

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



**Untersuchungen zur physiologischen Rolle von
B-Untereinheiten zyklonukleotid-aktivierter
Kationenkanäle anhand einer CNGB1-defizienten
Mauslinie**

Sabine Hüttl
aus München

2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Martin Biel betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 28.10.2004

Sabine Hüttl

Dissertation eingereicht am	28.10.2004
1. Gutachter	Prof. Dr. M. Biel
2. Gutachter	Prof. Dr. A. Vollmar
mündliche Prüfung am	02.12.2004

Diese Dissertation ist veröffentlicht im Verlag Dr. Hut, München, [www. dr.hut-verlag.de](http://www.dr.hut-verlag.de)
ISBN 3-89963-243

Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	5
II.	Abkürzungen	9
III.	Einleitung.....	11
1	Die Retina – Struktur und Signaltransduktion	11
1.1	Aufbau der Retina	11
1.2	Skotopisches und photopisches System	12
1.3	Signaltransduktion in den Photorezeptoren.....	13
2	Das olfaktorische Epithel.....	14
3	CNG-Kanäle	16
4	CNGB1	18
5	Zielsetzung der Arbeit	19
IV.	Material und Methoden.....	21
1	Synthese von DNA-Fragmenten: PCR.....	21
1.1	Allgemein.....	21
1.2	Long Template PCR.....	22
1.3	Genotypisierung	23
1.4	Geschlechtsbestimmung.....	23
1.5	RT-PCR.....	24
1.6	Einführung von Mutationen durch Overlap-PCR	24
2	Auftrennung, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten	25
2.1	Auftrennung von DNA-Fragmenten	25
2.1.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26
2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.2	Isolierung von DNA aus Gelen	26
2.2.1	Elektroelution.....	26
2.2.2	GFX-Säulen.....	26
2.3	Präzipitation von DNA.....	27
2.4	Aufreinigung von DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	27
2.5	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	27
3	Enzymatische Modifikation von DNA.....	27
3.1	Restriktion.....	27
3.2	Ligation	28
3.3	Adapterligation.....	28
3.4	5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	28
3.5	Cre-vermittelte Rekombination.....	28
4	Sequenzanalyse	28
5	Amplifikation und Isolation von Plasmid-DNA	29
5.1	Verwendete Plasmide.....	29
5.2	Verwendete Bakterien und ihre Kultur	31
5.3	Transformation von <i>E. coli</i>	32

5.4	Erzeugung TSS-kompetenter <i>E. coli</i>	32
5.5	Plasmidpräparation durch alkalische Lyse.....	32
5.6	Plasmidpräparation im Großmaßstab.....	33
5.7	Präparation von low-copy Plasmiden.....	33
6	Isolation von genomischer DNA.....	34
6.1	Isolation von DNA aus Mausgewebe.....	34
6.1.1	Isolation von DNA für PCR.....	34
6.1.2	Isolation von DNA für Southern Blot Analysen.....	34
6.2	Isolation von DNA aus ES-Zellen.....	35
7	Southern Blot Analyse.....	35
8	Isolation von RNA und Synthese von cDNA.....	38
8.1	Isolation von Gesamt-RNA aus Mausgewebe.....	38
8.2	Synthese von cDNA.....	38
9	Isolierung und Charakterisierung von Proteinen.....	39
9.1	Isolierung von Membranproteinen aus Zellen oder Gewebe.....	39
9.2	Quantifizierung von Proteinen.....	40
9.3	Western Blot Analyse.....	40
9.4	Aufreinigung von Antikörpern.....	43
9.4.1	Herstellung der Affinitätsäulen:.....	43
9.4.2	Aufreinigung des Antikörpers:.....	44
10	Zellkultur.....	45
10.1	Kultur von HEK293-Zellen.....	45
10.1.1	Kulturbedingungen.....	45
10.1.2	Transfektion von HEK293-Zellen.....	45
10.1.3	Verwendete Expressionsvektoren.....	46
10.2	Kultur und genetische Modifikation (Gene Targeting) von murinen embryonalen Stammzellen.....	46
10.2.1	Kulturbedingungen.....	46
10.2.2	Präparation und Kultur von Feederzellen.....	48
10.2.3	Elektroporation.....	49
10.2.4	Isolation selektions-resistenter ES-Zellklone.....	49
11	Blastozysteninjektion modifizierter ES-Zellen.....	50
12	Zucht und Haltung genetisch veränderter Mäuse.....	50
12.1	Zucht der CNGB1 ^{-/-} -Mäuