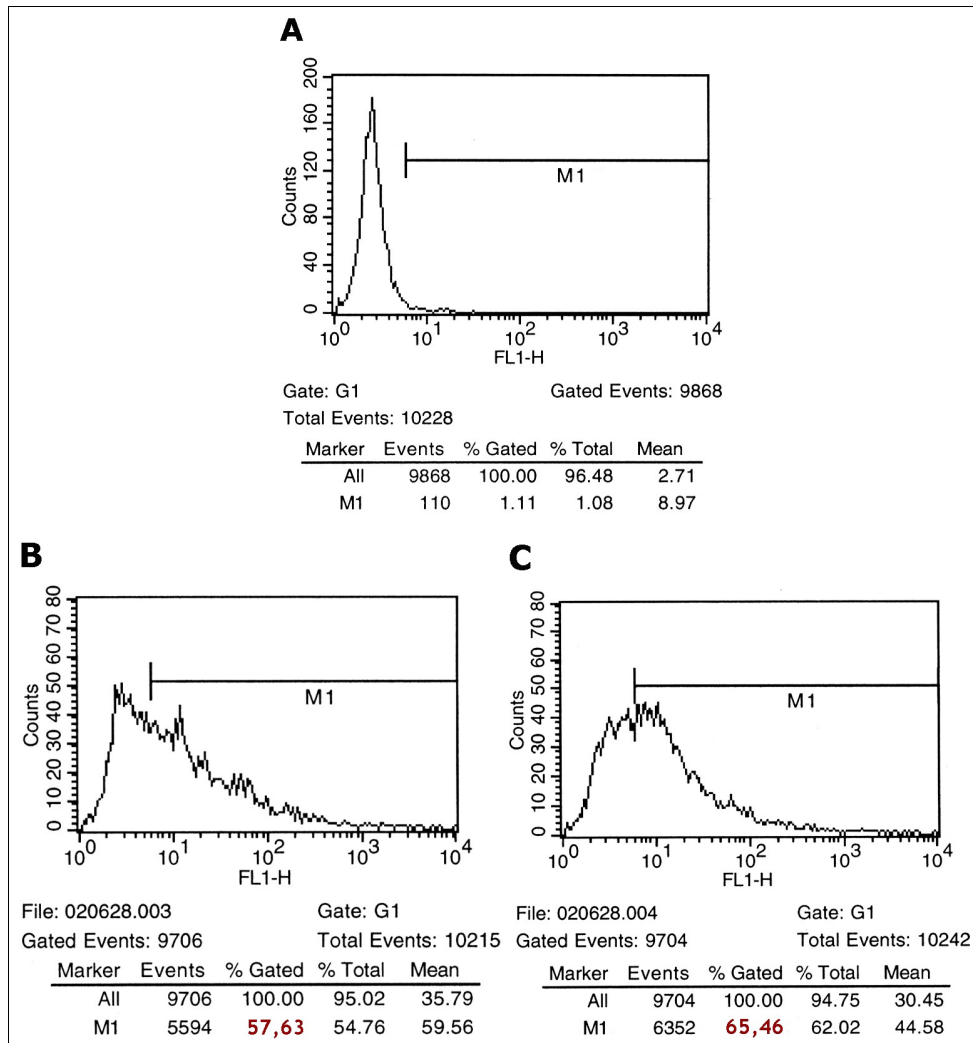
### **5.4.3 Lipofektionen von bovinen fetalen Fibroblasten der Linie 209**

Die Lipofektionen wurden mit dem Reagenz *Lipofectamine2000*<sup>TM</sup> der Firma *Invitrogen* durchgeführt. In einem Vorversuch wurden die verwendeten bovinen Fibroblasten der Linie 209 transient mit einem GFP-Konstrukt transfiziert, um die Effizienz der Transfektion durchflusszytometrisch bestimmen zu können.

#### ***5.4.3.1 Bestimmung der optimalen Konzentration des Lipofektions-Reagenz***

Ziel dieses Experiments war es, die optimale Konzentration des liposomalen Reagenz (maximale Transfektionseffizienz bei möglichst geringer Cytotoxizität) für die verwendeten Zellen zu ermitteln. Dazu wurden BFF der Linie 209 unter Verwendung von vier verschiedenen Lipofectamine-Konzentrationen (12, 16, 20 und 24  $\mu$ l) mit einem zirkulären GFP-Konstrukt (1,5  $\mu$ g pEGFP-N1, Clontech-Takara Bio Europe) transfiziert. Bei allen Ansätzen wurden  $2 \times 10^5$  Zellen 24 h vor der Transfektion ausgesät. Die Transfektionseffizienz wurde anschließend über den Anteil an grün fluoreszierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen aller vier Ansätze wurden am zweiten Tag nach der Transfektion 1:10 geteilt und eine Woche unter Selektion mit 1,2 mg/ml G418 kultiviert.

Die Ansätze mit 20  $\mu$ l bzw. 24  $\mu$ l Lipofectamine wurden aufgrund der hohen Cytotoxizität des Lipofektions-Reagenz nicht weiter analysiert, sodass nur die Ansätze mit 12  $\mu$ l und 16  $\mu$ l durchflusszytometrisch ausgewertet werden konnten (Abb. 5.18). Dabei konnte die Fluoreszenz der transfizierten Zellen, die hier gleichzusetzen ist mit der Transfektionseffizienz, von unter 60% mit 12  $\mu$ l auf über 65% mit 16  $\mu$ l Lipofectamine gesteigert werden. Dieses Ergebnis konnte in einer weiteren Analyse reproduziert werden. Bei allen folgenden Lipofektionen mit BFF der Linie 209 wurden daher 16  $\mu$ l Lipofectamine eingesetzt.



**Abb. 5.18: FACS-Analyse von BFF 209 zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von Lipofectamine.** Ausgehend von untransfizierten BFF (Kontrolle) wurde für die nachfolgenden Experimente ein Bereich M1 festgelegt, der den fluoreszierenden und somit transfizierten Zellen entspricht (Werte in Rot). A- untransfizierte BFF; Kontrolle B- transfizierte BFF; Reaktionsansatz mit 12  $\mu$ l Lipofectamine, C- transfizierte BFF; Reaktionsansatz mit 16  $\mu$ l Lipofectamine. Es wurden 1,5  $\mu$ g pEGFP-N1 eingesetzt und die Zellen nach einer Woche unter Selektion analysiert.

#### 5.4.3.2 Lipofection mit dem Knockout-Vektor

Die Tabelle 5.4.5 zeigt alle auswertbaren Lipofektionen mit BFF der Linie 209 an, die im Rahmen dieses Projekts durchgeführt wurden. Für diese Experimente wurden wie im Vorversuch  $2-3 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz ausgesät und 24 h später mit 1,5  $\mu$ g Vektor transfiziert.

Nr.	ZELLZAHL	DNA-MENGE	KONSTRUKT	LINEARISIERUNG	NACHWEISMETHODE	
					PCR	SOUTHERN
L1	2x 10 <sup>5</sup>	1,5 µg	pKO-bLG	<i>Pvu</i> I	6/151	---
L2	3x 10 <sup>5</sup> (T)	1,5 µg	pKO-bLG-SV40nls	<i>Hpa</i> I	2/4	0/2
<b>Σ</b>					<b>8/155</b>	<b>0/2</b>

**Tab. 5.4.5: Lipofektionen von BFF der Linie 209.** Neben den Ausgangsbedingungen (Zellzahl, DNA-Menge, KO-Konstrukt und Linearisierungsstelle) ist die Gesamtanzahl an G418-resistenten Klonen und die Anzahl an Klonen mit positivem nPCR-Ergebnis angegeben. Mit den positiven Klonen aus dem Versuch L2 wurde eine Southern-Analyse durchgeführt. (T): Thymidin-synchronisierte Zellen

Bei der ersten Lipofektion (L1) erfolgte die Vereinzelnung - analog zur ersten Nucleofektion (N1) - über einen Zwischenschritt. Dabei wurden zunächst zehn Populationen angelegt, die in der nPCR ohne Ausnahme positiv waren (Abb. 5.21). Aus diesen Populationen wurden dann 151 Einzelklone generiert, die wiederum in der nPCR getestet wurden. Mit dieser Nachweismethode wurden sechs positive Klone identifiziert, wobei es nicht gelang, diese Klone soweit zu expandieren, dass genug DNA für die Southern-Analyse zur Verfügung stand.

Die Lipofektion L2 wurde parallel zur Nucleofektion N4 nach dem Verfahren von Mir und Piedrahita mit dem um eine Kernlokalisierungssequenz erweiterten Konstrukt (pKO-bLG-SV40nls) in Kombination mit S-Phase-synchronisierten Zellen durchgeführt [69]. Die Vereinzelnung erfolgte analog zu den Nucleofektionen N2-N5 ohne Zwischenschritt direkt in 96M-Platten mit einer Zelldichte von 2-3x 10<sup>3</sup> pro Vertiefung und gleichzeitig wurde mit der Selektion begonnen. Aus dieser Lipofektion konnten vier G418-resistente Klone gewonnen werden, von denen zwei in der nPCR positiv waren. Die geringe Anzahl an G418-resistenten Klonen stimmt sowohl mit dem Ergebnis aus der Nucleofektion N4 überein als auch mit den von Mir und Piedrahita publizierten Daten.

## 5.5 ANALYSE VON NESTED-PCR-POSITIVEN POPULATIONEN UND KLONEN

Um den Rekombinationsstatus der aus den Transfektionen hervorgegangenen G418-resistenten Klone zu bestimmen, wurden diese zuerst in der *nested*-PCR (nPCR) getestet. Nach Möglichkeit wurden alle nPCR-positiven Klone für die Southern-Analyse expandiert, was aufgrund von Vitalität und Proliferationsverhalten der Klone nicht immer gelang.

ART DER TRANSFEKTION	NACHWEISMETHODE	
	PCR	SOUTHERN
Nucleofektionen	38/2425	1/28
Lipofektionen	8/155	0/2

**Tab. 5.5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Nucleofektionen und Lipofektionen von BFF der Linien 207 und 209.** Für jede Transfektionsart ist die Anzahl der G418-resistenten Klone mit positivem nPCR-Ergebnis angegeben, ebenso wie die Anzahl der nPCR-positiven Klone mit positivem Ergebnis in der Southern-Analyse. Nicht berücksichtigt sind dabei die in der nPCR getesteten Zellpopulationen.

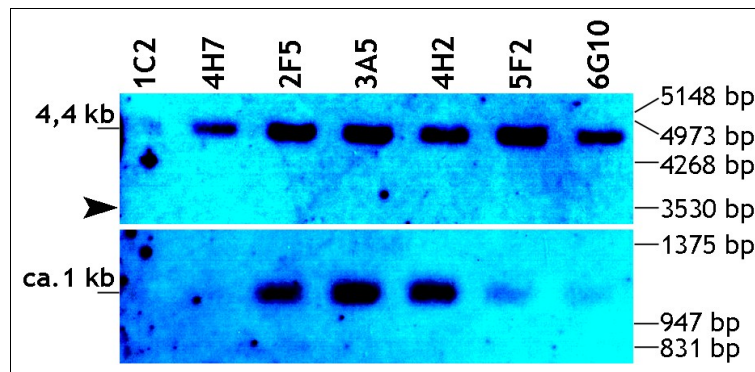
Bezüglich des Anteils an PCR-positiven zu getesteten Klonen scheint die Lipofektion unter den gegebenen Bedingungen die effizientere Methode zu sein. So waren hier mit 8 von 155 in der nPCR getesteten Klonen etwa 5 % positiv, während es bei den Nucleofektionen nur etwa 1,5 % (38 von 2425)



waren. Entsprechende Versuchsreihen, die von Dr. S. Müller durchgeführt wurden, unterstützen diese Beobachtung.

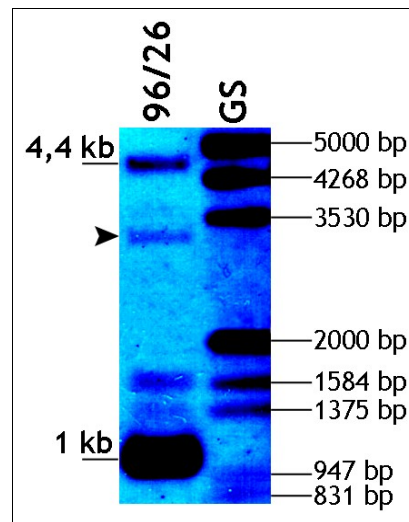
### 5.5.1 Analyse von nested-PCR-positiven Klonen aus Nucleofektionen

Alle aus der Nucleofection N3 (U-20/U-23, pKO-bLG *Pvu* I-linearisiert) erhaltenen sieben PCR-positiven Klone konnten weiterexpandiert werden, sodass für die Southern-Analyse genügend DNA zur Verfügung stand. Für das Experiment wurde die isolierte DNA der Klone einer *Eco*R I-Restriktion unterzogen und mit der 3'-Sonde hybridisiert.



**Abb. 5.19: Southern-Analyse der aufgeführten Klone aus der Nucleofection N3 mit BFF 209 (*Eco*R I-Restriktion).** Für alle Klone ist die 4,4 kb-Bande des wt-bLG-Allels zu sehen. Die Klone 2F5, 3A5, 4H2, 5F2 und 6G10 wurden unter Verwendung des Programms U-23 generiert und zeigen zusätzlich ein Signal bei etwa 1 kb, welches dem nicht-homolog integrierten KO-Konstrukt mit einem vollständigen 3'-Vektorarm entspricht. Die Klone 1C2 und 4H7 wurden mit dem Programm U-20 generiert. Eine Bande mit der erwarteten Größe von etwa 3,5 kb (Pfeil) nach homologer Rekombination mit dem KO-Vektor, ist bei keinem der Klone zu sehen. Da die DNA für die Southern-Analyse direkt in den Vertiefungen der Kulturplatten isoliert und geschnitten wurde, können die DNA-Mengen der einzelnen Klone voneinander abweichen.

Das Fehlen des 3,5 kb großen *Eco* RI-Fragments belegt eindeutig, dass alle 7 untersuchten Klone negativ für das gewünschte homologe Rekombinationsereignis sind. Auffällig war bei dieser Analyse, dass die beiden Klone 1C2 und 4H7, die unter Verwendung des Programms U-20 generiert wurden, lediglich eine 4,4 kb-Bande zeigten (Abb. 5.19). Diese entspricht dem unveränderten bLG-Allel (Tab. 5.2.1). Auch bei längerer Exposition des Röntgenfilms konnte weder die Bande des homolog rekombinierten bLG bei 3,5 kb noch eine andere Bande detektiert werden, die auf eine nicht-homologe Integration des Vektors in die genomische DNA schließen lässt. Dagegen weisen die restlichen fünf Klone (2F5, 3A5, 4H2, 5F2 und 6G10), die unter Verwendung des Programms U-23 erzeugt wurden, neben der Bande des Wildtyp-bLG-Allels (4,4 kb) eine zusätzliche Bande bei etwa 1 kb auf. Dies entspricht der Größe des Fragments, das bei Integration des Vektors in voller Länge in die bovine DNA entsteht. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden deshalb weitere Nucleofektionen vorzugsweise mit dem Programm U-23 durchgeführt (siehe Punkt 5.4.2.1).



**Abb. 5.20: Southern-Analyse des Klons 96/26 aus der Nucleofektion mit BFF der Linie 207 (*EcoR* I-Restriktion).** Neben der 4,4 kb-Bande des wt-bLG-Allels ist eine Bande im Bereich von etwa 3,5 kb erkennbar (Pfeil), die der erwarteten Größe nach homologer Rekombination mit dem KO-Vektor entspricht. Daneben sind mehrere Fehlintegrationsbanden zu sehen, unter anderem ein sehr intensives Signal bei etwa 1 kb. Dabei handelt es sich um multiple Kopien des nicht-homolog integrierten KO-Konstrukts mit einem vollständigen 3'-Vektorarm. Die weniger intensiven Signale stammen vermutlich von Fehlintegrationen des Konstrukts, deren 3'-Vektorarm verkürzt ist. GS=Größenstandard ( $\lambda$  x *Hind* III x *EcoR* I -Dig).

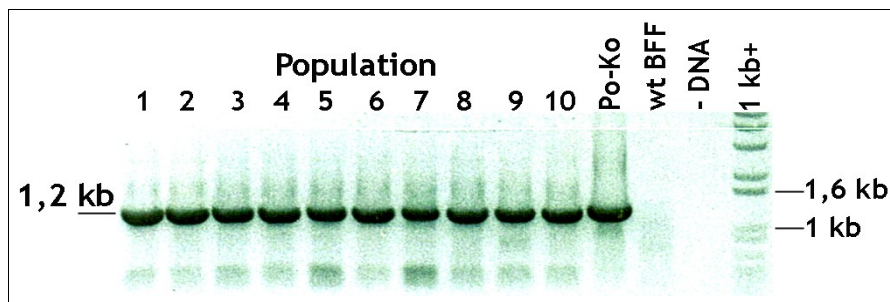
Von insgesamt 27 PCR-positiven Klonen aus der Nucleofektion mit BFF der Linie 207 (pKO-bLG *Pvu* I-linearisiert) konnten 15 in der Southern-Analyse überprüft werden (Daten nicht gezeigt).

Interessant war der Klon 96/26, bei dem neben der Bande des Wildtyp-bLG-Allels (4,4 kb) eine weitere im Bereich von etwa 3,5 kb detektiert werden konnte (Abb. 5.20, Pfeil). Der Nachweis dieser 3,5 kb-Bande spricht dafür, dass es bei diesem Klon zu einer homologen Rekombination gekommen ist. Die im Vergleich zur Wildtyp-bLG-Bande geringere Intensität könnte jedoch darauf hinweisen, dass nicht alle Zellen dieses „Klons“ das KO-Konstrukt homolog integriert haben. Bei dem mit Abstand stärksten Signal bei etwa 1 kb handelt es sich um multiple Kopien des KO-Konstrukts, deren 3'-Vektorarme in voller Länge in das Genom integriert wurden. Die schwächeren Signale deuten auf die Integration von KO-Konstrukten hin, deren 3'-Vektorarm verkürzt ist. Trotz der diversen

Fehlintegrationen wurde beschlossen, den Klon 96/26 für einen Kerntransfer-Experiment zu verwenden.

### 5.5.2 Analyse von nested-PCR-positiven Populationen und Klonen aus Lipofectionen

Nachdem die zehn aus der ersten Lipofektion (pKO-bLG *Pvu* I-linearisiert) erhaltenen Populationen in der nPCR alle positiv waren (Abb. 5.21), wurden die Amplifikate von zwei der zehn Populationen (1 und 3) exemplarisch mit den Primern für die zweite Runde der nPCR (PGK-4052s/bLG-6095as) sequenziert.



**Abb. 5.21: Positives nPCR-Ergebnis mit den zehn aus der Lipofektion L2 hervorgegangenen Populationen.** Es wurde jeweils eine vergleichbare Menge eines Zelllysats jeder Population eingesetzt. Alle zehn Populationen zeigen das für eine homologe Rekombination spezifische 1,2 kb große Amplifikat, welches erwartungsgemäß geringfügig kleiner ist als das der Positiv-Kontrolle (Po-Ko=mit dem KO-Konstrukt pKO-bLG-poko3' transfizierte MDBK). Als Negativkontrollen wurden ein Ansatz mit einer entsprechenden Menge eines Zelllysats aus untransfizierten BFF (wtBFF) und ein Ansatz ohne DNA (-DNA) mitgeführt.

Auf eine Southern-Analyse wurde hier verzichtet, da im Fall eines negativen Ergebnisses nicht ausgeschlossen werden kann, dass in der getesteten Population trotzdem ein homolog rekombinierter Klon enthalten ist, dessen DNA-Menge für einen Nachweis nicht ausreicht.

#### Pop.1 (bLG-6095as): Vergleich mit der theoretischen Sequenz des homolog rekombinierten bLG-Allels

Pop.1_bLG6095as	207	GTCCGGGGGGGACGGTGGGAGCAGGGAGCTT	GATTCCAGGAGGAGGAGG	256
theoret.Sequenz	5151	GGCCGGGGGGGACGGTGGGAGCAGGGAGCTT	GAATTCCAGGAGGAGGAGG	5200
		* ***** * *****		
Pop.1_bLG6095as	257	GATGGGGGGTCCCCGAGTCCCGCCAGGAGGGTGGTCAT		296
theoret.Sequenz	5201	GATGGGGGGTCCCCGAGTCCCGCCAGGAGGGTGGTCATATAACCGGGAG		5250
		*****		

**Sequenz 5.1: Vergleich der Sequenz des Amplifikats der Population 1 mit der theoretischen (computer-generierten) Sequenz des homolog rekombinierten bLG-Genorts.** Gezeigt ist der Übergang ausgehend von Primer bLG-6095as im Intron 4 (= genomische Sequenz) über die artifizielle *EcoR* I-Schnittstelle (orange markiert) bis in den 3'-Vektorarm. Blau markiert ist die bovine genomische Sequenz, die nicht im KO-Vektor vorkommt.

Das Ergebnis der Sequenzierung der Amplifikate bestätigt für beide Populationen einen Übergang

zwischen vektorieller und genomischer boviner Sequenz, wie er im Fall einer homologen Rekombination im Bereich des 3'-homologen Arms zu erwarten ist. Primer bLG-6095as im Intron 4 lieferte für die Population 1 Sequenz genomischen Ursprungs, innerhalb derer keine vektoriellen Anteile enthalten waren, wie z.B. die artifizielle, zum Zweck der Klonierung des 3'-Vektorarms eingefügte *EcoR* I-Erkennungssequenz am Ende dieses Vektorarms (Sequenz 5.1). Dass ausgehend vom reversen Primer PGK-4052s im Promotor der Selektionskassette des KO-Vektors eindeutig vektorielle Sequenz (die Restriktionsschnittstelle für die Klonierung und die loxP\_LE-Sequenz) identifiziert wurde bedeutet, dass die homologe Rekombination zwischen den beiden gezeigten Sequenzausschnitten erfolgt sein muss (Sequenz 5.2). Um weitgehend auszuschließen, dass es sich dabei um ein PCR-Artefakt handelt, wurde die nPCR mit den Lysaten dieser Populationen mehrfach wiederholt, wobei die Reaktionsbedingungen (Anlagerungszeit und -temperatur, Elongationsdauer und MgCl<sub>2</sub>-Konzentration) variiert wurden. Bei dem einzelnen Basenaustausch in der loxP\_LE-Sequenz (Sequenz 5.2) handelt es sich vermutlich um einen Fehler der Taq-Polymerase.

### **Pop.1 und 3 (PGK-4052s): Vergleich mit der theoretischen Sequenz des homolog rekombinierten bLG-Allels**

Pop.1_PGK-4052s	1	GCGCGCCGGGATCCCTAGAAATCGATCCTAGAGAATTCGCCCTTATC	46
Pop.3_PGK-4052s	1	GCGCCGGGATCCCTAGAAATCGATCCTAGAGAATTCGCCCTTATC	44
theoret.Sequenz	4151	TAGGGCGCGCCGGGATCCCTAGAAATCGATCCTAGAGAATTCGCCCTTATC	4200
		*****	
Pop.1_PGK-4052s	47	GATATAACTCCGTATAATGTATGCTATACGAACGGTATGAAGACGAACTC	96
Pop.3_PGK-4052s	45	GATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAACGGTATGAAGACGAACTC	94
theoret.Sequenz	4201	GATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAACGGTATGAAGACGAACTC	4250
		*****	
Pop.1_PGK-4052s	97	TGTCGCCCTCGCTCATTCACTTGTGGTTCCTAAATCCAAGATGAGAAAG	146
Pop.3_PGK-4052s	95	TGTCGCCCTCGCTCATTCACTTGTGGTTCCTAAATCCAAGATGAGAAAG	144
theoret.Sequenz	4251	TGTCGCCCTCGCTCATTCACTTGTGGTTCCTAAATCCAAGATGAGAAAG	4300
		*****	

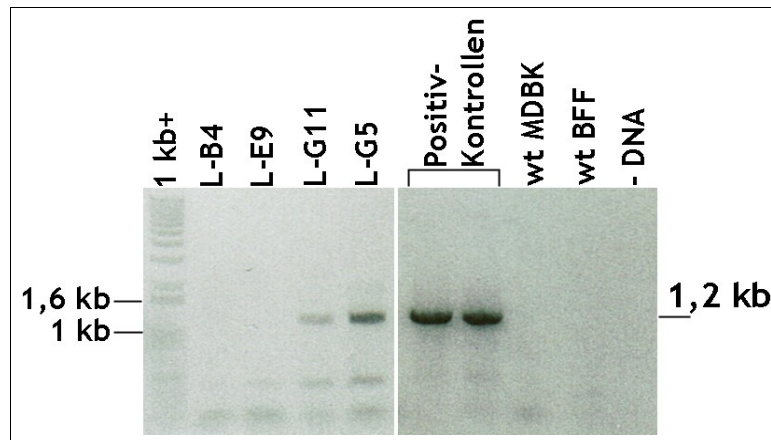
**Sequenz 5.2: Vergleich der Sequenzen der Populationen 1 und 3 mit der theoretischen (computer-generierten) Sequenz des homolog rekombinierten bLG-Genorts.** Gezeigt ist der Übergang ausgehend von Primer PGK-4052s im Promotor der Selektionskassette über die loxP\_LE-Sequenz (grün markiert, entspricht vektorieller Sequenz) bis in den 3'-Vektorarm (= genomische Sequenz). Rot hervorgehoben ist der Primer bLG-5023s, der für die Klonierung des 3'-Vektorarms in pKO-NV 1901 mit der loxP\_LE-Sequenz assoziiert war, außerdem die für diese Klonierung verwendete *EcoR* I-Schnittstelle (orange) und die nicht verwendete *Clal* I-Schnittstelle (blau).

Die Populationen wurden daraufhin zur Gewinnung von Klonen vereinzelt. Von den erhaltenen 151 Einzelklonen waren sechs in der nPCR positiv. Es gelang jedoch nicht, diese Klone für die Southern-Analyse zu expandieren. Aufgrund des positiven Ergebnisses der Sequenzierung konnten drei dieser PCR-positiven Klone als Kernspender in einem Klonierungsexperiment verwendet werden.

Aus der zweiten Lipofection mit Thymidin-synchronisierten BFF (pKO-bLG-SV40nls) konnten insgesamt vier G418-resistente Klone gewonnen werden, wovon zwei (L-G5 und L-G11) in der nPCR positiv waren (Abb. 5.22).

Vor der DNA-Isolierung für die geplante Sequenzierung des Amplifikats aus der nPCR wurde der Klon L-G5, der sich durch ein überdurchschnittlich gutes Wachstum auszeichnete, mehrfach passagiert. Die danach durchgeführte nPCR zur Gewinnung der DNA-Probe war überraschenderweise

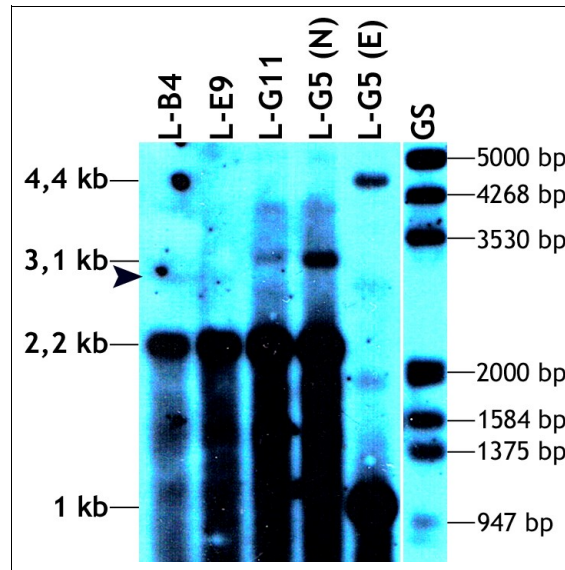
negativ.



**Abb. 5.22: Ergebnis der nPCR mit den G418-resistenten Klonen aus der Lipofektion mit Thymidin-synchronisierten BFF und dem um die SV40nls erweiterten KO-Vektor.** Von den vier Klonen ist nur für L-G11 und L-G5 eine Bande bei 1,2 kb nachweisbar. Positiv-Kontrollen: mit dem Vektor pKO-bLG-poko3' transfizierte MDBK und ein Zelllysat der Population 1 aus Lipofektion 2.

Parallel dazu wurde die DNA der Klone L-G5 und L-G11 nach *Nco* I-Restriktion in einer Southern-Analyse überprüft. Als Kontrolle wurden die beiden PCR-negativen Klone L-B4 und L-E9 nach *Nco* I-Verdau mitgeführt. Der Klon L-G5 wurde zusätzlich nach einem *Eco*R I-Verdau analysiert.

Da bei den beiden PCR-negativen Klonen L-B4 und L-E9 nur wenig DNA für die Analyse zur Verfügung stand, überrascht es nicht, dass die *Nco* I-Bande des Wildtyp-bLG-Allels bei 3,1 kb auch bei längerer Exposition nicht zu sehen ist (Abb. 5.23). Umso auffälliger ist es daher, dass für beide Klone trotzdem ein sehr starkes Signal bei 2,2 kb detektiert wurde. Letzteres entspricht dem vollständig integrierten KO-Vektor. Das identische Signal ist für die Klone L-G11 und L-G5 sichtbar (Abb. 5.23). Nach *Eco*R I-Restriktion ist der vollständig integrierte 3'-Vektorarm für Klon L-G5 als 1 kb-Bande detektierbar (Abb. 5.23, siehe auch Tab. 5.2.1). Außerdem war bei den Klonen L-G11 und L-G5 das Signal des Wildtyp-bLG-Allels bei 3,1 kb (*Nco* I-Restriktion) bzw. 4,4 kb für Klon L-G5 (*Eco*R I-Restriktion) zu sehen. Eine Bande von etwa 2,9 kb, die auf eine homologe Rekombination des bLG-Gens schließen lässt, konnte allerdings auch für diese beiden Klone nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 5.23: Southern-Analyse der Klone aus Lipofection 2.** Nur L-G5 und L-G11 waren in der nPCR positiv, L-B4 und L-E9 wurden als Kontrollen mitgeführt. Die DNA der vier Klone wurde mit *Nco* I verdaut, die von L-G5 zusätzlich mit *EcoR* I. Bei den extrem starken Signalen bei 2,2 bzw. 1 kb (*Nco* I bzw. *EcoR* I) handelt es sich um multiple Kopien des nicht-homolog integrierten KO-Konstrukts mit einem vollständigen 3'-Vektorarm. Ein Fragment mit einer Größe von 2,9 kb nach *Nco* I-Verdau (Pfeil) bzw. 3,5 kb nach *EcoR* I-Restriktion (siehe Größenstandard), die dem homolog rekombinierten bLG entspricht, konnte für keinen der Klone detektiert werden. (N)=*Nco* I; (E)=*EcoR* I; GS=Größenstandard ( $\lambda$  x *Hind* III x *EcoR* I -Dig).

## 5.6 KERN- UND EMBRYOTRANSFER

Für den Kern- und anschließenden Embryotransfer wurden drei Klone (4D2, 1D4 und 2G2) aus der Lipofection 1 mit der BFF-Linie 209, sowie ein Klon (96/26) aus der Nucleofection mit der BFF-Linie 207 ausgesucht, die mit dem Vektor pKO-bLG (*Pvu* I-linearisiert) transfiziert worden waren.

Mit den durch Lipofection generierten Klonen konnten insgesamt 20 Embryonen gewonnen werden, die in acht Empfängertiere eingebracht wurden (Tab. 7.1). In diesem Ansatz wurde ein Rezipient mit drei transferierten Embryonen des Klons 2G2 als trächtig diagnostiziert und zur Analyse des Feten (421) am Tag 37 der Trächtigkeit geschlachtet. Für die Analyse wurden aus dem Fetus 421 Fibroblasten und DNA isoliert.

Der aus der Nucleofection stammende Klon 96/26 wurde ebenfalls als Spender in einen Kerntransfer eingesetzt. Daraus entwickelten sich insgesamt sechs Embryonen zum transfertauglichen Blastocystenstadium, die in drei Empfängertiere übertragen wurden (Tab. 7.1). Ein Tier, bei dem sich beide übertragenen Embryonen zu vitalen Feten entwickelt hatten, wurde am Tag 35 der Trächtigkeit geschlachtet. Aus beiden Feten (639/1 und 639/2) wurden wiederum Fibroblasten und DNA zum

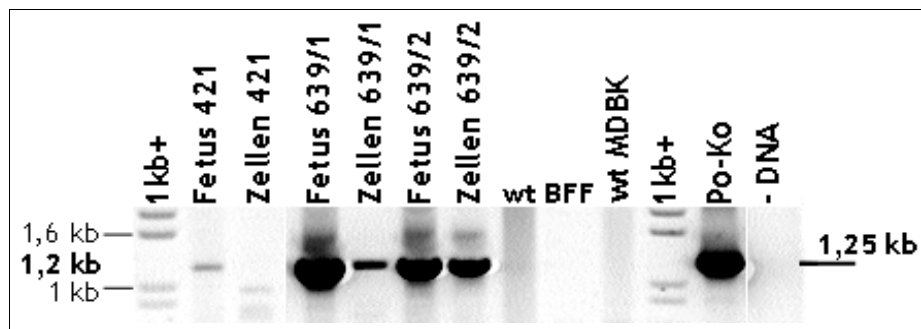
Nachweis einer homologen Rekombination mittels PCR und Southern-Analyse isoliert.

## 5.7 ANALYSE DER FETEN AUS KLONIERUNGSEXPERIMENTEN

Analog zu den Analysen der durch Transfektion generierten G418-resistenten Klone, wurde auch die DNA der drei aus den Klonierungsexperimenten stammenden Feten und ihrer zugehörigen Fibroblasten zunächst in der nPCR und anschließend in der Southern-Analyse untersucht.

### 5.7.1 Ergebnisse der *nested*-PCR

Mit der nPCR konnte für die DNA aller drei Feten ein Amplifikat in der erwarteten Größe von 1,2 kb nachgewiesen werden (Abb. 5.24). Erstaunlicherweise war die DNA aus den Fibroblasten des Fetus 421 bei dieser Analyse negativ, während die Fibroblasten-DNA der Feten 639/1 und 639/2 ebenfalls das 1,2 kb große PCR-Produkt zeigten (Abb. 5.24). Dabei weichen die Signalintensitäten der 639/1-DNA aus fetalem Gewebe und Fibroblasten deutlich voneinander ab, wohingegen die Signale der entsprechenden 639/2-Proben eine annähernd gleiche Intensität aufweisen.



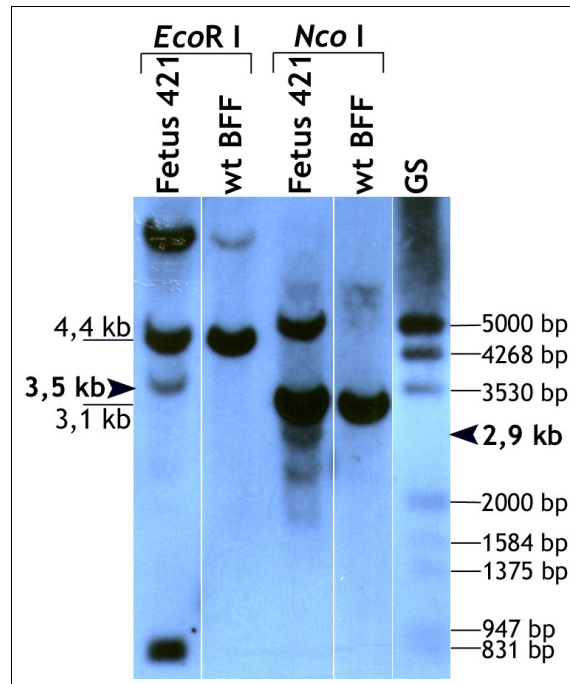
**Abb. 5.24: Ergebnis der nPCR der drei aus Kerntransfer-Experimenten gewonnenen Feten 639/1, 639/2 und 421 und den daraus isolierten Fibroblasten (Fetus/Zellen).** wt BFF/wt MDBK=DNA aus untransfizierten BFF bzw. MDBK-Zellen; Po-Ko=transient mit dem Vektor pKO-bLG-poko3' transfizierte MDBK; - DNA=Kontroll-Ansatz ohne DNA.

Da der Klon 2G2, aus dem der Fetus 421 gewonnen wurde, nicht in einer Southern-Analyse überprüft werden konnte und zudem bekannt war, dass die Feten 639/1 und 639/2 diverse Fehlintegrationen des KO-Vektors aufweisen (siehe Abb. 5.20), wurde zunächst mit dem Material aus Fetus 421 weitergearbeitet.

### 5.7.2 Ergebnisse der Southern-Analysen

In der ersten Analyse wurden 7,5 µg der DNA von Fetus 421 untersucht, die mit den Endonukleasen *Eco*R I und *Nco* I verdaut worden war.

Neben je zwei Fehlintegrationsbanden konnte in beiden Restriktionen jeweils ein Fragment mit der erwarteten Größe für eine homologe Rekombination von 3,5 kb (*Eco*R I) bzw. 2,9 kb (*Nco* I) detektiert werden (Abb. 5.25). Das betreffende Signal ist jedoch in beiden Fällen deutlich schwächer als das der Wildtyp-bLG-Bande bei 4,4 kb (*Eco*R I) bzw. 3,1 kb (*Nco* I). Letzteres spricht dagegen, dass es hier zu der gewünschten Umlagerung des bLG-Gens in allen Zellen gekommen ist.

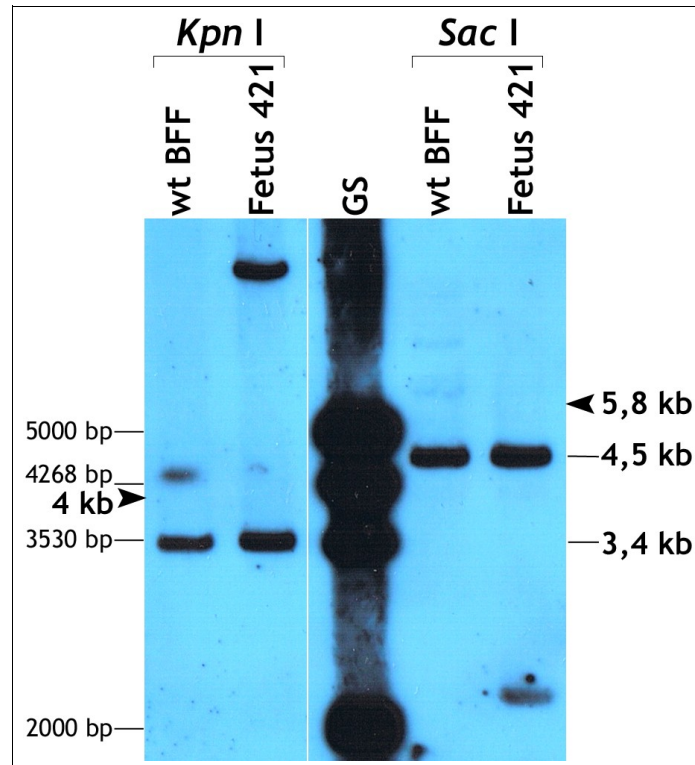


**Abb. 5.25: Southern-Analyse der DNA von Fetus 421 (*EcoR* I- und *Nco* I-Restriktion).** In beiden Restriktionen ist mit 3,5 kb bzw. 2,9 kb ein Fragment sichtbar (Pfeile), das der Größe des homolog rekombinierten bLG-Allels entspricht, dessen Intensität im Vergleich zum wt-bLG-Allel (4,4 kb bzw. 3,1 kb) allerdings deutlich schwächer ist. Daneben sind sowohl nach *EcoR* I- als auch nach *Nco* I-Restriktion der DNA des Fetus 421 zwei Fehlintegrationsbanden zu erkennen. wt BFF=DNA aus untransfizierten BFF; GS=Größenstandard ( $\lambda$  x *Hind* III x *EcoR* I-Dig).

Nachdem inzwischen neue Sequenzinformationen für das bovine Genom zur Verfügung standen, konnten zwei weitere Endonukleasen (*Kpn* I und *Sac* I) für die Analyse der 421-DNA verwendet werden. Dabei konnte auch nach längerer Expositionszeit kein Signal detektiert werden, das einer Größe von knapp 4 kb bzw. 5,8 kb entspricht, die man für das homolog rekombinierte bLG-Allel nach diesen Restriktion erwarten würde (Abb. 5.26).

In Anbetracht der Tatsache, dass auch die aus dem Fetus isolierten Fibroblasten in der nPCR negativ waren, muss der Fetus 421 als negativ für das geplante homologe Rekombinationereignis erachtet werden.

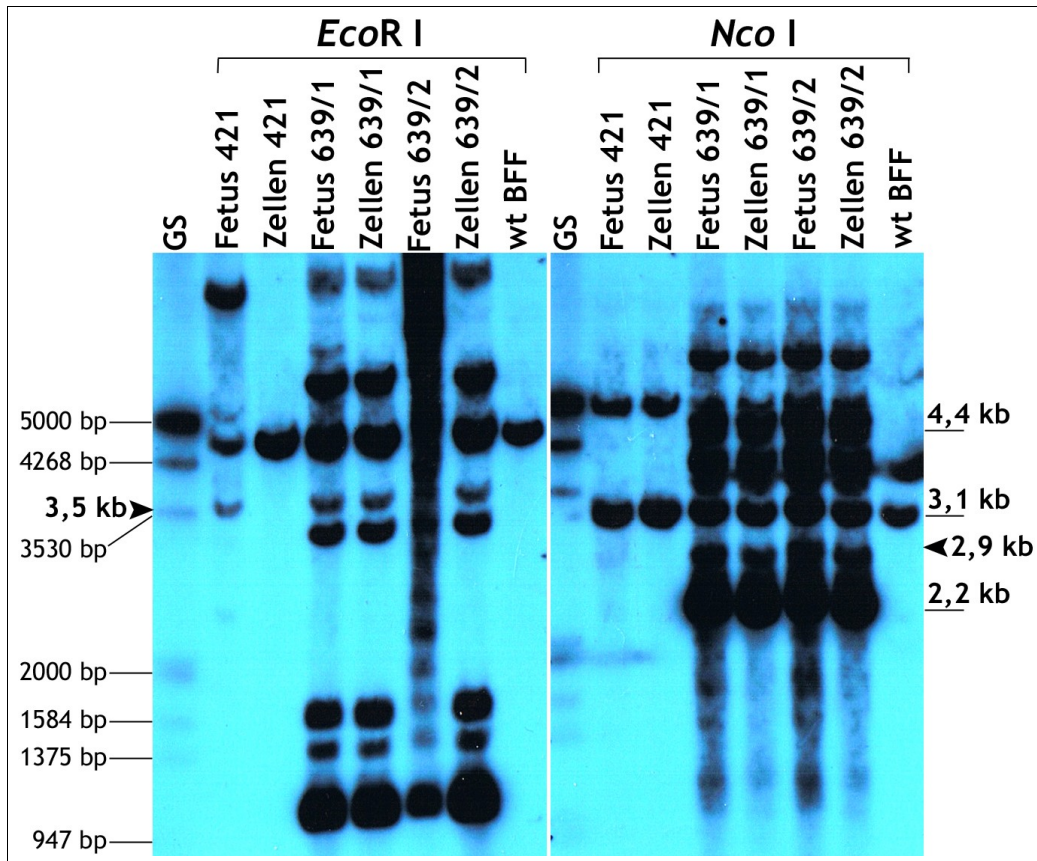




**Abb. 5.26: Southern-Analyse der DNA von Fetus 421 (*Kpn* I- und *Sac* I-Restriktion).** Das erwartete Fragment des homolog rekombinierten bLG-Allels bei knapp 4 kb bzw. 5,8 kb (Pfeile) konnte auch bei längerer Exposition nicht detektiert werden. Neben der Bande des wt-bLG-Allels bei 3,4 kb bzw. 4,5 kb ist jeweils eine Fehlintegrationsbande zu sehen. wt BFF=DNA aus untransfizierten BFF; GS=Größenstandard ( $\lambda$  x *Hind* III x *Eco*R I -Dig).

In einer weiteren Analyse wurden die Feten 639/1 und 639/2 zusammen mit ihren jeweiligen Fibroblasten untersucht. Die DNA-Proben wurden jeweils mit mit *Eco*R I und *Nco* I verdaut und auf ein größeres Agarosegel aufgetragen, um die Laufstrecke der Proben zu verlängern. Der Vollständigkeit halber wurde auch die DNA des Fetus 421 und der dazugehörigen Zellen in die Analyse mit einbezogen.

Das Bandenmuster der Feten 639/1 und 639/2 und ihrer jeweiligen Fibroblasten ist erwartungsgemäß identisch (Abb. 5.27). Die Hybridisierung der *Eco*R I-verdauten DNA aus Fetus 639/2 konnte nicht ausgewertet werden, da die Restriktion der DNA offenbar nicht vollständig war. Die anderen Proben zeigen sowohl nach *Eco*R I-Restriktion die 3,5 kb-Bande als auch nach *Nco* I-Restriktion ein Signal bei 2,9 kb, welche beide auf ein homolog rekombinierte bLG-Allel hinweisen. Neben dem Wildtyp-bLG-Allel (4,4 bzw. 3,1 kb) und dem vollständig integrierten Vektor (1 bzw. 2,2 kb) sind, wie schon bei Klon 96/26 (siehe Abb. 5.20), weitere Integrationen von Vektorfragmenten erkennbar. Das Ergebnis dieser Analyse zusammen mit dem Befund der nPCR (Abb. 5.24) spricht dafür, dass es bei den Feten 639/1 und 639/2 zu der gewünschten Umlagerung des bLG-Gens gekommen ist. Aufgrund der vielen Fehlintegrationen sind beide Feten jedoch bezüglich des weiteren Einsatzes zur Generierung einer Zelle mit einem homozygoten bLG-Knockouts nicht von Interesse.



**Abb. 5.27: Southern-Analyse der Feten 639/1, 639/2 und 421 und den daraus isolierten Fibroblasten (Fetus/Zellen) (*EcoR* I- und *Nco* I-Restriktion).** Alle Feten zeigen sowohl nach *EcoR* I- als auch nach *Nco* I-Restriktion ein Fragment der erwarteten Größe von 3,5 kb bzw. 2,9 kb (Pfeile). Die Bandenmuster der Feten 639/1 und 639/2 sind identisch mit dem ihrer zugehörigen Fibroblasten, die aus dem Fetus 421 isolierten Fibroblasten zeigen das Signal jedoch nicht. wt BFF=DNA aus untransfizierten BFF; GS=Größenstandard ( $\lambda$  x *Hind* III x *EcoR* I -Dig).

Die DNA des Fetus 421 zeigt, wie schon in der ersten Southern-Analyse (Abb. 5.25), ebenfalls je ein Signal bei 3,5 kb bzw. 2,9 kb, wobei letzteres erst bei längerer Expositionszeit des Röntgenfilms deutlich sichtbar wurde (nicht gezeigt). Dagegen konnten diese Banden bei den zugehörigen Zellen nicht detektiert werden. Insgesamt stimmt das Ergebnis dieser Analyse mit dem der nPCR überein.

## 5.7.3 Die inverse PCR

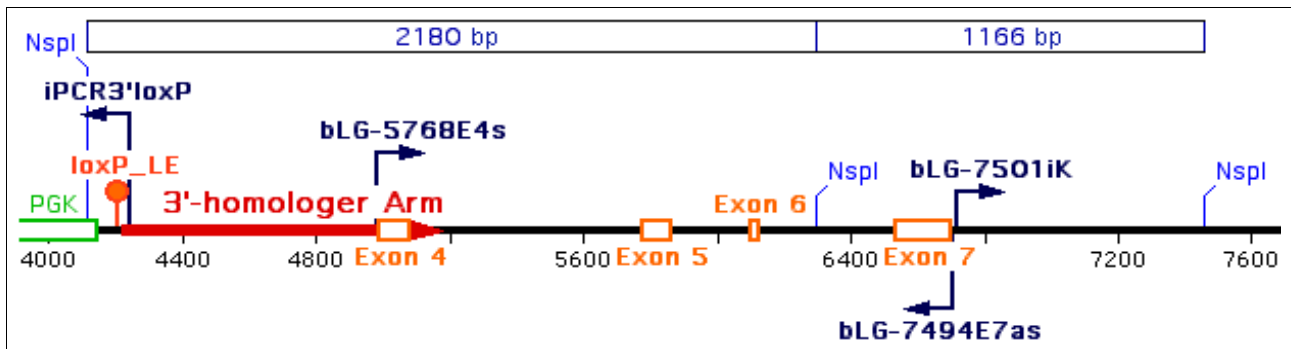
### 5.7.3.1 Prinzip

Die inverse PCR (iPCR) ist eine Abwandlung der Standard-PCR, mit der man gezielt unbekannte DNA-Abschnitte beiderseits einer bekannten Sequenz amplifizieren kann [74]. Die iPCR wurde eingesetzt, um herauszufinden wo der Knockout-Vektor im bovinen Genom integriert war, wenn es nicht zu einem homologen Rekombinationsereignis gekommen ist oder es nicht möglich war, ein solches mit den üblichen Verfahren (nPCR und Southern-Analyse) nachzuweisen.

### 5.7.3.2 Analyse der Feten

Für das Experiment wurde genomische DNA der drei Feten (421, 639/1 und 639/2) und der Fibroblasten des Fetus 421 mit dem Restriktionsenzym *Nsp* I verdaut und die entstandenen Fragmente

mit Hilfe der T4-DNA-Ligase zirkularisiert. Diese zirkulären Produkte wurden anschließend in einer PCR mit auswärts gerichteten Primern (iPCR3'loxP/bLG-5768E4s; Abb. 5.28) amplifiziert. Zu jedem Ansatz wurde parallel eine Kontroll-PCR (Primerpaar bLG-7501iK/-7494E7as; Abb. 5.28) durchgeführt, die sicherstellt, dass sowohl die *NspI*-Restriktion als auch die anschließende Ligation erfolgreich waren.



**Abb. 5.28: Schematische Darstellung eines Ausschnitts des homolog rekombinierten bLG-Genorts.** Im oberen Teil der Abbildung sind die beiden diesen Bereich betreffenden *NspI*-Fragmente dargestellt, wobei das größere nur nach Restriktion des homolog rekombinierten bLG-Gens entsteht, das kleinere auch beim Wildtyp-Gen. Darunter ist das Primerpaar für die inverse PCR (iPCR3'loxP/bLG-5768E4s) und das für die Kontroll-PCR (bLG-7501iK/bLG-7494E7as) eingezeichnet, ebenso die Schnittstellen der Endonuklease *NspI*.

Die Kontroll-PCR mit dem Primerpaar bLG-7501iK/bLG-7494E7as liefert immer, unabhängig von einer Insertion des KO-Vektors, ein Amplifikat von ca. 1160 bp (Abb. 5.28). Dagegen ergibt die inverse PCR mit den Primern iPCR3'loxP und bLG-5768E4s nur dann ein Produkt, wenn es

- zu einem homologen Rekombinationsereignis gekommen ist; in diesem Fall entsteht bei der vorangegangenen *NspI*-Restriktion ein Fragment von 2180 bp (Abb. 5.28), welches in der inversen PCR ein Amplifikat von 1444 bp liefert (2180 bp minus 736 bp, da der Abstand zwischen den verwendeten Primern iPCR3'loxP und bLG-5768E4s 736 bp beträgt)
- zu einer willkürlichen Integration des Vektors an einem anderen Ort des Genoms gekommen ist, unter der Voraussetzung, dass der 3'-Vektorarm in annähernd voller Länge integriert wurde, sodass beide Primerbindungsstellen vorhanden sind; außerdem darf das entstandene *NspI*-Fragment nicht zu groß sein, damit es in einer Standard-PCR amplifiziert werden kann; die Größe des Amplifikats kann in diesem Fall nicht vorhergesagt werden

Die Kontroll-PCR wurde für die Ligationsansätze von Wildtyp-BFF, der drei Feten 639/1, 639/2 und 421, sowie der aus diesem isolierten Fibroblasten durchgeführt. Die Kontroll-PCR war für alle Proben erfolgreich und lieferte ein Amplifikat der erwarteten Größe von ca. 1160 bp (Abb. 5.29).

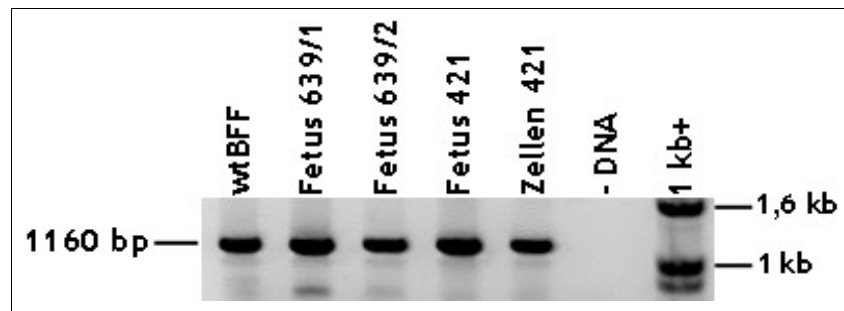


Abb. 5.29: Ergebnis der Kontroll-PCR (Primerpaar bLG-7501iK/bLG-7494E7as) mit der *Nsp*I-verdauten DNA der Feten 639/1, 639/2 und 421 und der aus Fetus 421 isolierten Fibroblasten (Zellen 421). Bis auf den Ansatz, der keine DNA enthält (- DNA), konnte bei allen Proben das erwartete Amplifikat von ca. 1160 bp nachgewiesen werden. Dies entspricht der erwarteten Größe von 1160 bp des Fragments, das nach *Nsp*I-Restriktion von boviner DNA immer entsteht (siehe Abb. X). wtBFF=DNA aus untransfizierten BFF

Wie die Abbildung 5.30 zeigt, ist die inverse PCR für den Fetus 421 und seine Fibroblasten negativ. Eine Erklärung dafür wäre, dass der 3'-Vektorarm am 3'-Ende verkürzt ist und der Primer bLG-5768E4s deshalb nicht mehr binden kann.

Analog zu den Ergebnissen der Southern-Analyse (Abb. 5.27), zeigten die Proben der Feten 639/1 und 639/2 in der inversen PCR diverse Amplifikate unterschiedlicher Länge und Signalstärke, wobei die Bandenmuster identisch waren. In beiden Fällen konnten zwei dominante Signale bei ca. 2,6 kb und etwa 1,4 kb nachgewiesen werden. Das Ergebnis dieser Untersuchung zusammen mit den Befunden der vorherigen Analysen spricht dafür, dass es hier zu einem homologen Rekombinationsereignis gekommen ist.

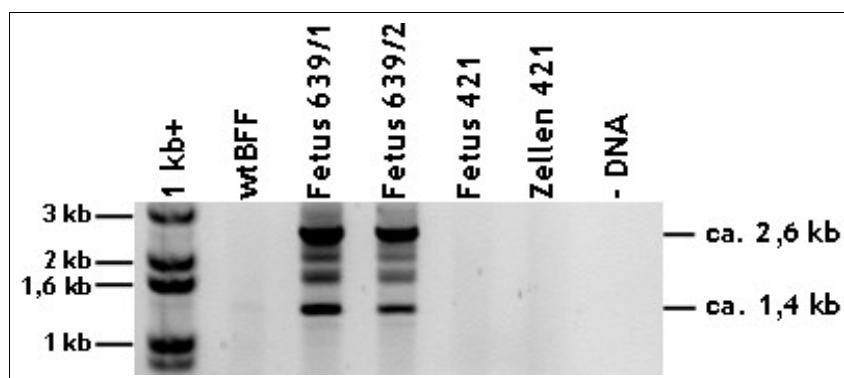
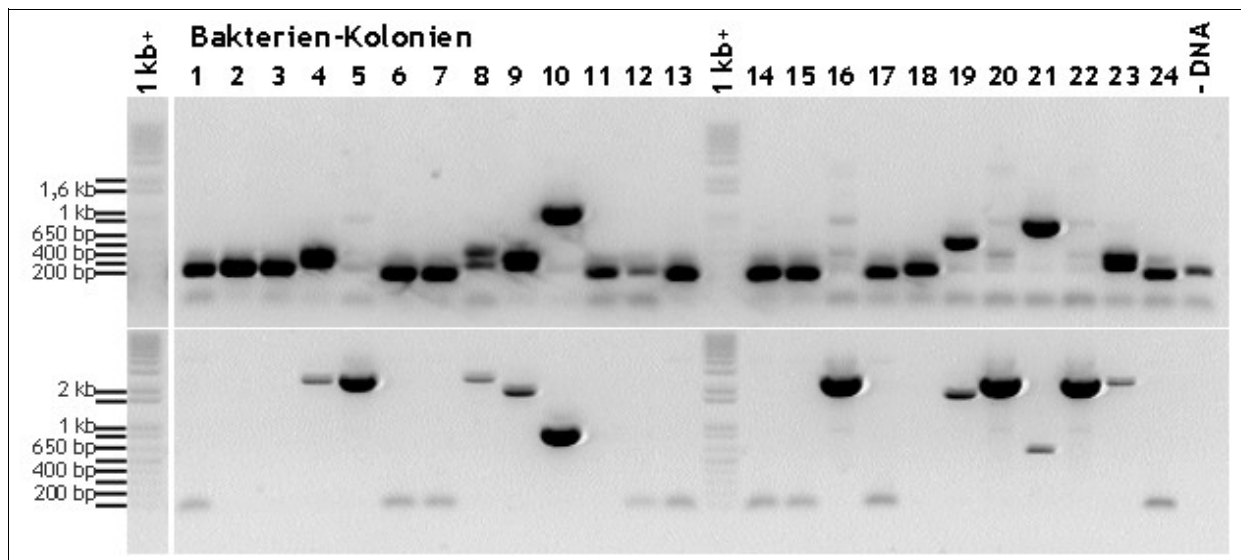


Abb. 5.30: Ergebnis der inversen PCR (Primerpaar iPCR3'loxP/bLG-5768E4s) mit der *Nsp*I-verdauten DNA der Feten 639/1, 639/2 und 421 und der aus Fetus 421 isolierten Fibroblasten (Zellen 421). Bei den Feten 639/1 und 639/2 sieht man jeweils zwei dominante Amplifikate von etwa 1,4 bzw. 2,6 kb. Dagegen lieferte die DNA des Fetus 421 und der daraus isolierten Feten kein Amplifikat. Die Kontrollansätze ohne DNA (- DNA) und mit DNA aus untransfizierten BFF (wtBFF) sind erwartungsgemäß negativ.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem 1,4 kb-Fragment aus der iPCR mit der DNA der Feten 639/1 und 639/2 tatsächlich um das homolog rekombinierte bLG-Gen handelt und gleichzeitig der Frage nachzugehen, auf welche Art und an welchem Ort der Vektor bzw. Teile davon außerdem integriert wurden, sollten verschiedene Fragmente aus der iPCR sequenziert werden. Der erste Schritt zur Sequenzierung dieser Fragmente bestand darin, diese einzeln in einen Klonierungsvektor einzubringen, mit dem anschließend kompetente Bakterien transformiert wurden. Von den gewachsenen Bakterien-Kolonien wurden 23 ausgewählt, expandiert und die isolierte Plasmid-DNA in zwei parallele PCR-Ansätze eingesetzt. Der erste Ansatz mit dem Primerpaar für die inverse PCR iPCR3'loxP/bLG-5768E4s diente dazu, diejenigen Bakterien ausfindig zu machen, in die der Klonierungsvektor mit einer Insertion aus der inversen PCR eingebracht wurde (Abb. 5.31, unterer Teil). Im Kontroll-Ansatz mit den M13-Primern (M13 -20/M13 *reverse*) wird nach erfolgreicher Aufnahme des Klonierungsvektors ohne Insertion ein Amplifikat von 240 bp generiert. Ansonsten verlängert sich das entsprechende Kontroll-Amplifikat um die Größe der Insertion.



**Abb. 5.31: Ergebnis der PCR mit Bakterien-Kolonien nach Transformation mit den Fragmenten aus der inversen PCR mit DNA des Fetus 639/2.** PCR mit dem Primerpaar M13 -20/M13 *reverse* (oberer Teil), das im Klonierungsvektor bindet und dem spezifischen Primerpaar iPCR3'loxP/5768E4s für die inverse PCR (unterer Teil).

Mit den Primern für die inverse PCR konnte für elf der 23 untersuchten Klone ein Amplifikat nachgewiesen werden (Abb. 5.31, unterer Teil). Von diesen elf Klonen zeigten in der Kontroll-PCR mit den M13-Primern nur zwei die erwartete Größendifferenz des Amplifikats von 240 bp (Klone 10 und 21, Abb. 5.31, oberer Teil). Das heisst, nur in diesen beiden Fällen ist im Klonierungsvektor ein Fragment vorhanden, das die Bindungsstellen der beiden spezifischen Primer enthält. Es konnte aber keine homologe Rekombination nachgewiesen werden, da kein Klon ein Amplifikat der erwarteten Größe von 1,4 kb mit den Primern für die inverse PCR bzw. 1,7 kb mit den M13-Primern aufweist.

Um mögliche Besonderheiten bei der willkürlichen Integration des KO-Vektors im bovinen Genom aufdecken zu können (z.B. Einbau von untereinander verknüpften Vektormolekülen, Degradation des Vektors), wurden die Klone 10 und 21 einer Sequenzanalyse unterzogen. Stellvertretend für die verschiedenen Bandenmuster, die in Abbildung 5.31 erkennbar sind, wurden die Klone 4, 5, 9 und 19

in die Analyse mit einbezogen.

Die Sequenzierung ausgehend von Primer M13 uni-21 ergab, dass Klon 10 genomische DNA aus dem bovinen Chromosom 14 enthält. Die Basenabfolge beginnt mit einem kurzen Stück des Klonierungsvektors (pCRII-TOPO), darauf folgt der spezifische Primer iPCR3'loxP. Es schließt sich die Sequenz des KO-Vektors an, die einen Teil des PGK-Promotors bis zur *Nsp*I-Schnittstelle bei Position 5295 beinhaltet (Abb. 5.32 und 5.35). Danach folgt bovine genomische Sequenz aus dem Chromosom 14, die bis in den Primer bLG-5768E4s hineinreicht. Die Sequenz endet im Klonierungsvektor pCRII-TOPO (Sequenz 5.3 und Abb. 5.32).

### Sequenzanalyse des Klons 10 mit dem Primer M13 uni-21

```

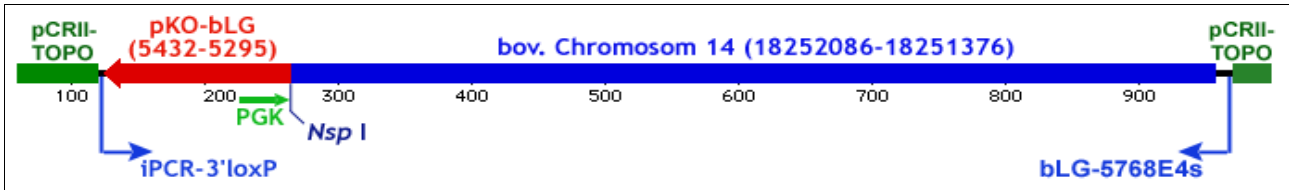

pCRII TOPO


1   GGCCCTCTAG ATGCATGCTC GAGCGGCCGC CAGTGTGATG GATATCTGCA GAATTCGCCC
      iPCR3'loxP                                loxP_LE
61  TTTCGTCTT CATACCGTTC GTATAGCATA CATTATACGA AGTTATATCG ATAAGGGCGA
121 ATTCTCTAGG ATCGATTCTA GGGATCCCGG CGCGCCCTAC CGGGTAGGGG AGGCGCTTTT
      PGK-Promotor
181 CCCAAGGCAG TCTGGAGCAT GCATTGAGGT GGATTTTGTC CAGTTATGAA ACCAGAAGGT
241 ATCATTCTGC AATCAGCACT TCCAGGAGAA CAGAGACAGA CTTTGTAGGT AGCTTGGAGT
301 CATTAAAAAG TTATCATTAG TCAATAAAGG AGACTGTCCT CATCTCTTCG TAGGCGGGAA
361 GATCAGGTGG GAGAGGATGG TGATTCACCC TCCCTCACAC CAAAACCAGG CTCCCTGTCA
421 GATGGGACGC AGCCCCGAC TTCCCAGAG CCATTGACCA AGACTTTCAG GTGGGTTTGA
481 TGGGCTTACT CAGCCCCGCC TCTCCTAGAG GCTCATGGGA CTTACTGTAA AGGGTGCAGC
541 TCAGGAAGGG AGTGCCCCGT CATCCCTGGG GAATTTAAGA GTGAGGCATC AAGCCAGAAT
601 CCACGGTACC CTTACCCAC CTTCCACAGA GCTTCTTTCC CTGAGTGTCT CATAGTTTCA
661 AAATGTAGGT CCCAGAAGGC TGGCCATACG AAGGGCCTT ATCACCTCAC CTGCTTGTTT
721 CAGAACATAA GTCCTGAGGA GTTGAGTGAT CTGCCAAGA TGACAGAGCT AATGCCTATC
781 AGACTGGAGA GAGGAGAAAC AGAGAAAGAG CAGCTGGGGC CAACCAGGAA GCAGAAACAT
841 AACTTCCTCT TGGCCTCTTG AGAGAAATTA CTCATCCTTG TTATCCTTTT TCCAGCAACC
      bov. Chromosom 14 (Pos.18252086-18251376)
901 TTCTTCCCCA GGGCTGTCTG TCATGGGACT TTGTTCTCAT TCAAGGAAGG GCGAATTCCA
961 GCACACTGGC GGCCGTTACT AGTGGA
      pCRII TOPO
TTCGTCTTCATACCGTTCG                                Primer iPCR3'loxP
GGACTTTGTTCTCATTCAAGG                                Primer bLG-5768E4s
GCATGC                                                    Nsp I

```

**Sequenz 5.3: Ergebnis der Sequenzierung von Klon 10** (ausgehend von Primer M13 uni-21). Die Insertionssequenz ist von kurzen Anschnitten des Klonierungsvektors pCRII-TOPO (dunkelgrün) eingefasst. Daran schließt sich der KO-Vektor mit dem loxP\_LE-Element (orange) und einem Teil des PGK-Promotors (grün) bis zur *Nsp*I-Schnittstelle (hellblau) bei Pos. 5297 an. Das letzte Stück der Insertion stammt aus dem bovinen Chromosom 14 und endet mit dem spezifischen Primer bLG-5768E4s.

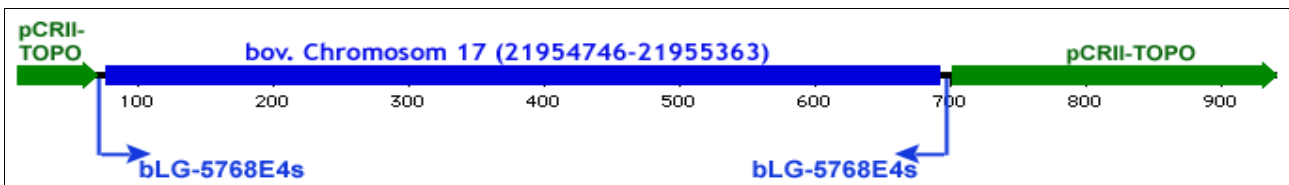
Die Tatsache, dass der Primer bLG-5768E4s nur zu über 50 % homolog zu dem betreffenden Bereich in Chromosom 14 ist, spricht dagegen, dass es sich um den Integrationsort des KO-Vektors handelt. Man muss vielmehr davon ausgehen, dass es sich um ein Artefakt handeln, welches durch die unspezifische Bindung des Primers an die Sequenz in Chromosom 14 entstanden ist. Die Verknüpfung des vektoriiellen Anteils und des Fragments aus dem Chromosom 14 über die *Nsp*I-Schnittstelle kann



**Abb. 5.32: Schematische Darstellung des Ergebnisses der Sequenzierung von Klon 10 (ausgehend von Primer M13 uni-21).** In Rot dargestellt ist der Bereich des Vektors pKO-bLG mit Angabe der Position (bezogen auf den Pvu I-linearisierten Vektor), darin enthalten ist ein Teil des PGK-Promotors (hellgrün). In Blau dargestellt ist die genomische Sequenz von Chromosom 14, sowie die Primer für die inverse PCR und die *Nsp* I-Schnittstelle (dunkelblau). Die Anteile des Klonierungsvektors (pCRII-TOPO) sind in dunkelgrün eingezeichnet.

während der Ligation im Anschluss an die *Nsp* I-Restriktion erfolgt sein.

Das Ergebnis der Sequenzanalyse von Klon 21 ist ähnlich zu interpretieren. In diesem Fall wurde ein Teil des bovinen Chromosoms 17 in den Klonierungsvektor inseriert, es sind jedoch keine Anteile des KO-Vektors enthalten (Abb. 5.33). Offensichtlich hat sich der Primer bLG-5768E4s unspezifisch an zwei Bereichen des Chromosoms 17 so angelagert, dass der dazwischen liegende chromosomale Abschnitt amplifiziert werden konnte. Diese Ergebnisse lassen den Primer bLG-5768E4s als ungeeignet für weitere Analysen erscheinen, da er anscheinend eine häufig auftretende Sequenzabfolge enthält.



**Abb. 5.33: Schematische Darstellung des Ergebnisses der Sequenzierung von Klon 21 (ausgehend von Primer M13 uni-21).** In Blau dargestellt ist die genomische Sequenz von Chromosom 17, sowie der Primer bLG-5768E4s. Die flankierenden Anteile des Klonierungsvektors (pCRII-TOPO) sind in dunkelgrün eingezeichnet.

Die Klone 4, 5, 9 und 19 unterscheiden sich von den soeben beschriebenen Klonen 10 und 21 dadurch, dass außer DNA-Abschnitten aus dem Bereich der Vektorarme keine genomische bovine Sequenz nachweisbar war.

Ausgehend von Primer bLG-5768E4s ergab der Vergleich der Sequenzen der Klone 4 und 5, dass das spezifische Amplifikat von 2,6 kb der in Abbildung 5.31 gezeigten PCR-Analyse (unterer Teil) identisch ist. Die Kontroll-PCR mit den M13-Primern zeigt jedoch, dass dieses Fragment nicht in den Klonierungsvektor inseriert wurde. Die Erklärung für das fehlende Amplifikat des Klons 5 bzw. das „zu kleine“ Amplifikat des Klons 4 ist, dass bei der Transformation ein DNA-Fragment in die Bakterien eingebracht wurde, welches ein komplettes Ampicillin-Resistenzgen enthält. Dieses ist vermutlich bereits während der Transfektion der bovinen Fibroblasten durch die Verknüpfung zweier Moleküle des KO-Vektors über die *Pvu* I-Linearisierungsstelle entstanden (Concatemer-Bildung; Sequenz 5.4 und Abb. 5.34). Dieses nicht in den Klonierungsvektor inserierte Fragment vermittelt den transformierten Bakterien eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum unabhängig von der Aufnahme

des Klonierungsvektors. Dieses Phänomen wird als *vector rescuing* bezeichnet. Im Gegensatz zu Klon 5 hat Klon 4 einen Klonierungsvektor mit Insertion aufgenommen, die jedoch nicht dem spezifischen Amplifikat aus der in Abbildung 5.31 (unterer Teil) gezeigten PCR entspricht.

### Sequenzanalyse des Klons 5 ausgehend von Primer bLG-5768E4s

**Exon 4**

```

1      CTCTTCTGCA TGGAGAACAG TGCTGAGCCC GAGCAAAGCC TGGTCTGCCA GTGCCTGGGT
61     GGGTGCCAAC CCTGGCTGCC CAGGGAGACC AGCTGTGTGG TCCTCGCTGC AACGGGGCCG

                                3'-Vektorarm

121    GGGGGGACGG TGGGAGCAGG GAGCTTGAAT TCCTAGACCG CGGCTAGACC CGGGGGGGTC
181    GACGCGGCCG CCATGGTCAT AGCTGTTTGA CGTCAGGTGG CACTTTTCGG GGAAATGTGC
241    GCGGAACCCC TATTTGTTTA TTTTCTAAA TACATTCAA TATGTATCCG CTCACGAGAC
301    AATAACCCCTG ATAAATGCTT CAATAATATT GAAAAAGGAA GAGTATGAGT ATTCAACATT
361    TCCGTGTCGC CTTATTCCC TTTTTTGC GG CATTTTGCCT TCCTGTTTTT GCTCACCTAG

                                Ampicillin-Resistenzgen (6646-6994)

421    AAACGCTGGT GAAAGTAAAA GATGCTGAAG ATCAGTTGGG TGCACGAGTG GGTTACATCG
481    AACTGGATCT CAACAGCGGT AAGATCCTTG AGAGTTTTTCG CCCCGAAGAA CGTTTTCCAA
541    TGATGAGCAC TTTTAAAGTT CTGCTATGTG GCGCGGTACT ATCCCGTATT GACGCCGGGC
601    AAGAGCAACT CGGTCGCCGC ATACACTATT CTCAGAATGA CTTGGTTGAG TACTCACCAG
661    TCACAGAAAA GCATCTTACG GATGGCATGA CAGTAAGAGA ATTATGCAGT GCTGCCATAA
721    CCATGAGTGA TAACACTGCG GCCAACTTAC TTCTGACAAC GATCGGAGGA CCGAAGGAGC
781    TAACCGCTTT TTTGCACAAC ATGGGGGATC ATGTAACTCG CCTTGATCGT TGGGAACCGG
841    AGCTGAATGA AGCCATACCA AACGACGAGC GTGACACCAC GATGCCTGTA GCAATGGCAA
901    CAACGTTGCG CAAACTATTA ACTGGCGAAC TACTTACTCC AGCTTCC

                                Ampicillin-Resistenzgen (1-184)

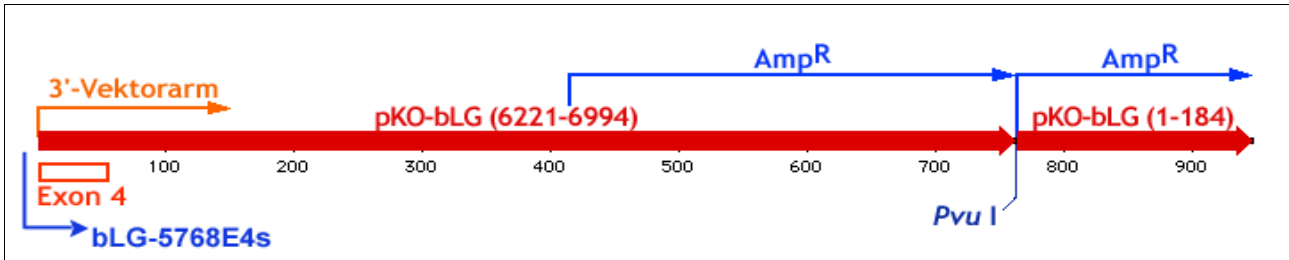
CGATCG                                Pvu I
GAGCAGGGAGCTTGAATTC                Primer bLG-5972as (EcoR I)

```

**Sequenz 5.4: Ergebnis der Sequenzierung von Klon 5** (ausgehend von Primer bLG-5768E4s). In der Sequenz ist das 3'-Ende des 3'-Vektorarms (rot) inklusive Exon 4 (orange) enthalten, welches mit dem Primer 5972as abschließt (grau hinterlegt, inkl. *EcoR* I-Schnittstelle). Darauf folgt ein vektorieller Bereich (schwarz), der in das *amp<sup>R</sup>*-Gen übergeht (blau), bis das Ende des KO-Vektors mit dem Überhang der *Pvu* I-Schnittstelle (grün) erreicht ist. Mit dieser Schnittstelle beginnt ein zweites Molekül des KO-Vektors, sodass das *amp<sup>R</sup>*-Gen vervollständigt wird.

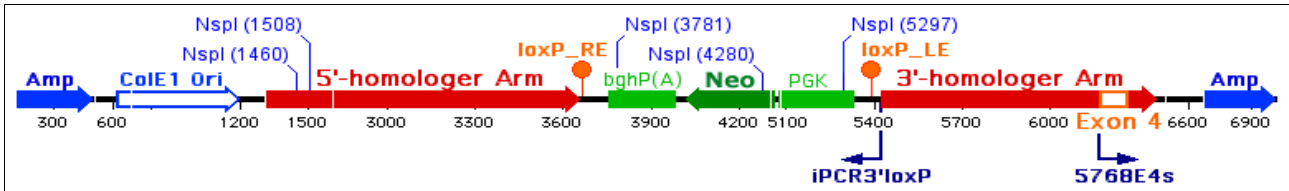
Auch die Auswertung der Sequenzanalyse des Klons 5 ausgehend von Primer iPCR3'loxP gab keinen Hinweis auf den Integrationsort des Vektors im bovinen Genom. Es wurden auch in diesem Fall lediglich Bereiche aus dem KO-Vektor (Replikationsursprung, 5'-Vektorarm, PGK-Promotor) sequenziert.





**Abb. 5.34: Schematische Darstellung des Ergebnisses der Sequenzierung von Klon 5 (ausgehend von Primer bLG-5768E4s).** In Rot dargestellt sind die Bereiche des Vektors pKO-bLG mit Angabe der Position (bezogen auf den *Pvu* I-linearisierten Vektor), darin enthaltenen ist der 3'-homologe Arm (orange). In Blau dargestellt sind das Ampicillin-Resistenzgen (*AmpR*), sowie der spezifische Primer bLG-5768E4s und die *Pvu* I-Schnittstelle (dunkelblau).

Die Sequenzanalyse der Klone 9 und 19 ausgehend von Primer bLG-5768E4s war nahezu identisch mit der des Klons 5. Das heisst, es kam vermutlich auch hier im Verlauf der Transfektion der bovinen Fibroblasten zu einer Verknüpfung zweier Moleküle des KO-Vektors. Allerdings erfolgte diese Verknüpfung nicht über die *Pvu* I-Schnittstelle, da sowohl das Ende des ersten als auch der Anfang des zweiten Vektormoleküls verkürzt waren. So reicht bei Klon 9 die Sequenz des ersten Vektors von Position 6221 bis 6665 und ist somit um über 300 bp verkürzt (Gesamtlänge des Vektors 6994 bp), während beim zweiten Vektor die ersten 167 bp fehlen. Die gleiche Art der Verbindung zweier verkürzter Moleküle des KO-Vektor zeigt auch die Sequenz von Klon 19.



**Abb. 5.35: Schematische Darstellung des Vektors pKO-bLG.** Eingezeichnet ist die Lokalisation der *Nsp* I-Schnittstellen und der für die inverse PCR verwendeten Primer. Die Größenverhältnisse entsprechen nicht dem Original, die einzelnen Elemente sind zum Teil verkürzt dargestellt, die Skala ist daher nicht linear.

Insgesamt konnte mit der inversen PCR für die 23 untersuchten bakteriellen Klone weder eine homologe Rekombination noch ein Integrationsort des KO-Vektors im bovinen Genom nachgewiesen werden.

## 6 DISKUSSION

Einen definierten Genort durch homologe Rekombination in einer somatischen Zelle eines Nutztiers mit einem entsprechenden DNA-Konstrukt gezielt zu verändern und in der Folge aus dieser Zelle ein Tier zu klonieren ist nach wie vor ein aufwändiges Verfahren mit eher geringer Aussicht auf Erfolg. Dennoch ist es in den letzten Jahren mehrfach gelungen, solche gezielten Veränderungen in unterschiedlichen Genloci von Rind, Schaf und Schwein einzuführen. Schnieke und Cibelli haben dieses Klonierungsverfahren in den Jahren 1997 bzw. 1998 zum ersten Mal erfolgreich bei Nutztieren eingesetzt und dabei transgene Lämmer bzw. Kälber aus transfizierten fetalen Fibroblasten generiert [92] [17]. Nachdem sich der Einsatz von fetalen Fibroblasten zu Klonierungszwecken bewährt hatte, wurde in der Folge verstärkt versucht, gezielte genetische Veränderungen in diese Zellen einzubringen. Ein entscheidender Parameter für den Erfolg des Experiments ist die Konstruktion des KO-Vektors, die vorgibt, welche Anreicherungsstrategie verfolgt werden kann. Letztere hängt wiederum mit dem transkriptionellen Status des zu manipulierenden Gens zusammen. Weitere wichtige Aspekte sind die Transfektionsmethode (Elektroporation versus Lipofektion), die Kulturbedingungen der transfizierten Zellen, sowie ein geeignetes Nachweisverfahren zur Identifizierung eines homologen Rekombinationsereignisses.

### 6.1 KONSTRUKTION DES KNOCKOUT-VEKTORS

In Anlehnung an die oben angesprochenen Parameter haben wir uns zunächst intensiv mit der Frage beschäftigt, ob es möglich und sinnvoll ist, eine Anreicherungsstrategie anzuwenden. Von großer Bedeutung ist darüberhinaus die Auswahl von geeigneten DNA-Abschnitten, die als homologe Vektorarme dienen sollen. Nicht zuletzt spielt auch die Wahl einer passenden Linearisierungsstelle eine nicht unerhebliche Rolle.

#### 6.1.1 Anreicherungsstrategien

Da homologe Rekombinationsereignisse in mitotischen Säugerzellen selten sind, wurden Vektoren zur Transfektion dieser Zellen entwickelt, die gleichzeitig die Möglichkeit zur Anreicherung von homolog rekombinierten Klonen bieten. In einem ersten Schritt werden dabei die Zellen selektioniert, die das KO-Konstrukt aufgenommen haben („positive“ Selektion z.B. über G418). Den zweiten Schritt bezeichnet man als „negative“ Selektion. Das bedeutet, dass die Klone eliminiert werden, die aufgrund einer nicht-homologer Integration des KO-Vektors über eine G418-Resistenz verfügen. Abhängig von der genetischen Organisation und vom Transkriptionsstatus des zu verändernden Genorts gibt es für die Umsetzung dieser beiden Selektionsschritte verschiedene Vektormodelle, die auf zwei unterschiedlichen Strategien basieren. Dabei können positive und negative Selektion entweder in einem Schritt durch Einsatz ein und desselben Selektionsmarkers erreicht werden oder es wird für die negative Selektion ein zweiter Selektionsmarker eingesetzt (z.B. Thymidin-Kinase). Das Ausmaß der Anreicherung lässt sich über den „Anreicherungsfaktor“ (A) quantifizieren. Dieser wird bei einer Anreicherung mit Hilfe zweier getrennter Selektionsschritte berechnet als das Verhältnis zwischen der Anzahl an Klonen, die nur mit der positiven Selektion erhalten wurden (Anzahl aller, also homologer und nicht-homologer, Integrationen) und der Anzahl an Klonen, die im Anschluss an positive und negative Selektion übrig bleiben (Anzahl der homologen Integrationen plus aller anderen Ereignisse,

die zum Verlust des negativen Selektionsmarkers geführt haben):

$$A = \frac{\text{Anzahl Klone nach positiver Selektion}}{\text{Anzahl Klone nach positiver und negativer Selektion}}$$

Für den Fall, dass positive und negative Selektion in einem Schritt erfolgen, kann der Anreicherungsfaktor nur experimentell bestimmt werden.

Die meisten erfolgreichen Knockout-Experimente bedienten sich bisher der sogenannten *promoterless*-Strategie. Diese Strategie basiert darauf, dass der positive Selektionsmarker nicht mit einem eigenen Promotor ausgestattet ist und somit nur exprimiert werden kann, wenn er im Leserahmen in die endogene codierende Sequenz integriert wurde und durch den endogenen Promotor aktiviert wird (Abb. 6.1). Eine ausreichende Expression des Resistenzgens und somit ein Überleben der Zellen in Selektionsmedium ist also nur im Fall einer homologen Rekombination gewährleistet. Hanson und Sedivy beschreiben, dass nicht-homologe Integrationsereignisse, die zufällig in unmittelbarer Nähe eines beliebigen chromosomalen Promotors erfolgen und somit eine ungewollte Expression des Selektionsmarkers bewirken, anscheinend eher ungewöhnlich sind [42]. Die *promoterless*-Strategie verspricht den höchsten Anreicherungsfaktor und somit die größte Effektivität in Bezug auf ein homologes Rekombinationsereignis. In der Literatur schwanken die Angaben zum Anreicherungsfaktor beträchtlich; es finden sich Werte zwischen 15,7 und 5 000-10 000 [42] [64]. Sedivy und Sharp geben auf der Grundlage ihrer Experimente einen durchschnittlichen Anreicherungsfaktor von 100 für diese Strategie an [95]. Die stark differierenden Werte lassen sich möglicherweise auf die Abhängigkeit des Anreicherungs-faktors vom gewählten Genlocus zurückführen.

Für die Anwendung der *promoterless*-Strategie müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen muss der endogene Promotor aktiv sein, um zu gewährleisten, dass der Selektionsmarker exprimiert werden kann. Dabei scheint schon ein geringes Ausmaß an Promotor-Aktivität (d.h. Expression des zu verändernden Gens) für den Erfolg der Strategie auszureichen [52]. Zum anderen müssen Promotorsequenz und Transkriptions-Startpunkt einen ausreichenden Abstand voneinander haben, da der dazwischen liegende Bereich die maximale Länge des homologen Vektorarms festlegt. Der Vektorarm, der sich im KO-Konstrukt direkt vor dem Selektionsmarker befindet, darf bei der *promoterless*-Strategie natürlich keine Sequenz aus dem endogenen Promotorbereich enthalten. Beim bLG-Gen befindet sich das ATG-Startcodon am Anfang von Exon 1, sodass das Ende des Promotorbereichs nur durch etwa 200 bp vom Transkriptionsstart getrennt ist. Dagegen sollte die Länge des Vektorarms in einem Bereich von mindestens 1 kb liegen. Da das bLG-Gen zudem nicht in fetalen Fibroblasten sondern nur in bestimmten Drüsenzellen des Euters während der Lactation exprimiert wird, war keine der beiden Voraussetzungen für die Anwendung der *promoterless*-Strategie erfüllt.

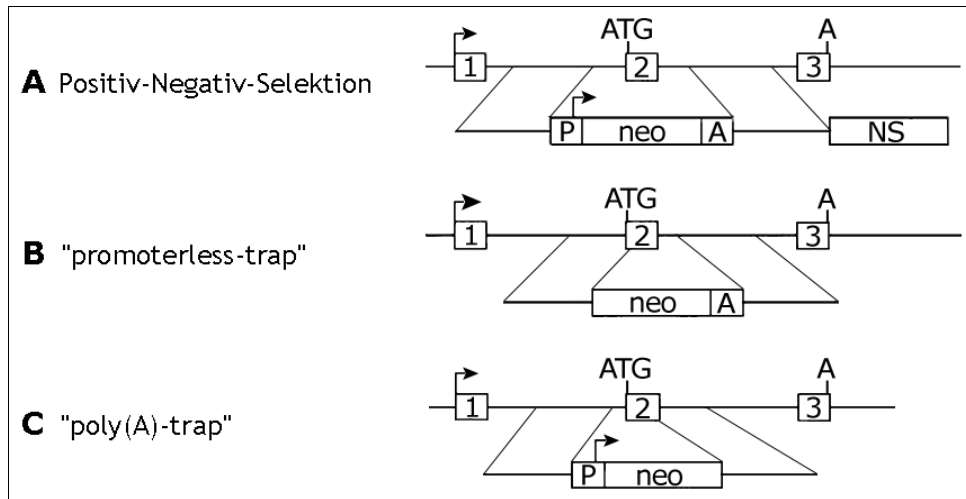
Das PNS-Vektormodell (Positiv-Negativ-Selektion) erreicht eine Anreicherung von homolog rekombinierten Klonen durch den Einsatz eines zweiten Selektionsmarkers, der außerhalb der zu integrierenden Abschnitte des Vektors liegt. Im Falle einer homologen Rekombination wird der DNA-Bereich, der die negative Selektionskassette enthält (z.B. HSV-Thymidinkinase, *gpt*-Gen oder das Gen für Diphtherie-Toxin), nicht mit in das Genom des Wirts integriert. Bei nicht-homologer Integration des Vektors an beliebiger Stelle wird zusätzlich zur positiven auch die negative Selektionskassette

inkorporiert. Das betreffende Gen wird exprimiert und kann - nach Zugabe eines zweiten Selektionsagens wie z.B. Ganciclovir - seine zytotoxische Wirkung entfalten. Diese Strategie lässt sich unabhängig vom transkriptionellen Status und der Organisation des betreffenden Gens anwenden. Das Ausmaß der Anreicherung von korrekt rekombinierten Klonen ist allerdings relativ gering, wobei der maximale Anreicherungsfaktor bei 8 - 10 liegt und üblicherweise einen Wert von 2 - 3 nicht überschreitet [42]. Die Autoren erklären die geringe Anreicherung durch eine nukleolytische Schädigung des negativen Selektionsmarkers während der Elektroporation. Der Ausfall des negativen Markers führt dazu, dass Klone mit nicht-homologer Integration des Vektors nicht mehr eliminiert werden. Dies gilt nicht für ES-Zellen, bei denen diese Strategie sehr erfolgreich angewendet wird. Ein weiterer Nachteil dieser Strategie ist die Notwendigkeit von zwei unabhängigen Selektionsschritten, denen die transfizierten Zellen ausgesetzt werden müssen. So wurde u.a. von Prof. M. Müller gezeigt, dass ein zweiter Selektionsschritt transfizierte fetale Fibroblasten in einen Zustand der Teilungsinaktivität treiben kann (M. Müller, persönliche Mitteilung). Die Proliferation dieser Fibroblasten ist jedoch essentiell, damit die erforderlichen Analysen durchgeführt werden können und bei einem entsprechenden Ergebnis genügend Material für ein Kerntransfer-Experiment zur Verfügung steht.

Harrison et al. haben im Schwein die Veränderung des *GGTA1*-Locus mit diesen beiden gängigsten Strategien durchgeführt [43]. Mit dem PNS-Vektormodell konnten sie aus 1400 resistenten, getesteten Klonen einen detektieren, der die gewünschte Veränderung aufwies. Dagegen ergab das Experiment mit der *promoterless*-Strategie mit neun von 395 PCR-positiven Klonen eine wesentlich höhere Ausbeute.

Die *poly(A)-trap*-Strategie beruht wie die *promoterless*-Strategie im wesentlichen darauf, dass ein für die Expression des Selektionsmarkers essentielles Element nicht im Vektor enthalten ist. Dabei handelt es sich um die Polyadenylierungs-Sequenz im Anschluss an den positiven Selektionsmarker. Für eine erfolgreiche Expression muss die Poly(A)-Sequenz des Zielgens genutzt werden, was praktisch nur möglich ist, wenn es zu einer homologen Rekombination zwischen genomischer und Vektor-DNA gekommen ist (Abb. 6.1). Der transkriptionelle Status des Zielgens muss bei dieser Strategie nicht berücksichtigt werden, allerdings kann auch nur mit einem moderaten Anreicherungsfaktor gerechnet werden [18]. In der Literatur finden sich nur wenige Hinweise auf erfolgreich durchgeführte Versuche mit dieser Strategie.

In der vorliegenden Arbeit wurde für den Knockout des bLG-Gens auf eine Anreicherungsstrategie verzichtet, da die *promoterless*-Strategie von vornherein auszuschließen war und auch die PNS-Strategie wenig erfolgversprechend erschien. Der endgültige bLG-KO-Vektor war daher nur mit dem positiven Selektionsmarker (Neomycin-Phosphotransferase) ausgestattet, flankiert von einem Promotor- und einem Polyadenylierungs-Element.



**Abb. 6.1: Schematische Darstellung verschiedener Knockout-Konstrukte, mit denen Anreicherungs-Strategien umgesetzt werden können.** Als positiver Selektionsmarker ist hier immer das Neomycin-Resistenzgen (neo) angegeben. Mit den Ziffern 1-3 sind die Exons 1-3 bezeichnet, der Pfeil gibt den Transkriptionsstartpunkt an. A =Poly(A)-Signal; ATG =Translationsstartpunkt; NS =negativer Selektionsmarker; P =Promotor

### 6.1.2 Einfluss von Fehlpaarungen

Um nach Möglichkeit eine 100%ige Homologie der Vektorarme zur genomischen DNA-Sequenz der verwendeten fetalen Fibroblasten zu gewährleisten, wurde versucht, die Amplifikationen derjenigen Bereiche, die im KO-Konstrukt als homologe Vektorarme dienen, mit einer Taq-Polymerase durchzuführen, die über eine Korrekturfunktion verfügt (*proof reading*). Damit war sichergestellt, dass die bei der Amplifikation mit einer Standard-Taq-Polymerase üblicherweise auftretenden Basenfehlpaarungen von vornherein ausgeschlossen waren. Diese Überlegung basierte auf den Ergebnissen verschiedener Arbeiten, die gezeigt haben, dass es bei der Transgenese von Maus-ES-Zellen vorteilhaft zu sein scheint, isogene DNA für die Amplifikation der homologen Vektorarme zu verwenden, da sich hierdurch die Häufigkeit der gezielten Veränderung steigern lässt [106] [27]. Zu Beginn der Arbeit war es nicht möglich, die homologen Vektorarme mit der *proof reading*-Taq-Polymerase in ausreichender Menge zu amplifizieren, sodass für alle weiteren Amplifikationen eine Polymerase ohne Korrekturfunktion verwendet wurde. Dieses Vorgehen war insofern gerechtfertigt, als Sedivy und Dutriaux etwas später gezeigt haben, dass bei der Manipulation von (humanen) somatischen Zellen nicht notwendigerweise isogene DNA verwendet werden muss [94]. In Anbetracht der Tatsache, dass für die Amplifikation der homologen Vektorarme isogene DNA als Matrize eingesetzt wurde, sollten die wenigen durch die Standard-Taq-Polymerase eingeführten Fehlpaarungen die Wahrscheinlichkeit eines homologen Rekombinationsereignisses nicht wesentlich beeinflussen. Beobachtungen von Prof. M. Müller haben diese Annahme unterstützt (M. Müller, persönliche Mitteilung).

### 6.1.3 Linearisierung des KO-Vektors

Jegliche durch Transfektion in eine Zelle eingebrachte DNA ist vor dem Eintritt in den Zellkern in der Regel einem nukleolytischen Abbau ausgesetzt. Linearisierte DNA ist dabei aufgrund ihrer freien

Enden ein noch leichteres Ziel für den Abbau durch Enzyme, da hier auch Exonucleasen angreifen können. Das Ausmaß des Abbaus durch Nukleasen wird durch die Verweildauer der DNA im Zytoplasma bestimmt. Die von der Firma *Amaza* entwickelte Methode der Nucleofection verspricht jedoch einen „beschleunigten“ Transport der exogenen DNA in den Zellkern, der den enzymatischen Angriff auf ein Minimum reduzieren kann. Es gibt in der Literatur allerdings auch Hinweise auf nukleolytische Schädigung von linearisierter DNA, die nicht durch Nukleasen in der Zelle, sondern durch das Verfahren der Elektroporation selbst hervorgerufen wird [42].

Bei der ersten Nucleofection (*Amaza*-Verfahren) wurde das KO-Konstrukt direkt im Anschluss an den 3'-homologen Bereich mit *SalI* linearisiert. Die PCR zum Nachweis eines homologen Rekombinationsereignisses war für alle G418-resistenten Zellen negativ. Eine zweite PCR, in der der komplette 3'-homologe Vektorarm nachgewiesen werden sollte, war ebenfalls negativ. Das impliziert, dass mindestens eine der beiden Primer-Bindestellen nicht mehr vorhanden ist, da der 3'-homologe Vektorarm durch Abbau oder Schädigung verkürzt ist. Vermutlich ist der Bindebereich des Primers betroffen, der in unmittelbarer Nähe der Linearisierungsstelle und weiter entfernt von der Selektionskassette liegt. Der KO-Vektor wurde deshalb im Folgenden über eine *Pvu* I-Schnittstelle im Ampicillin-Resistenzgen linearisiert. So wurde verhindert, dass der 3'-homologe Vektorarm mit seiner geringen Ausgangslänge von etwa 1 kb, der zusammen mit dem zweiten Vektorarm die homologe Rekombination vermittelt, durch einen Abbau der freien Vektorenden verkürzt wird. Diese Beobachtung unterstützt die von Hanson und Sedivy beschriebenen Ergebnisse, nach denen ein linearisiertes Vektormolekül während der Elektroporation einer nukleolytischen Schädigung unterliegt [42].

Auch Sequenzanalysen verschiedener PCR-Produkte (inverse PCR mit der DNA des Fetus 639/2) belegen den nukleolytischen Abbau des KO-Vektors, durch den die freien Enden um bis zu 400 bp verkürzt sind, und bestätigen die Ergebnisse von Hanson und Sedivy [42].

Des Weiteren kann man davon ausgehen, dass die freien Enden linearisierter DNA im Kern einer intakten Zelle miteinander verbunden werden, unabhängig davon, ob sie über zueinander passende Enden oder Überhänge verfügen. Um eine Ligation der transfizierten DNA (für stabile Transfektionen üblicherweise immer linearisiert) zu vermeiden, wurde von Shah-Mahoney et al. bei *targeting*-Experimenten mit *Dichtyostelium discoideum* eine Modifikation durch Anhängen von Didesoxynucleotiden (ddNTP) an die 3'-Enden linearer DNA eingeführt [98]. Bei diesem Vorgehen wird zum einen verhindert, dass einzelne transfizierte DNA-Moleküle über ihre freien Enden ligiert werden (Concatemer-Bildung) und es so zur Integration multipler Kopien des Konstrukts an einem Ort kommt. Zum anderen schützt dieses Vorgehen den negativen Selektionsmarker (am Ende des Konstrukts) vor einem nukleolytischen Abbau und hat so einen positiven Effekt auf die Effizienz der Positiv-Negativ-Selektion. Allerdings werden nicht-homologe Integrationen des Vektors in das Genom des Wirts durch die von Shah-Mahoney et al. eingeführte Modifikation nicht verhindert, zudem wurde sie noch nicht umfassend in *targeting*-Experimenten getestet.

Eigene Erfahrungen mit dem Problem der freien Vektorenden lassen es als sinnvoll erscheinen, dieses Vorgehen insbesondere in Kombination mit der PNS-Strategie zu verfolgen.

## 6.2 TRANSFEKTIONEN

### 6.2.1 Lipofection versus Nucleofection

Die Art, mit der die exogene Vektor-DNA in die Zelle eingebracht werden soll, ist ein weiterer bedeutender Aspekt bei Experimenten, die eine gezielte Veränderung eines definierten genetischen Locus zum Ziel haben. Die Mikroinjektion von DNA in eine Zelle stellt hohe Anforderungen an die Ausrüstung des Labors und an die Erfahrung des Experimentators. Deshalb haben sich in den letzten Jahren Methoden zum Einbringen großer Mengen an exogener DNA in eine größere Anzahl von Zellen (*mass delivery*) durchgesetzt, wobei am häufigsten die Methode der Elektroporation gewählt wird [109]. Von Merrihew et al. wurden im Rahmen einer Studie die verschiedenen *mass delivery*-Methoden im Hinblick auf das sogenannte *targeting*-Verhältnis am *APRT*-Locus in CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) miteinander verglichen. Dabei entspricht das *targeting*-Verhältnis der Anzahl von gezielt veränderten Klonen zu solchen, die eine nicht-homologe Integration des Konstrukts tragen. Für die Elektroporation ergab sich bei dieser Untersuchung das beste *targeting*-Verhältnis, während es für die liposomalen Transfektionsreagenzien (FuGENE-6 und LipofectAMINE) um mehr als einen Faktor 100 geringer war [68]. Die Autoren dieser Studie haben weiterhin gezeigt, dass die Häufigkeit einer gezielten Veränderung (homologe Rekombination) bei allen gängigen *mass delivery*-Methoden kaum variiert. Dagegen unterscheiden sich die Methoden deutlich in der Transfektionseffizienz, d.h. die Häufigkeit an nicht-homologen Integrationen des Vektors ist bei der Elektroporation auffällig gering, bei der Verwendung von LipofectAMINE hingegen besonders hoch. Daraus resultiert das stark differierende *targeting*-Verhältnis. Auch in anderen Studien konnte die Tendenz bestätigt werden, nach der die Elektroporation die für ein *targeting*-Experiment überlegene Methode ist [109] [119].

Danach wäre die Elektroporation die am wenigsten geeignete Methode, wenn es um die Herstellung von stabilen Transfektanten mit einer hohen Expressionsrate des eingebrachten Transgens durch multiple nicht-homologe Integrationen ginge, während sie sich bei der homologen Rekombination (im Idealfall Einbringen eines einzigen Vektormoleküls pro Zelle), als Methode der Wahl anbieten würde. Ein Nachteil der Elektroporation ist jedoch die hohe Mortalität der behandelten Zellen, die mit den hohen DNA-Konzentrationen zusammenhängen könnte, die üblicherweise bei dieser Methode eingesetzt werden. Hohe DNA-Konzentrationen können sowohl direkt toxisch für Zellen sein, als auch indirekt über vermehrte homologe und nicht-homologe Integrationen des Vektors in ein und derselben Zelle den Erfolg des Experiments negativ beeinflussen [18].

Vor diesem Hintergrund wird die Elektroporation für *targeting*-Experimente üblicherweise favorisiert [28] [58] [57]. Parallel dazu haben zwei Arbeitsgruppen auch erfolgreich liposomale Transfektionsreagenzien (LipofectAMINE bzw. FuGENE-6) eingesetzt. So konnten McCreath et al. primäre fetale Fibroblasten des Schafs durch homologe Rekombination nach Transfektion mit LipofectAMINE gezielt verändern. Durch den anschließenden Kerntransfer gelang es erstmals lebensfähige Lämmer zu erzeugen, in deren  $\alpha 1$ -Procollagen-Locus (*COL1A1*) das humane  $\alpha 1$ -Antitrypsin-Gen inseriert war [66]. Zwei Jahre später führten Harrison et al. einen Knockout in fetalen Fibroblasten des Schweins durch. Die Veränderung des  $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferasegens (*GGTA1*) erfolgte dabei durch homologe Rekombination im Anschluss an die Transfektion mit FuGENE-6. Diese Arbeitsgruppe war jedoch nicht in der Lage, aus den veränderten Zellen durch Kerntransfer

lebensfähige Tiere zu generieren [43].

Ein Aspekt der vorliegenden Arbeit war es, durch den Einsatz beider Methoden (Elektroporation und Lipofection) eine mögliche methodische Überlegenheit einer der beiden Methoden im Hinblick auf die Häufigkeit von homologen Rekombinationsereignissen zu untersuchen. Dabei wurde als Sonderform der Elektroporation die von der Firma *Amaxa* entwickelte Variante, die sogenannte Nucleofection, eingesetzt, die einen beschleunigten Transport der Vektor-DNA in den Zellkern verspricht.

In den Experimenten zum *Knockout* des bovinen bLG-Gens zeigte sich entgegen den oben beschriebenen Ausführungen, dass bei den Lipofectionen mit rund 5 % ein im Vergleich zu den Nucleofectionen mit etwa 1,5 % deutlich höherer Anteil an PCR-positiven Klonen generiert werden konnte. Die Überlegenheit der Lipofection konnte durch die Ergebnisse von Dr. S. Müller bestätigt werden. Die weitere Untersuchung der PCR-positiven Klone durch die Southern-Analyse deckte dann auf, dass es in den meisten Fällen zu mehreren nicht-homologen Integrationen des KO-Vektors gekommen war. Entgegen den von Vasquez publizierten Ausführungen konnte zudem gezeigt werden, dass nicht-homologe Integrationen bei beiden Transfektionsmethoden in vergleichbarer Größenordnung auftraten [109]. So waren gerade bei dem mittels Nucleofection generierten Klon 96/26 mehrere Integrationen zusätzlich zum vermutlichen homologen Rekombinationsereignis nachweisbar. Dasselbe gilt auch für die daraus hervorgegangenen Feten 639/1 und 639/2. Verantwortlich für diese unerwünschten Integrationen war vermutlich die hohe DNA-Konzentration, die zu Beginn der Experimente - entsprechend den Angaben des Herstellers - bei dem Verfahren eingesetzt wurde.

Zum damaligen Zeitpunkt stand seitens der Firma *Amaxa* kein optimiertes Transfektions-Protokoll für primäre bovine Fibroblasten zur Verfügung. Für die Elektroporationen wurden daher zwei Programme für humane dermale Fibroblasten ausgewählt, wobei das eine für neonatale (U-20) und das andere für adulte Zellen (U-23) optimiert war. Parallel durchgeführte Experimente mit bovinen fetalen Fibroblasten der Linie 209 ergaben eine deutlich höhere Überlebensrate der Zellen bei Verwendung von Programm U-20 im Gegensatz zu Programm U-23. Dieser auf den ersten Blick vorteilhafte Effekt wurde jedoch durch eine erhöhte nukleolytische Schädigung des Vektors aufgehoben. Diese Schlussfolgerung bezieht sich auf die Southern-Analyse von Klonen, die in einem Experiment generiert wurden, in dem beide Programme parallel zum Einsatz kamen. So hatten zwar alle Klone aufgrund ihrer G418-Resistenz erwiesenermaßen die Neomycin-Kassette integriert, aber die Integration des kurzen homologen Vektorarms konnte nur bei den Klonen, die mit dem Programm U-23 generiert worden waren, nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spricht eindeutig dafür, dass es zu einer massiven Schädigung (z.B. Verkürzung, Fragmentierung) des Vektors gekommen ist. Diese Tatsache zusammen mit der Beobachtung, dass die *nested*-PCR für den Ansatz mit dem Programm U-20 (optimiert für neonatale Zellen) einen geringeren Anteil an positiven Klonen aufwies, veranlasste uns dazu, alle weiteren Nucleofectionen von BFF der Linie 209 mit dem Programm U-23 durchzuführen.

Als für unsere Zwecke ungeeignet erwies sich auch das Programm P-22, das ebenfalls für humane adulte dermale Fibroblasten optimiert ist und eine hohe Überlebensrate der Zellen gewährleisten soll. So zeigte der von Dr. Müller mit diesem Programm generierte Klon (96/26), ebenso wie die beiden daraus stammenden Feten (639/1 und 639/2), multiple nicht-homologe Integrationen des KO-Vektors.



## 6.2.2 Versuchsbedingungen

Ein kritischer Erfolgsfaktor im Rahmen eines *targeting*-Experiments ist die verlässliche Identifizierung und Isolierung eines homolog rekombinierten Klons sowie die anschließende Gewinnung einer ausreichenden Menge vitaler Zellen für den Kerntransfer.

Der für die Selektion der transfizierten Fibroblasten auf dem *Knockout*-Vektor kodierte Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase führt bei Intergration der Selektionskassette in das Wirtsgenom zur Resistenz gegen das im Selektionsmedium enthaltene Antibiotikum Neomycin bzw. dessen Analogon Geneticin (G418). Ohne den betreffenden Selektionsmarker gehen die Zellen in Gegenwart von G418 nach 1-2 Teilungen zugrunde, wobei die benötigte letale Dosis für jeden Zelltyp experimentell ermittelt werden muss. Für die verwendeten bovinen fetalen Fibroblasten der Linie 209 wurde in Vorversuchen eine letale Dosis für untransfizierte Zellen von 1,2 mg/ml G418 ermittelt.

Bei den meisten *Knockin*-Experimenten (z.B. Produktion von rekombinanten Proteinen in Säugerzellen, Untersuchung spezifischer Moleküle durch Expression in defizienten Zellen) wird angestrebt, möglichst viele Kopien des betreffenden Transgens in das Wirts-Genom einzubringen. Nur so ist es z.B. möglich, ausreichende Mengen eines bestimmten Proteins durch Kultivierung der exprimierenden Zellen zu produzieren. Bei einem *Knockout*-Experiment wie dem hier beschriebenen, bei dem ein definierter Genlocus durch homologe Rekombination mit einem spezifischen Vektor gezielt verändert werden soll, stellt sich die Situation genau gegenteilig dar. Hier soll im günstigsten Fall nur ein einziges Molekül des Vektors in die Zelle eingebracht werden, welches sich dann mit seinen homologen Bereichen an die Wirts-DNA anlagert und mit dieser homolog rekombiniert. Der Selektionsmarker wird also in vergleichsweise geringen Mengen exprimiert. Hinzu kommt, dass das zu verändernde bLG-Gen in den verwendeten bovinen fetalen Fibroblasten transkriptionell inaktiv ist. Bei der Ermittlung der Letaldosis an G418 muss auch berücksichtigt werden, dass die Kultivierung von Zellen unter hohen G418-Konzentrationen einen negativen Effekt auf die Effizienz eines Kerntransfers haben kann [18]. Für die hier verwendeten bovinen fetalen Fibroblasten der Linie 209 konnte in Vorversuchen jedoch gezeigt werden, dass nach Transfektion und Kultivierung unter Selektion mit 1,2 mg/ml G418 vitale Feten kloniert werden können. Das steht im Einklang damit, dass in der Regel kleinste Mengen des Enzyms ausreichen, um relativ große Mengen an G418 durch Phosphorylierung zu inaktivieren.

Der Beginn der Selektion wurde in den meisten Fällen mit dem Zeitpunkt der Vereinzelung der manipulierten Zellen zusammengelegt. Üblicherweise geschah dies am zweiten Tag nach der Transfektion, um zu gewährleisten, dass die Zellen sich vom Stress der Manipulation erholt hatten und wieder in die Proliferationsphase eingetreten waren.

Vereinzelung bedeutet in diesem Zusammenhang die Aussaat der transfizierten Zellen in einer definierten Dichte, um sicherzustellen, dass statistisch nur ein Klon pro Kavität heranwächst. In Anlehnung an die Experimente von Dr. R. Klose, in deren Arbeitsgruppe ebenfalls *Knockout*-Experimente mit bovinen Fibroblasten durchgeführt wurden, wurden die Fibroblasten im Anschluss an die Transfektionen mit einer Zelldichte von  $2-3 \times 10^3$  pro Vertiefung ausplattiert. Auch Denning et al. haben bei der Deletion des *GGTA1*- und des *PrP*-Gens in Schaf-Fibroblasten mit einer entsprechenden Zelldichte gearbeitet [28]. Dagegen geben Lai et al. bei ihren Experimenten mit Schweine-Fibroblasten eine Zellzahl an, die um etwa den Faktor 10 über der von uns eingesetzten Zelldichte liegt [58]. Erstaunlicherweise haben Dai et al. - ebenfalls in Versuchen mit Schweine-Fibroblasten - mit einer

Zelldichte gearbeitet, die etwa den Faktor 10 unter dem von uns gewählten Wert liegt [24]. Die drastischen Unterschiede der verwendeten Zellzahlen können bedingt sein durch eine Spezies-Abhängigkeit und die gewählte Anreicherungsstrategie [64], daneben aber auch durch die große biologische Schwankungsbreite, wie sie sicherlich bei primären Zellen im Gegensatz zu vielen permanenten Zelllinien gegeben ist.

Die hier anfänglich verwendete Zelldichte ( $2-3 \times 10^3$  pro Vertiefung) erwies sich insofern als geeignet, als in jeder zweiten bis dritten Kavität klonales Wachstum beobachtet werden konnte. Eine Analyse mit der *nested*-PCR ergab jedoch Hinweise darauf, dass in einigen Kavitäten Mischklone gewachsen waren. Unter dem Begriff Mischklon versteht man dabei das Heranwachsen von Zellen, die unterschiedliche Integrationen des Vektors tragen. Diese Situation hat sich in der *nested*-PCR so dargestellt, dass zunächst ein starkes Signal sichtbar war, das nach weiterer Expansion schwächer wurde und schließlich nicht mehr nachweisbar war. Offensichtlich lagen zunächst gleichzeitig Zellen mit homologer und nicht-hologer Integration des Vektors vor, wobei die Zellen mit der gewünschten Umlagerung des bLG-Gens von letzteren überwachsen wurden. Durch lichtmikroskopische Betrachtungen der heranwachsenden Transfektanten konnte der Verdacht, dass teilweise mehr als ein Klon pro Kavität expandiert wurde, in einigen Fällen bestätigt werden. Auch im Labor von Dr. S. Müller wurden entsprechende Beobachtungen gemacht. Dies veranlasste die Arbeitsgruppe um Dr. Müller, weitere Transfektionsexperimente durchzuführen und dabei die Zelldichte pro Kavität um rund eine Zehnerpotenz (100-300) zu verringern. Unter diesen veränderten Versuchsbedingungen konnten bei vergleichbarer Ausbeute an G418-resistenten Klonen auch jetzt noch Mischklone nachgewiesen werden. Diese Mischklone zeigten in der Southern-Analyse eine zusätzliche Integrationsbande, deren Intensität sehr viel schwächer war als die des Wildtyp-bLG-Allels. Man würde erwarten, dass bei Monoklonalität das Signal halb so intensiv sein sollte wie das des Wildtyp-Allels, da mit der verwendeten Sonde zwei Kopien des bLG-Gens, aber nur eine Kopie eines nicht-homolog integrierten Vektors nachgewiesen wird. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass zur Minimierung des Auftretens unerwünschter Mischklone eine weitere Verringerung der Zellzahl sinnvoll ist.

Bei der beschriebenen Southern-Analyse war zudem auffällig, dass mehrere Klone hinsichtlich ihrer Größe und Intensität ein identisches Bandenmuster aufwiesen. Dies könnte dafür sprechen, dass einzelne der transfizierten Zellen bereits im Zeitraum vor der Vereinzelnung einige Zellzyklen durchlaufen haben und danach in mehrere Kavitäten ausplattiert wurden.

Die Problematik der „Mischklone“ wurde auch von anderen Arbeitsgruppen dokumentiert. Bei transfizierten Schaf-Fibroblasten konnten Denning et al. das Auftreten von Mischklonen sowohl bei der hohen Zelldichte von 7800 Zellen/cm<sup>2</sup> als auch nach der Verringerung der Zellzahl um etwa eine Zehnerpotenz beobachten [28] [29]. Marques et al. mussten - ebenfalls bei Verwendung von Schaf-Fibroblasten - die Zelldichte von 2500 auf 500 Zellen/cm<sup>2</sup> reduzieren, um überwiegend Einzelklone isolieren zu können [64]. Dies entspricht etwa 100 Zellen pro Kavität einer Mikrotiterplatte und liegt damit im Bereich der Zelldichte, die im letzten Experiment mit bovinen fetalen Fibroblasten der Linie 209 gewählt wurde.

### 6.3 KNOCKOUT-ANSATZ NACH MIR UND PIEDRAHITA

Eine Zelle kann mit linearisierten doppelsträngigen DNA-Stücken auf zweierlei Weisen verfahren: Das

DNA-Stück kann entweder über einen Prozess in das Genom integriert werden, der als nicht-homologe Verknüpfung von DNA-Enden (*non-homologous end joining*, NHEJ) bezeichnet wird, oder aber die exogene DNA kann durch homologe Rekombination mit der genomischen DNA inseriert werden. Beide Prozesse spielen bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, die während des Zellzyklus entstehen, eine große Rolle. Takata et al. konnten zeigen, dass homologe Rekombination hauptsächlich in der späten S/G2-Phase, NHEJ hingegen vorwiegend in der G1-Phase des Zellzyklus stattfindet [105]. Eines der größten Hindernisse bei der gezielten Veränderung eines Gens besteht darin, dass exogene DNA, die in eine Zelle eingebracht wird, sehr häufig über NHEJ integriert wird. Deshalb wurden verschiedene Ansätze und Verfahren entwickelt, um die Integration von z.B. Vektor-DNA durch homologe Rekombination zu fördern. Lundin et al. haben am *hprt*-Locus in *Chinese Hamster*-Zellen untersucht, welcher der beiden Prozesse nach Unterbindung der DNA-Replikation die größere Bedeutung für die Wiederherstellung der DNA-Synthese hat [62]. Dabei haben die Autoren festgestellt, dass nach Behandlung der Zellen mit Hydroxyurea homologe und nicht-homologe Rekombination in gleichem Ausmaß induziert wird, während die Behandlung mit Thymidin nur homologe Rekombination hervorruft [62].

Mir und Piedrahita haben dann im Jahr 2004 ein Verfahren beschrieben, das die Verfügbarkeit der exogenen DNA im Zellkern gewährleistet und gleichzeitig die oben beschriebenen Beobachtungen mit einbezieht. Dazu wird das KO-Konstrukt mit einem Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) versehen und die Zellen durch Behandlung mit Thymidin in der S-Phase arretiert. Durch das Kernlokalisierungssignal soll sichergestellt werden, dass die exogene DNA in den Zellkern transportiert wird und so in der S-Phase der Thymidin-behandelten Zellen verfügbar ist. Ohne ein Kernlokalisierungssignal können eingebrachte Vektorkonstrukte die Kernmembran nicht passieren, solange diese intakt ist. Die exogene Vektor-DNA kann erst dann in das Genom integriert werden, wenn die Kernhülle im Zuge der Mitose aufgelöst wird. Folglich ist die exogene DNA während der S-Phase, in der es nach den Arbeiten von Takata et al. häufiger zu homologer Rekombination kommt, praktisch nicht im Zellkern vorhanden [105]. Bei einer „klassischen“ Transfektion, bei der die exogene DNA erst während der Mitose den Kern erreicht, führt dieser Umstand zwangsläufig zu einer größeren Anzahl an nicht-homologen Integrationen des Vektors. Dagegen soll der Einsatz von S-Phase synchronisierten Zellen zusammen mit einem Vektor, der über ein Kernlokalisierungssignal verfügt, zu einer drastischen Reduktion von nicht-homologen Integrationen und einem gleichzeitigen Anstieg der gezielten Veränderungen führen [69].

Obwohl in der vorliegenden Arbeit nach dem von Mir und Piedrahita entwickelten Verfahren nur zwei Nucleofectionen und eine Lipofection durchgeführt wurden, konnte doch der positive Effekt dieses Ansatzes eindeutig bestätigt werden, unter anderem durch den Nachweis einer um den Faktor 2,7 geringeren Anzahl an G418-resistenten Klonen. Im Vergleich zu den zuvor durchgeführten „klassischen“ Transfektions-Experimenten war hier auch der Anteil an PCR-positiven Klonen signifikant höher. Das Ergebnis der Southern-Analyse hat aber letztlich ausgeschlossen, dass es bei einem der Klone zu einer homologen Rekombination des bLG-Gens gekommen ist. Als Erklärung bietet sich am ehesten eine homologe Rekombination an, die nur am kurzen Vektorarm stattgefunden hat.

Auch die Ergebnisse der beiden von Dr. Müller in dieser Art durchgeführten Lipofectionen bestätigen

die Ergebnisse von Mir und Piedrahita im Hinblick auf die Effektivität ihres Verfahrens.

Eine Reduktion der G418-resistenten Klone um einen Faktor 54, wie ihn Mir und Piedrahita beschreiben, konnte allerdings weder in unseren noch in den Versuchen von Dr. Müller erreicht werden [69].

## 6.4 NACHWEISSYSTEME

Da es in Anbetracht der äußerst geringen Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination entscheidend ist, ein solches Ereignis zuverlässig detektieren zu können, wurde die *nested*-PCR in der vorliegenden Arbeit als sensitives, spezifisches und verlässliches Nachweissystem ausgewählt. Die *nested*-PCR ist eine Variante der Standard-PCR mit zwei hintereinander geschalteten Amplifikationen, was zu einer Steigerung sowohl der Sensitivität als auch der Spezifität gegenüber dem Standard-Verfahren führt.

Unter Verwendung von DNA der Positiv-Kontrolle (mit dem Vektor pKO-bLG-poko3' transfizierte bovine Nierenzellen) waren positive Signale ohne störenden Hintergrund klar und eindeutig detektierbar. Rein rechnerisch konnte unter  $10^4$  untransfizierten Zellen eine positive nachgewiesen werden. Nach Etablierung der Methode zeigte sich auch im Experiment, dass es ohne Problem möglich ist, einen positiven Klon innerhalb einer Population von transfizierten Zellen zu detektieren.

Mit Hilfe der Southern-Analyse wurden die aufgrund des *nested*-PCR-Ergebnisses ausgewählten Klone weiter analysiert. Im Gegensatz zur *nested*-PCR können mit diesem Nachweissystem alle Arten von Integrationen aufgedeckt werden. Dabei lässt die Größe der detektierten Bande Rückschlüsse darauf zu, ob es zu einer homologen Rekombination des bLG-Gens gekommen ist oder der Vektor bzw. ein Fragment davon an einem beliebigen Ort in das Genom integriert wurden. Die Intensität des Signals lässt auch eine Aussage bezüglich der Anzahl an Integrationen zu. Dabei dient die Intensität der Bande des Wildtyp-bLG-Gens als interner Referenzwert. Für den Fall, dass das bLG-Gen erfolgreich umgelagert wurde, würde man hierfür eine mit dem Wildtyp-Allel vergleichbare Signalintensität erwarten. Ein im Verhältnis zum Wildtyp-Allel deutlich stärkeres Signal würde dafür sprechen, dass es zur Integration multipler Kopien des Konstrukts gekommen ist. Eine deutlich geringere Signalintensität (bezogen auf das Wildtyp-Allel) deutet dagegen auf einen Mischklon hin, d.h. die Probe würde die DNA von Zellen mit unterschiedlichen Integrationen des Konstrukts enthalten. Das Auftreten von Mischklonen konnte im Rahmen der Southern-Analysen der *nested*-PCR-positiven Klone des Öfteren beobachtet werden, auch dann noch, als die Zellzahl für die Generierung von Einzelklonen nach der Manipulation um etwa eine Zehnerpotenz reduziert wurde. Auch multiple Integrationen des Konstrukts wurden häufig detektiert. Die Größe einer solchen Bande, deren Intensität die des Wildtyp-Allels bei weitem übersteigt, entsprach meist der Länge des vollständigen 3'-Vektorarms, was vermuten lässt, dass mehrere Kopien des KO-Vektors in voller Länge in das Genom integriert wurden.

Die Feten 639/1 und 639/2 zeigten diverse Fehlintegrationsbanden, die intensivste davon mit einer Größe, die dem vollständigen 3'-Vektorarm entspricht. Die anderen Banden waren alle größer, was bedeutet, dass der 3'-Vektorarm verkürzt in das Genom integriert wurde, wodurch eine der den Arm flankierenden *Eco*R I-Schnittstellen verloren gegangen ist. Die Bande, deren Größe dem umgelagerten bLG-Gen entspricht, wies dagegen eine ähnliche Intensität wie die des Wildtyp-Allels auf, was für eine homologe Rekombination spricht. Fetus 421 zeigte nur zwei Fehlintegrationsbanden. Die Bande der Größe, die dem homolog rekombinierten bLG-Gen zugeordnet wird, hatte in diesem Fall eine

geringere Intensität als die Wildtyp-bLG-Bande. Da es sich hierbei nicht um einen Zellklon sondern um genomische DNA eines Feten handelt, kann kein Mischklon vorliegen. Weitere Analysen haben ergeben, dass es bei dem Fetus 421 anscheinend nicht zu einer homologen Rekombination des bLG-Gens gekommen ist. Es konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, wie Signale der richtigen Größe für eine homologe Rekombination sowohl in der *nested*-PCR als auch in der Southern-Analyse zustande gekommen sind.

## 6.5 DIE FETEN

In der vorliegenden Arbeit wurden aus zwei Klonen drei Feten generiert. Die Auswahl dieser Klone beruhte zunächst auf dem positiven Ergebnis der *nested*-PCR.

Der Klon 96/26, der zu den Zwilling-Feten 639/1 und 639/2 führte, war zudem auch in der Southern-Analyse positiv. Mit dieser Analyse konnte ein Fragment der Größe detektiert werden, die dem umgelagerten bLG-Gen entspricht. Allerdings zeigten sich dabei auch diverse Fehlintegrationen des KO-Konstrukts. Trotzdem wurde der Klon in ein Kerntransfer-Experiment eingesetzt, da so eine „echte“ Positivkontrolle zur Verfügung stand, die als mitlaufende Kontrolle in den folgenden Tests, aber auch zum Etablieren weiterer Nachweissysteme (z.B. inverse PCR) diente. Die Ergebnisse der DNA-Analysen der Feten waren erwartungsgemäß identisch mit denen des Ausgangsklons (96/26). Zusätzlich zu den bisherigen Analysen wurde auch die inverse PCR eingesetzt, mittels derer ebenfalls ein Fragment der erwarteten Größe aus dem umgelagerten bLG-Gen detektiert werden konnte. Bei der weiterführenden Analyse (Transformation der Fragmente aus der inversen PCR in kompetente Bakterien und nachfolgende Sequenzierung) konnte jedoch weder eine homologe Rekombination noch ein Integrationsort des KO-Vektors im bovinen Genom nachgewiesen werden. Dies lag daran, dass es bei einem großen Teil der bakteriellen Klone zu einem sogenannten *vector rescuing* gekommen war. Dabei kann das Bakterium in Ampicillin-haltigem Selektionsmedium überleben, ohne den ein Ampicillin-Resistenzgen enthaltenden Klonierungsvektor aufgenommen zu haben. Stattdessen wird die Resistenz durch ein aufgenommenes Fragment vermittelt, das in zirkularisierter Form ein komplettes Ampicillin-Resistenzgen ergibt.

Ausgangspunkt für den Fetus 421 war der Klon 2G2. Da es nicht möglich war, diesen Klon in einer Southern-Analyse zu testen, wurde alternativ das *nested*-PCR-Produkt der Population sequenziert, aus der der Klon 2G2 stammt. Die Daten zeigten einen Übergang zwischen vektorieller und genomischer Sequenz, wie er im Fall einer homologen Rekombination des bLG-Gens am Ende des 3'-homologen Bereichs zu erwarten ist. So konnte mit einem der beiden Primer eine vektorielle Sequenz identifiziert werden, während die Sequenz ausgehend vom reversen Primer eindeutig genomischen Ursprungs ist. Beide Primer wurden sowohl für die Amplifikation aus der DNA der Population als auch für die Sequenzierung dieses Amplifikats verwendet und sind identisch mit dem inneren Primerpaar der *nested*-PCR. Es lässt sich somit nicht ausschließen, dass beim Fetus 421 ein heterozygoter Knockout des bLG-Gens vorlag. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieses Kerntransfer-Experiments war es, Hinweise auf die Qualität der so manipulierten Fibroblasten hinsichtlich ihrer späteren Verwendung als Kernspender zu erlangen. Mit diesem Experiment konnte außerdem überprüft werden, ob auch die Kerne von Zellen, deren Proliferationsvermögen - wie beim Klon 2G2 - eingeschränkt ist, noch erfolgreich in ein Kerntransfer-Experiment eingesetzt werden können. Da sich der Fetus 421 augenscheinlich die ersten etwa 40 Tage bis zu seiner Isolierung aus dem Muttertier normal entwickelte (eine Zeitspanne, in der es

bei Embryonen aus Kerntransfer-Experimenten häufig zu Aborten kommt), kann man davon ausgehen, dass die vorangegangene Behandlung mit dem liposomalen Transfektionsreagenz ebenso wie die Kultivierung der Zellen *in vitro* keinen negativen Einfluss auf die Effizienz eines anschließenden Klon-Experiments hat. Offensichtlich scheint sich auch eine Proliferationsdepression, wie sie bei Klon 2G2 vor dem Kerntransfer zu beobachten war, nicht nachteilig auf das Klonierungspotenzial auszuwirken. Dasselbe gilt für Klone, bei denen die DNA mit Hilfe des „Nucleofactors“ (*Amaxa*) eingebracht wurde. Dies wird durch die erfolgreiche Gewinnung der Zwillingfeten 639/1 und 639/2 belegt, die aus dem Nucleofections-Klon 96/26 hervorgingen.

Erwartungsgemäß war auch die DNA des Fetus 421 in der *nested*-PCR positiv, das Signal jedoch im Vergleich zu dem der im selben PCR-Ansatz analysierten Feten 639/1 und 639/2, sehr schwach. Ein derart schwaches Signal würde man bei einem durch somatischen Kerntransfer erzeugten Tier, wie dem Fetus 421, nicht erwarten. Denn im vorliegenden Fall sollte jede Zelle das Transgen tragen (Resistenzgen für Neomycin) und die gewünschte Veränderung aufweisen. Die Situation würde sich anders darstellen, wenn Verfahren wie die Mikroinjektion oder die Manipulation von ES-Zellen zur Anwendung gekommen wären, bei denen in der ersten Generation Chimären entstehen. Im Gegensatz zum Klonen von transgenen Tieren durch somatischen Kerntransfer haben diese Techniken den Nachteil, dass vollständig transgene Tiere erst durch Rückkreuzung der Chimären erzeugt werden können. Noch überraschender war, dass das *nested*-PCR-Signal bei den Fibroblasten, die vor der DNA-Isolierung aus dem Fetus 421 gewonnen und *in vitro* weiterkultiviert wurden, völlig fehlte. Die zugehörigen Southern-Analysen der fetalen und der Fibroblasten-DNA zeigten ein entsprechendes Ergebnis. Eine mögliche Erklärung könnte eine größere Deletion im bLG-Gen sein, die sowohl den Bindungsbereich des am Ende des 3'-homologen Bereichs lokalisierten Primers betrifft als auch den Großteil des Bindungsbereichs der für die in den Southern-Analysen verwendete Sonde. Auch das fehlende Amplifikat (inverse PCR) der fetalen und der aus den Fibroblasten isolierten DNA spricht für eine solche Deletion, die die Bindestelle mindestens eines der beiden Primer betrifft. Das erklärt allerdings nicht den Unterschied der Ergebnisse zwischen den beiden Geweben (aus der Haut isolierte Fibroblasten bzw. alle anderen in der fetalen DNA enthaltenen Geweben) desselben Organismus. Dieser Gewebe-Unterschied war allerdings nicht nachweisbar, wenn die DNA vor der Southern-Analyse mit zwei anderen Restriktionsenzymen geschnitten wurde. In diesem Fall war das Ergebnis sowohl für die fetale als auch für die aus den Fibroblasten isolierte DNA eindeutig negativ.

Ganz offensichtlich ist es also nicht zu einer homologen Rekombination mit der geplanten Veränderung des bLG-Gens gekommen. Es lässt sich allerdings auch nicht ausschließen, dass es zu der oben beschriebenen Deletion (Großteil des 3'-homologen Bereichs) gekommen ist. Letztere könnte eine Inaktivierung des bLG-Gens bewirkt haben und so durchaus im Sinne des eigentlichen Projektziels stehen.

### 6.5.1 Schlussbetrachtung und Ausblick

Gezielte genetische Veränderungen im Nutztier wurden bisher fast ausschließlich an transkriptionell aktiven Genen vorgenommen [66] [28] [58] [43]. Der Grund dafür liegt sicherlich darin, dass solche Gene für Manipulationen gut zugänglich und die gängigen Selektionsstrategien darauf adaptiert sind. So kann man sich darauf verlassen, dass das toxische Selektionsagens in jedem Fall umgesetzt wird. Wird die Manipulation in einem transkriptionell inaktiven Bereich vorgenommen, kann sich die Situation

anders darstellen. Im ungünstigsten Fall kommt es nicht zur Expression des Resistenzgens mit der Folge, dass die Zellen mit der gewünschten Veränderung schon während der Selektion im Anschluss an die Transfektion verloren gehen. Auch Marques et al. beobachteten dieses Phänomen bei dem Versuch, das transkriptionell inaktive  $\beta$ -Casein-Gen in primären Schaf-Fibroblasten „auszuknocken“ [64]. Sie schlussfolgern in ihrer Arbeit, dass das Standard-Protokoll für diese Art von Experimenten dahingehend verändert werden muss, die Konzentration des Selektionsagens zu reduzieren, sobald klonales Wachstum im Mikroskop erkennbar ist. Für ein erfolgreiches Vorgehen bei transkriptionell inaktiven Genen ist es zudem essentiell, überlebende Klone so früh wie möglich in Abwesenheit eines Selektionsagens zu reklonieren [64].

Vermutlich haben Kuroiwa et al. genau aus diesem Grund beim *Knockout* des transkriptionell inaktiven *IGHM*-Gens in bovinen fetalen Fibroblasten PCR-positive Klone direkt - ohne vorherige Expansion der Zellen für eine Southern-Analyse - in einen Kerntransfer eingesetzt [57]. Trotz dieser Taktik und der Verwendung einer sehr raffinierten Variante der PNS-Anreicherungsstrategie war der Ansatz von Kuroiwa et al. nicht erfolgreich, da über die Geburt von gesunden Kälbern mit einer homozygoten Deletion des *IGHM*-Gens nicht berichtet werden konnte.

Im Gegensatz zu den Experimenten bei Nutztieren werden bei der Maus für die gezielte Veränderung von Genen embryonale Stammzellen verwendet. In diesen speziellen Zellen ist es möglich, auch transkriptionell inaktive Gene unter Verwendung des Standard-Selektions-Protokolls gezielt zu manipulieren. Der Grund für diese unterschiedlichen Eigenschaften von embryonalen Stammzellen und somatischen Zellen liegt nach Rasmussen et al. in ihrer unterschiedlichen Chromatin-Struktur [82].

Durch die Veröffentlichung der kompletten Sequenz des bovinen Genoms im Jahr 2005 wäre es möglich, den bisherigen KO-Vektor zu verbessern. Im Speziellen ist dabei an den 5'-Arm gedacht, der deutlich verlängert werden könnte, was die Wahrscheinlichkeit für ein homologes Rekombinationsereignis erhöhen würde. Auf diesen Zusammenhang weisen die Ergebnisse von Deng und Capecchi hin, die gezeigt haben, dass mit zunehmender Länge der homologen Vektorarme (bis zu einer Gesamtlänge von etwa 14 kb) die Häufigkeit von homologen Rekombinationsereignissen exponentiell ansteigt [27]. Unabhängig von weiteren Maßnahmen, wie z.B. der Dekondensation der DNA, könnte ein derart verbessertes KO-Konstrukt in Kombination mit der von Kuroiwa et al. vorgestellten geschickten Variante der PNS-Anreicherungsstrategie, die eine sehr wirkungsvolle negative Selektion darstellt, ein verheißungsvoller Ansatz für den Knockout eines transkriptionell inaktiven Gens sein.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- 1: Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A.; Functional diversity of helper T lymphocytes, *Nature* 1996, 787-93
- 2: Alexander, L. J., Hayes, G., Pearse, M. J., Beattie, C. W., Stewart, A. F., Willis, I. M. & Mackinlay, A.G.; Complete sequence of the bovine beta-lactoglobulin cDNA, *Nucleic Acids Res* 1989, 6739
- 3: Arakawa, H;Lodygin, D;Buerstedde, J M; Mutant loxP vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs, *BMC Biotechnol* 2001, 7
- 4: Arbones, M L;Austin, H A;Capon, D J;Greenburg, G; Gene targeting in normal somatic cells: inactivation of the interferon-gamma receptor in myoblasts, *Nat Genet* 1994, 90-7
- 5: Brem, G; Mikromanipulation von Rinderembryonen und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Tierzucht, 1986
- 6: Brem, G; Klonen beim Rind, 2001
- 7: Brem, G. & Springmann, K.; [Gene transfer in swine by DNA microinjection into zygotes], *Tierarztl Prax Suppl* 1989, 31-4
- 8: Briggs, R. & King, T.J.; Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1952, 455-63
- 9: Brown, J P;Wei, W;Sedivy, J M; Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts, *Science* 1997, 831-4
- 10: Byrne, J A;Pedersen, D A;Clepper, L L;Nelson, M;Sanger, W G;Gokhale, S;Wolf, D P;Mitalipov, S M; Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer, *Nature* 2007, 497-502
- 11: Cabot, R A;Kuhholzer, B;Chan, A W;Lai, L;Park, K W;Chong, K Y;Schatten, G;Murphy, C N;Abeydeera, L R;Day, B N;Prather, R S; Transgenic pigs produced using in vitro matured oocytes infected with a retroviral vector, *Anim Biotechnol* 2001, 205-14
- 12: Capecchi, M R; Generating mice with targeted mutations, *Nat Med* 2001, 1086-90
- 13: Chabot, R.; , *Pediatric Allergy* 1951,
- 14: Chan, A W;Homan, E J;Ballou, L U;Burns, J C;Bremel, R D; Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 14028-33
- 15: Chang, Keejong;Qian, Jin;Jiang, MeiSheng;Liu, Yi-Hsin;Wu, Ming-Che;Chen, Chi-Dar;Lai, Chao-Kuen;Lo, Hsin-Lung;Hsiao, Chin-Ton;Brown, Lucy;Bolen, James Jr;Huang, Hsiao-I;Ho, Pei-Yu;Shih, Ping Yao;Yao, Chen-Wen;Lin, Wey-Jinq;Chen, Chung-Hsi;Wu, Fang-Yi;Lin, Yi-Jen;Xu, Jing;Wang, Ken; Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer, *BMC Biotechnol* 2002, 5
- 16: Chowdhury, K; One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* 1991, 2792
- 17: Cibelli, J B;Stice, S L;Golueke, P J;Kane, J J;Jerry, J;Blackwell, C;Ponce de Leon, F A;Robl, J M; Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts, *Science* 1998, 1256-8
- 18: Clark, A J;Burl, S;Denning, C;Dickinson, P; Gene targeting in livestock: a preview, *Transgenic Res* 2000, 263-75



- 19: Clark, A J;Burl, S;Denning, C;Dickinson, P; Gene targeting in livestock: a preview, *Transgenic Res* 2000, 263-75
- 20: Clark, A John;Ferrier, Patricia;Aslam, Samena;Burl, Sarah;Denning, Chris;Wylie, Diana;Ross, Arlene;de Sousa, Paul;Wilmut, Ian;Cui, Wei; Proliferative lifespan is conserved after nuclear transfer, *Nat Cell Biol* 2003, 535-8
- 21: Clemens von Pirquet; Allergie, *Muenchener Medizinische Wochenschrift* 1906, 1457-1458
- 22: Conti, A., Godovac-Zimmermann, J., Liberatori, J. & Braunitzer, G.; The primary structure of monomeric beta-lactoglobulin I from horse colostrum (*Equus caballus*, Perissodactyla), *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1984, 1393-401
- 23: Conti, A., Godovac-Zimmermann, J., Pirchner, F., Liberatori, J. & Braunitzer, G.; Pig beta-lactoglobulin I (*Sus scrofa domestica*, Artiodactyla). The primary structure of the major component, *Biol Chem Hoppe Seyler* 1986, 871-8
- 24: Dai, Yifan;Vaught, Todd D;Boone, Jeremy;Chen, Shu-Hung;Phelps, Carol J;Ball, Suyapa;Monahan, Jeff A;Jobst, Peter M;McCreath, Kenneth J;Lamborn, Ashley E;Cowell-Lucero, Jamie L;Wells, Kevin D;Colman, Alan;Polejaeva, Irina A;Ayares, David L; Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs, *Nat Biotechnol* 2002, 251-5
- 25: David, T. J.; Adverse reactions and intolerance to foods, *Br Med Bull* 2000, 34-50
- 26: Davis, P J;Williams, S C; Protein modification by thermal processing, *Allergy* 1998, 102-5
- 27: Deng, C;Capecci, M R; Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus, *Mol Cell Biol* 1992, 3365-71
- 28: Denning, C;Burl, S;Ainslie, A;Bracken, J;Dinnyes, A;Fletcher, J;King, T;Ritchie, M;Ritchie, W A;Rollo, M;de Sousa, P;Travers, A;Wilmut, I;Clark, A J; Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep, *Nat Biotechnol* 2001, 559-62
- 29: Denning, C;Dickinson, P;Burl, S;Wylie, D;Fletcher, J;Clark, A J; Gene targeting in primary fetal fibroblasts from sheep and pig, *Cloning Stem Cells* 2001, 221-31
- 30: El-Zahar, K., Sitohy, M., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Metro, F., Haertle, T. & Chobert, J.; Purification and physicochemical characterization of ovine beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin, *Nahrung* 2004, 177-83
- 31: Engler-Blum, G;Meier, M;Frank, J;Muller, G A; Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than <sup>32</sup>P-based hybridizations, *Anal Biochem* 1993, 235-44
- 32: Etsamifar, M. & Wuthrich, B.; IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergien bei 383 Patienten unter Berücksichtigung des oralen Allergie-Syndroms, *Allergologie* 1998, 451-457
- 33: Evans, M. J. & Kaufman, M.H.; Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature* 1981, 154-6
- 34: Exl, B. M. & Fritsche, R.; Cow's milk protein allergy and possible means for its prevention, *Nutrition* 2001, 642-51
- 35: Gandolfi, F; Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals, *Transgenic Res* 1998, 147-55
- 36: Godovac-Zimmermann, J., Conti, A., Liberatori, J. & Braunitzer, G.; Homology between the primary structures of beta-lactoglobulins and human retinol-binding protein: evidence for a similar biological function?, *Biol Chem Hoppe Seyler* 1985, 431-4

- 37: Godovac-Zimmermann, J., Krause, I., Baranyi, M., Fischer-Fruhholz, S., Juszczak, J., Erhardt, G., Buchberger, J. & Klostermeyer, H.; Isolation and rapid sequence characterization of two novel bovine beta-lactoglobulins I and J, *J Protein Chem* 1996, 743-50
- 38: Godovac-Zimmermann, J., Krause, I., Buchberger, J., Weiss, G. & Klostermeyer, H.; Genetic variants of bovine beta-lactoglobulin. A novel wild-type beta-lactoglobulin W and its primary sequence, *Biol Chem Hoppe Seyler* 1990, 255-60
- 39: Halliday, J. A., Bell, K. & Shaw, D.C.; The complete amino acid sequence of feline beta-lactoglobulin II and a partial revision of the equine beta-lactoglobulin II sequence, *Biochim Biophys Acta* 1991, 25-30
- 40: Hamm, Astrid;Krott, Nicole;Breibach, Ines;Blindt, Rudiger;Bosserhoff, Anja K; Efficient transfection method for primary cells, *Tissue Eng* 2002, 235-45
- 41: Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E. J., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., Palmiter, R. D. & Brinster, R.L.; Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection, *Nature* 1985, 680-3
- 42: Hanson, K D;Sedivy, J M; Analysis of biological selections for high-efficiency gene targeting, *Mol Cell Biol* 1995, 45-51
- 43: Harrison, Sharon J;Guidolin, Angelo;Faast, Renate;Crocker, Lesley A;Giannakis, Chris;D'Apice, Anthony J F;Nottle, Mark B;Lyons, Ian; Efficient generation of alpha(1,3) galactosyltransferase knockout porcine fetal fibroblasts for nuclear transfer, *Transgenic Res* 2002, 143-50
- 44: Haskell, R E;Bowen, R A; Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos, *Mol Reprod Dev* 1995, 386-90
- 45: Hayes, H. C. & Petit, E.J.; Mapping of the beta-lactoglobulin gene and of an immunoglobulin M heavy chain-like sequence to homoeologous cattle, sheep, and goat chromosomes, *Mamm Genome* 1993, 207-10
- 46: Hayflick, L;moorhead, P S; The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp Cell Res* 1961, 585-621
- 47: Hill, A. R.; Chemical species in cheese and their origin in milk components, *Adv Exp Med Biol* 1995, 43-58
- 48: Hill, J R;Winger, Q A;Long, C R;Looney, C R;Thompson, J A;Westhusin, M E; Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells, *Biol Reprod* 2000, 1135-40
- 49: Holgate, S. T., Church, M. K., Howarth, P. H., Morton, E. N., Frew, A. J. & Djukanovic, R.; Genetic and environmental influences on airway inflammation in asthma, *Int Arch Allergy Immunol* 1995, 29-33
- 50: Infante-Duarte, C. & Kamradt, T.; Th1/Th2 balance in infection, *Springer Semin Immunopathol* 1999, 317-38
- 51: Janeway, J A;Travers, P;Walport, M;Shlomchick; *Immunologie*, 2002
- 52: Jeannotte, L;Ruiz, J C;Robertson, E J; Low level of Hox1.3 gene expression does not preclude the use of promoterless vectors to generate a targeted gene disruption. *off, Mol Cell Biol* 1991, 5578-85
- 53: Jo, D;Nashabi, A;Doxsee, C;Lin, Q;Unutmaz, D;Chen, J;Ruley, H E; Epigenetic regulation of gene structure and function with a cell-permeable Cre recombinase, *Nat Biotechnol* 2001, 929-33

- 54: Kamradt, T. & Burmester, G.R.; Cytokines and arthritis: is the Th1/Th2 paradigm useful for understanding pathogenesis?, *J Rheumatol* 1998, 6-8
- 55: Keefe, E. S.; The history of infant feeding II. Seventeenth and eighteenth centuries, *Arch Dis Child* 1953, 232-240
- 56: Kontopidis, G., Holt, C. & Sawyer, L.; The ligand-binding site of bovine beta-lactoglobulin: evidence for a function?, *J Mol Biol* 2002, 1043-55
- 57: Kuroiwa, Yoshimi;Kasinathan, Poothappillai;Matsushita, Hiroaki;Sathiyaselan, Janaki;Sullivan, Eddie J;Kakitani, Makoto;Tomizuka, Kazuma;Ishida, Isao;Robl, James M; Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle, *Nat Genet* 2004, 775-80
- 58: Lai, Liangxue;Kolber-Simonds, Donna;Park, Kwang-Wook;Cheong, Hee-Tae;Greenstein, Julia L;Im, Gi-Sun;Samuel, Melissa;Bonk, Aaron;Rieke, August;Day, Billy N;Murphy, Clifton N;Carter, David B;Hawley, Robert J;Prather, Randall S; Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning, *Science* 2002, 1089-92
- 59: Lanza, R P;Cibelli, J B;Blackwell, C;Cristofalo, V J;Francis, M K;Baerlocher, G M;Mak, J;Schertzer, M;Chavez, E A;Sawyer, N;Lansdorp, P M;West, M D; Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells, *Science* 2000, 665-9
- 60: Lavitrano, Marialuisa;Bacci, Maria Laura;Forni, Monica;Lazzereschi, Davide;Di Stefano, Carla;Fioretti, Daniela;Giancotti, Paola;Marfe, Gabriella;Pucci, Loredana;Renzi, Luigina;Wang, Hongjun;Stoppacciaro, Antonella;Stassi, Giorgio;Sargiacomo, Massimo;Sinibaldi, Paola;Turchi, Valeria;Giovannoni, Roberto;Della Casa, Giacinto;Seren, Eraldo;Rossi, Giancarlo; Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 14230-5
- 61: Lenz, Petra;Bacot, Silvia M;Frazier-Jessen, Michelle R;Feldman, Gerald M; Nucleoporation of dendritic cells: efficient gene transfer by electroporation into human monocyte-derived dendritic cells, *FEBS Lett* 2003, 149-54
- 62: Lundin, Cecilia;Erixon, Klaus;Arnaudeau, Catherine;Schultz, Niklas;Jenssen, Dag;Meuth, Mark;Helleday, Thomas; Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells, *Mol Cell Biol* 2002, 5869-78
- 63: Mahe, S., Messing, B., Thuillier, F. & Tome, D.; Digestion of bovine milk proteins in patients with a high jejunostomy, *Am J Clin Nutr* 1991, 534-8
- 64: Marques, Margarita M;Thomson, Alison J;McCreath, Kenneth J;McWhir, Jim; Conventional gene targeting protocols lead to loss of targeted cells when applied to a silent gene locus in primary fibroblasts, *J Biotechnol* 2006, 185-93
- 65: Martin, G. R.; Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, 7634-8
- 66: McCreath, K J;Howcroft, J;Campbell, K H;Colman, A;Schnieke, A E;Kind, A J; Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells, *Nature* 2000, 1066-9
- 67: McGrath, J. & Solter, D.; Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion, *Science* 1983, 1300-2
- 68: Merrihew, R V;Sargent, R G;Wilson, J H; Efficient modification of the APRT gene by FLP/FRT site-specific targeting, *Somat Cell Mol Genet* 1995, 299-307

- 69: Mir, Bashir; Piedrahita, Jorge A; Nuclear localization signal and cell synchrony enhance gene targeting efficiency in primary fetal fibroblasts, *Nucleic Acids Res* 2004, e25
- 70: Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R.L.; Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *J Immunol* 1986, 2348-57
- 71: Natale, M., Bisson, C., Monti, G., Peltran, A., Garoffo, L. P., Valentini, S., Fabris, C., Bertino, E., Coscia, A. & Conti, A.; Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry, *Mol Nutr Food Res* 2004, 363-9
- 72: Niemann, H. & Kues, W.A.; Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine, *Anim Reprod Sci* 2003, 291-317
- 73: Palmiter, R D; Chen, H Y; Brinster, R L; Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring, *Cell* 1982, 701-10
- 74: Pang, K M; Knecht, D A; Partial inverse PCR: a technique for cloning flanking sequences, *Biotechniques* 1997, 1046-8
- 75: Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C., Findlay, J. B., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E. & Kraulis, P.J.; The structure of beta-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein, *Nature* 1986, 383-5
- 76: Patsch, C; Edenhofer, F; Conditional mutagenesis by cell-permeable proteins: potential, limitations and prospects, *Handb Exp Pharmacol* 2007, 203-32
- 77: Perry, A C; Rothman, A; de las Heras, J I; Feinstein, P; Mombaerts, P; Cooke, H J; Wakayama, T; Efficient metaphase II transgenesis with different transgene archetypes, *Nat Biotechnol* 2001
- 78: Perry, A C; Wakayama, T; Kishikawa, H; Kasai, T; Okabe, M; Toyoda, Y; Yanagimachi, R; Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection, *Science* 1999, 1180-3
- 79: Pervaiz, S. & Brew, K.; Purification and characterization of the major whey proteins from the milks of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*), and the beagle (*Canis familiaris*), *Arch Biochem Biophys* 1986, 846-54
- 80: Pichler, W. J.; IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergien: Klassifikation basierend auf dem Sensibilisierungsweg, *Allergologie* 1998, 441-450
- 81: Prella, K., Zink, N. & Wolf, E.; Pluripotent stem cells--model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy, *Anat Histol Embryol* 2002, 169-86
- 82: Rasmussen, Theodore P; Embryonic stem cell differentiation: a chromatin perspective, *Reprod Biol Endocrinol* 2003, 100
- 83: Revermann, C; Hennen, L; Klonen von Tieren, 2000
- 84: Roth, D B; Wilson, J H; Relative rates of homologous and nonhomologous recombination in transfected DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, 3355-9
- 85: Rouvinen, J., Virtanen, T. & Mantyjarvi, R.; Search for the determinants of allergenicity in proteins of the lipocalin family, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001, 199-206
- 86: Rytönen, J., Karttunen, T. J., Karttunen, R., Valkonen, K. H., Jenmalm, M. C., Alatossava, T., Björkstén, B. & Kokkonen, J.; Effect of heat denaturation on beta-lactoglobulin-induced gastrointestinal sensitization in rats: denatured betaLG induces a more intensive local immunologic response than native betaLG, *Pediatr Allergy Immunol* 2002, 269-77

- 87: Saarinen, K. M., Juntunen-Backman, K., Jarvenpaa, A. L., Kuitunen, P., Lope, L., Renlund, M., Siivola, M. & Savilahti, E.; Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: A prospective study of 6209 infants, *J Allergy Clin Immunol* 1999, 457-61
- 88: Saiki, R K;Gelfand, D H;Stoffel, S;Scharf, S J;Higuchi, R;Horn, G T;Mullis, K B;Erich, H A; Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 1988, 487-91
- 89: Sampson, H. A.; Update on food allergy, *J Allergy Clin Immunol* 2004, 805-19; quiz 820
- 90: Sargent, R G;Breneman, M A;Wilson, J H; Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination, *Mol Cell Biol* 1997, 267-77
- 91: Sawyer, L. & Kontopidis, G.; The core lipocalin, bovine beta-lactoglobulin, *Biochim Biophys Acta* 2000, 136-48
- 92: Schnieke, A E;Kind, A J;Ritchie, W A;Mycock, K;Scott, A R;Ritchie, M;Wilmut, I;Colman, A;Campbell, K H; Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts, *Science* 1997, 2130-3
- 93: Schnyder, B. & Pichler, W.J.; [Food intolerance and food allergy], *Schweiz Med Wochenschr* 1999, 928-33
- 94: Sedivy, J M;Dutriaux, A; Gene targeting and somatic cell genetics--a rebirth or a coming of age?, *Trends Genet* 1999, 88-90
- 95: Sedivy, J M;Sharp, P A; Positive genetic selection for gene disruption in mammalian cells by homologous recombination, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 227-31
- 96: Selo, I;Clement, G;Bernard, H;Chatel, J;Creminon, C;Peltre, G;Wal, J; Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides, *Clin Exp Allergy* 1999, 1055-63
- 97: Selo, I., Clement, G., Bernard, H., Chatel, J., Creminon, C., Peltre, G. & Wal, J.; Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides, *Clin Exp Allergy* 1999, 1055-63
- 98: Shah-Mahoney, N;Hampton, T;Vidaver, R;Ratner, D; Blocking the ends of transforming DNA enhances gene targeting in *Dictyostelium*, *Gene* 1997, 33-41
- 99: Sharma, S;Kumar, P;Betzler, C;Singh, T P; Structure and function of proteins involved in milk allergies, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001, 183-7
- 100: Song, Chun Ying;Chen, Wen Liang;Yang, Ming Chi;Huang, Jen Pin;Mao, Simon J T; Epitope mapping of a monoclonal antibody specific to bovine dry milk: involvement of residues 66-76 of strand D in thermal denatured beta-lactoglobulin, *J Biol Chem* 2005, 3574-82
- 101: Southern, E M; Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol* 1975, 503-17
- 102: Stoger, P. & Wuthrich, B.; Type I allergy to cow milk proteins in adults. A retrospective study of 34 adult milk- and cheese-allergic patients, *Int Arch Allergy Immunol* 1993, 399-407
- 103: Sullivan, P. B.; Food allergy and food intolerance in childhood, *Indian J Pediatr* 1999, S37-45
- 104: Takahashi, Kazutoshi;Tanabe, Koji;Ohnuki, Mari;Narita, Megumi;Ichisaka, Tomoko;Tomoda, Kiichiro;Yamanaka, Shinya; Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell* 2007, 861-72

- 105: Takata, M;Sasaki, M S;Sonoda, E;Morrison, C;Hashimoto, M;Utsumi, H;Yamaguchi-Iwai, Y;Shinohara, A;Takeda, S; Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells, *EMBO J* 1998, 5497-508
- 106: te Riele, H;Maandag, E R;Berns, A; Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 5128-32
- 107: Vaiman, D., Mercier, D., Eggen, A., Bahri-Darwich, I., Grohs, C., Cribiu, E. P., Dolf, G., Oustry, A., Guerin, G. & Leveziel, H.; A genetic and physical map of bovine chromosome 11, *Mamm Genome* 1994, 553-6
- 108: Vanderhoof, J. A.; Food hypersensitivity in children, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998, 419-22
- 109: Vasquez, K M;Marburger, K;Intody, Z;Wilson, J H; Manipulating the mammalian genome by homologous recombination, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 8403-10
- 110: Virtanen, T.; Lipocalin allergens, *Allergy* 2001, 48-51
- 111: Wakayama, T;Perry, A C;Zuccotti, M;Johnson, K R;Yanagimachi, R; Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei, *Nature* 1998, 369-74
- 112: Wal, J. M.; Cow's milk allergens, *Allergy* 1998, 1013-22
- 113: Wal, J. M.; Structure and function of milk allergens, *Allergy* 2001, 35-8
- 114: Weissbuch; *Allergie in Deutschland* 2. Auflage ed. Muenchen, 2003
- 115: Willadsen, S M;Janzen, R E;McAlister, R J; Shea, B F;Hamilton, G;McDermid, D; The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle, *Theriogenology* 1991, 161-170
- 116: Wilmut, I;Beaujean, N;de Sousa, P A;Dinnyes, A;King, T J;Paterson, L A;Wells, D N;Young, L E; Somatic cell nuclear transfer, *Nature* 2002, 583-6
- 117: Wilmut, I;Schnieke, A E;McWhir, J;Kind, A J;Campbell, K H; Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature* 1997, 810-3
- 118: Wolf, E;Zakhartchenko, V;Brem, G; Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives, *J Biotechnol* 1998, 99-110
- 119: Yanez, R J;Porter, A C; Influence of DNA delivery method on gene targeting frequencies in human cells, *Somat Cell Mol Genet* 1999, 27-31
- 120: Yu, J;Vodyanik, MA;Smuga-Otto, K;Antosiewicz-Bourget, J;Frane, JL;Tian, S;Nie, J;Jonsdottir, GA;Ruotti, V;Stewart, R;Slukvin, II;Thomson, JA; Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells, *Science* 2007,
- 121: Yunginger, J. W., Sweeney, K. G., Sturner, W. Q., Giannandrea, L. A., Teigland, J. D., Bray, M., Benson, P. A., York, J. A., Biedrzycki, L. & Squillace, D.L.; Fatal food-induced anaphylaxis, *JAMA* 1988, 1450-2



```

bLG-VarB      5645 CCACCCC-----GTCCTACCAAGTGGTGACCCCGGGGGAGCCCCGC- 5686
bLG-Pseudogen 3265 CCGCACCTGGTAGAGAGGGGCATTCACTGGGTGTCTGGAGAGGATACTGCC 3314
      ** * **          *      ** * ***      * * * *      * **

bLG-VarB      5687 -----TGGTGTGGGGGG-----TGCTGGGGGCTGACCAGAAAC 5720
bLG-Pseudogen 3315 TGCCCAGTGGCTGCCGTGGGAAACAGCACTCCCAGGCGATGCTCTGGGCC 3364
      *** ** * ***          * * ** * * * *      * * *

bLG-VarB      5721 CCCCCTCC-----TGCTGGAACTCAC-----TTTC---CTCCCGTCT 5754
bLG-Pseudogen 3365 CCCCAGACAGTTGTGGTGGAGGGAATCAGAAGAGATTTTCAGGCTCCACTCC 3414
      **** *          ** ** * ***          **** ***** **

bLG-VarB      5755 TGATC-TCTTCCAGCCTTGAATGAGAACAAAGTCCTTGTGCTGG-ACACC 5802
bLG-Pseudogen 3415 GGCCCCTTTTCCAGATCACGGGAAAGGAAGATTTCTGTGCCGGGACACA 3464
      * * * * * * * *          ** * ** *      * * * * * * * *

bLG-VarB      5803 GACTACAAAAAGTACCTGCTCTTCTGCATGGAGAACAG-TGCTGAGCC-C 5850
bLG-Pseudogen 3465 GACTACAGCAGCTACACGATCTTCTGCATGGAGGGCCGATGCCACCGAT 3514
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

bLG-VarB      5851 GAGCAAAGCCTGGCCTGCCAGTGCCTGGGTGGGTGCCAACCCCTGGC---- 5896
bLG-Pseudogen 3515 GAGGGCAGCGTGATGTGCCAGTGTCTGGGTACGTGGGGACCCTGCAGAGC 3564
      ***      *** **      * * * * * * * * * * * * * * * *

bLG-VarB      5897 -TGCCAGGGAGACCA-----GCTGTGT--GGTCCTCGCTGCAACGGGG 5937
bLG-Pseudogen 3565 GTGTCCAGAGGAGCTGCGCCTCACCGAGTCGGACCCTTGGTGC AACTGTT 3614
      ** * * * * * * * *          * * * * *      * * * * * * * * *

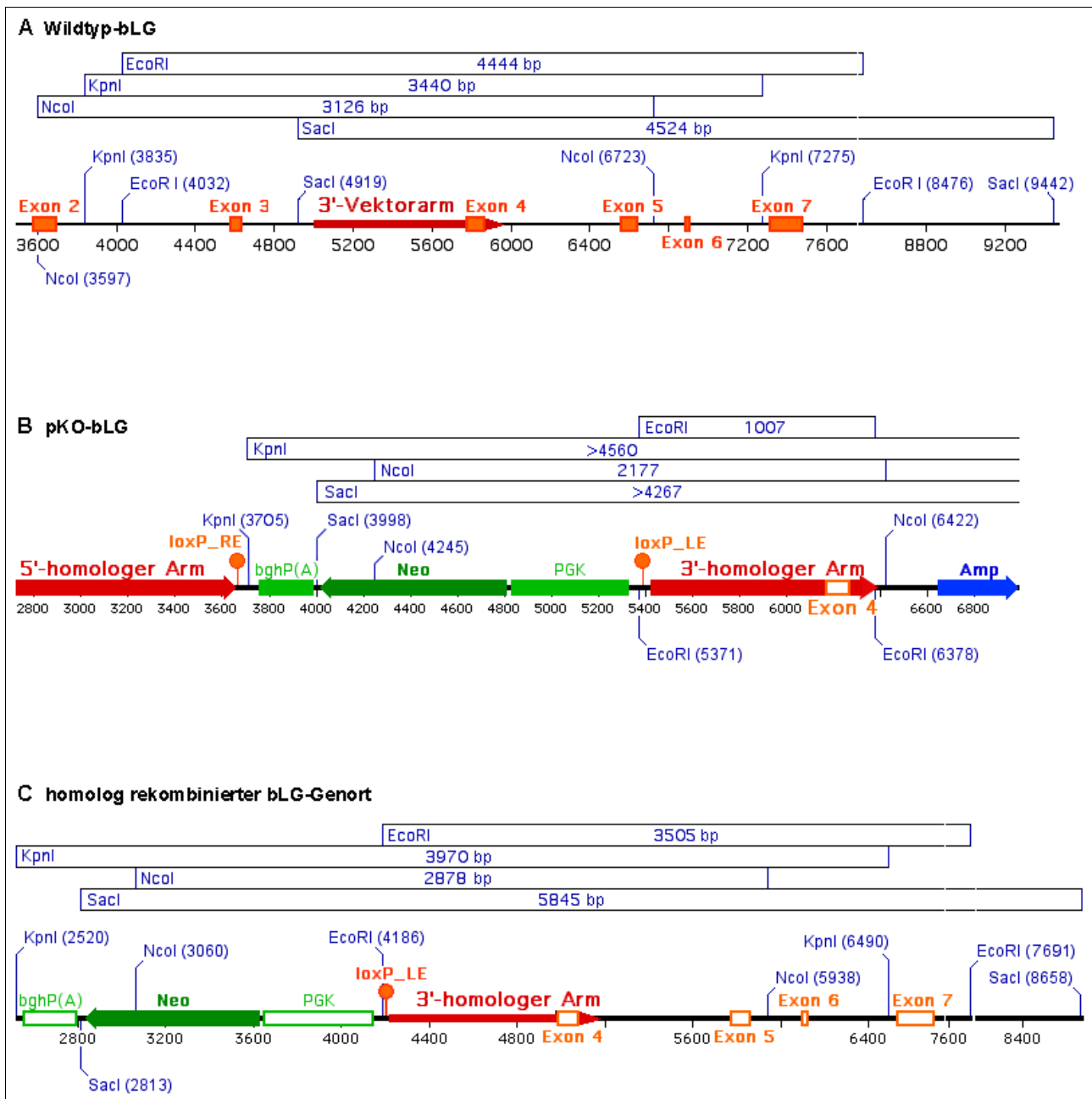
bLG-VarB      5938 CCGGGGGGGACGGTGGGAGCAGGGAGCTTGAT--TCCCAGGAGGAGGAGG 5985
bLG-Pseudogen 3615 AATAAGGGGCACTCGAGATGCCCAAACTTCACGGCCCCTGGCGGCAGGAA 3664
      ****          * **          * * * * *      * * * * * *

bLG-VarB      5986 GATGGGGGGT-----CCCCAGTCCCGCCAGGAGAGGGTGGTCATATAACC 6030
bLG-Pseudogen 3665 GGGGAGGGGTATGCCTCACTGGCCCCCACGGGACACACAAGCCAAGGTCC 3714
      * * * * * *          * * * * * * * * * *      * * * * **

```

**Sequenz 7.1: Sequenzvergleich zwischen bLG- und Pseudogen.** Gezeigt ist der Bereich des 3'-homologen Vektorarms. Übereinstimmungen zwischen beiden Sequenzen sind durch Asteriske dargestellt. Rot markiert ist der Primer **bLG-5023s**, blau markiert der Primer **bLG-5792as**, die für die Amplifikation des 3'-Vektorarms aus boviner DNA verwendet wurden. Bei letzterem wurden die letzten vier Basenpaare modifiziert, sodass eine *EcoR* I-Schnittstelle entsteht (nicht gezeigt).





**Abb. 1: Fragmentgrößen nach Restriktion mit *EcoRI*, *KpnI*, *NcoI* und *SacI*.** Neben den erwarteten Fragmenten, die mit der spezifischen Sonde detektiert werden können, sind auch die einzelnen Schnittstellen für A den unveränderten bLG-Genort (Wildtyp-bLG), B den vollständig integrierten KO-Vektor (pKO-bLG) und C den homolog rekombinierten bLG-Genort angegeben. Es ist jeweils nur der für die Restriktion relevante Teil des bLG-Genorts bzw. des Vektors dargestellt.

KLON	KTE	FUSIONIERT (%)	GETEILTE EMBR. (%)	BLASTOCYSTEN (%)	TRANSF. EMBR.	EMFP.	TRÄ.	FETEN
4D2	17	16 (94,1 %)	11 (68,7 %)	4 (25,0 %)	4	2	0	
1D4	38	34 (89,5 %)	26 (76,4 %)	5 (14,7 %)	5	2	0	
2G2	38	34 (89,5 %)	30 (88,2 %)	10 (29,4 %)	9	3	1	421
2G2*	41	39 (95,1 %)	27 (69,2 %)	2 (2,5 %)	2	1	0	
96/26	19	17 (89,5 %)	11 (64,7 %)	6 (35,3 %)	6	3	1	639/1 und 639/2

**Tab. 1: Klonierungsdaten dreier Lipofections-Klone und eines Nucleofections-Klons.** Die Klone 4D2, 1D4 und 2G2 stammen aus der Lipofection 1 von BFF der Linie 209. Klon 96/26 ging aus der Nucleofection von BFF der Linie 207 hervor. Embr.=Embryonen; KTE=Kerntransfer-Einheiten; transf. =transferiert; Empf.=Empfänger; Trä.=Trächtigkeiten; \*Klon 2G2 wurde vor dem zweiten Kerntransfer noch einmal passagiert und auch nach sieben Passagen als Kerndonor verwendet.

### Klon 5, Primer iPCR3'loxP

```

1      GATAGGGCGA ATTCTCTAGG ATCGATTCTA GGGATCCCGG CGCGCCCTAC CGGGTAGGGG
      PGK-Promotor 5253-5297
61     AGGCGCTTTT CCAAGGCAG TCTGGAGCAT GTACAACCC AAGACTGAGC CAGGAAGAAA
121    TAGAAAATAT GGACAGACCA GTTACCAGTA ATGAAATTGA ATCAATAATT TTTAAACAAT
181    TCCCTCAAAA GCAGTCCAGG ACCAGAGGGC TTCACAGCTG TATCTACCGA ACTTCTTTTT
      5'-Arm 1460-1286
241    CTGGTTGTGC TGGGACTTCA TTAGATCTCC TAGAGTTAAC ACTGGCCGTC GTTTTACCGG
301    TCCGTGCAAA AGGCCAGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCGTTTTTC CATAGGCTCC
361    GCCCCCTGA  CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA AACCCGACAG
421    GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT CGTGCCTCT CCGTGTCCGA
481    CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGCTTTCTC
541    ATAGCTCACG CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGTTCGT TCGTCCAAG CTGGGCTGTG
601    TGCACGAACC CCCCCTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATAT CGTCTTGAGT
661    CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC AGGATTAGCA
721    GAGCGAGGTA TGTGGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA
781    CTAGAAGAAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG
841    TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT TTTTGTGTTG
901    AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAA
      ColE1 ori 1205-626
TGTACA                               Nsp I
AGATCTAATGAAGTCCCAGCACAAACC Primer bLG-101s (Bgl II)

```

**Sequenz 7.2: Ergebnis der Sequenzierung von Klon 5 ausgehend von Primer iPCR3'loxP.** In der Sequenz ist ein Teil des PGK-Promotors (grün) enthalten, die bis zur *Nsp* I-Schnittstelle (hellblau) bei Pos. 5297 reicht. Daran schließt sich der 5'-Teil des 5'-Vektorarms (rot) an, dessen Anfang durch den Primer bLG-101s gekennzeichnet ist (grau hinterlegt). Die Sequenz geht weiter in 5'-Richtung des KO-Vektors bis zur Pos. 626 im Replikationsursprung (blau).

TRANSFEKTION-METHODE <sup>a</sup>	TRANSFEKTIONS-EFFIZIENZ <sup>b</sup>	WILLKÜRLICHE INTEGRATION <sup>c</sup>	GEZIELTE VERÄNDERUNG <sup>d</sup>	"TARGETING" VERHÄLTNIS <sup>e</sup>
Mikroinjektion	ND	1,2x 10 <sup>-1</sup>	8,3x 10 <sup>-3</sup>	1:15
Elektroporation	10 %	8,7x 10 <sup>-4</sup>	2,1x 10 <sup>-7</sup>	1:2 400
Calcium-Phosphat	24 %	2,5x 10 <sup>-2</sup>	6,3x 10 <sup>-7</sup>	1:40 000
FuGENE-6	92 %	4,8x 10 <sup>-2</sup>	1,3x 10 <sup>-7</sup>	1:370 000
LipofectAMINE	98 %	2,2x 10 <sup>-1</sup>	6,2x 10 <sup>-7</sup>	1:350 000

**Tab. 2: Targeting-Verhältnis in Abhängigkeit der Transfektionsmethode.** Aus [109]

<sup>a</sup> Bei der Mikroinjektion (G.N.Proctor und J.H.W., unveröffentlichte Daten) wurden der Vektor pAG-7 und die Zelllinie CHO-ATS-49tg eingesetzt. Bei den anderen Transfektionsmethoden wurden der Vektor pGS100, die Zelllinie RMP41 und publizierte Protokolle verwendet;

<sup>b</sup> Die Transfektionseffizienz wurde nach Transfektion der Zellen mit pEYFP-N1 durchflusszytometrisch bestimmt;

<sup>c</sup> Die willkürliche Transfektion wurde über die Selektion von GPT<sup>+</sup>-Klonen nach Transfektion mit Xho I-linearisiertem Vektor pGS100 bestimmt;

<sup>d</sup> Die gezielte Veränderung durch homologe Rekombination wurde über die Selektion von APRT<sup>+</sup>-Klonen nach Transfektion mit Xho I-linearisiertem Vektor pGS100 bestimmt;

<sup>e</sup> Das Targeting-Verhältnis entspricht der Anzahl von gezielt veränderten Klonen zu solchen, die eine willkürliche Integration tragen. ND=nicht ermittelt

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle zwei Personen, die wesentlich zum Zustandekommen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: zum einen Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß für die hervorragende Betreuung während der praktischen Laborarbeit am Institut für Anthropologie und Humangenetik (Department Biologie II) der LMU München, und zum anderen Herrn O. Univ. Prof. DDr.habil. Drs. h.c. Gottfried Brem vom Institut für Tierzucht und Genetik (Department für Biomedizinische Wissenschaften) der Veterinärmedizinischen Universität Wien, der das Projekt ins Leben gerufen und die Finanzierung ermöglicht hat.

Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Weiß, allen voran Nicole Kotzias, Steffi Färberböck, Chris Schiller, Stefi Hüfner, Claudia Cavallini, Sabine Holzleitner, Valeska Hofmeister, Elfriede Müller und Conny Estaller, die mich über einen langen Zeitraum meiner Arbeit begleitet haben, war nicht nur fachlich sondern auch privat eine große Bereicherung und hat den Laboralltag auch in schwierigen Phasen (die es wohl in jeder Doktorarbeit gibt) erleichtert. Ihnen allen gilt für ihre Unterstützung mein ganz besonderer Dank.

Einen weiteren unschätzbar wichtigen Beitrag zur Entstehung und Durchführung dieser Arbeit hat Frau Sigi Müller aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Brem geleistet, die mir vor allem bei der Arbeit mit den Fibroblasten mit Rat und Tat zur Seite stand und jederzeit mit der allergrößten Geduld auf meine diversen Fragen und Probleme eingegangen ist. Bei wesentlichen experimentellen Fragen stand mir Frau Regina Klose vom Genzentrum der LMU München (von welchem auch freundlicherweise das Nucleofectionsgerät zur Verfügung gestellt wurde) immer als kompetente Ansprechpartnerin zur Verfügung. Sowohl Frau Müller als auch Frau Klose möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Meinem Vater danke ich für die vielen Stunden, die er in wissenschaftliche Diskussionen mit mir investiert hat und für die vielen guten Tipps und Ratschläge. Dies alles hat sicherlich einen wesentlichen Einfluss auf die aktuelle Form dieser Dissertation. Darüber hinaus danke ich beiden Elternteilen für geduldiges Korrekturlesen und die nicht zu unterschätzende psychologische Unterstützung während dieser Zeit.

Danken möchte ich auch den vielen Menschen, die in unterschiedlichster Form alle ihren persönlichen Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit geleistet haben und hier nicht explizit erwähnt wurden.

## LEBENS LAUF

### **Schulische Ausbildung**

<i>12. Mai 1975</i>	geboren in München
<i>September 1981</i>	Eintritt in die Torquato-Tasso Grundschule, München
<i>September 1985</i>	Eintritt in das städtische Willi-Graf-Gymnasium, München
<i>August 1991 bis Januar 1992</i>	USA-Aufenthalt, Besuch der East-High-School in Denver, Colorado
<i>Juni 1994</i>	Abiturprüfung am Willi-Graf-Gymnasium

### **Studium und Promotion**

<i>WS 1994/95</i>	Aufnahme des Biologiestudiums (Studiengang: Biologie/Diplom) an der Universität Tübingen
<i>seit SS 1995</i>	Fortsetzung des Biologiestudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
<i>Januar bis Oktober 2000</i>	Diplomarbeit mit dem Titel „Vergleich des Peptidprofils von löslichem und membrangebundenem HLA-A24“ bei Frau Prof. E. Weiß am Institut für Anthropologie und Humangenetik (LMU München) und in der Abteilung für Immunhämatologie und Blut-Transfusion des medizinischen Zentrums der Universität Leiden (LUMC), Niederlande
<i>Oktober 2000</i>	Erlangung des akademischen Grades einer Diplom-Biologin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
<i>November 2001 bis Oktober 2005</i>	Promotion zum Thema „Partielle Deletion des $\beta$ -Lactoglobulins durch homologe Rekombination zur Produktion von $\beta$ -Lactoglobulin-freier Milch“ bei Frau Prof. E. Weiß am Institut für Anthropologie und Humangenetik (Department Biologie II, LMU München) in Kooperation mit Herrn Prof. G. Brem (Institut für Tierzucht und Genetik, Department für Biomedizinische Wissenschaften, Veterinärmedizinische Universität Wien)
<i>November 2005 bis Februar 2007</i>	Ausarbeitung der Dissertation und weiterführender Vorträge im Rahmen der Lehrtätigkeit

### **Beruf**

<i>Februar 2007 bis September 2008</i>	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung (IEOT) des Klinikums Rechts der Isar, München
<i>seit Oktober 2008</i>	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Virologie (TU München & Helmholtz Zentrum München)

## **EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Materialien durchgeführt habe.

Ferner bestätige ich, dass ich vor dieser Arbeit keine anderen Promotionsversuche unternommen habe. Dies ist meine erste und einzige Dissertation.

Tania Kummer

München, den 07.07.08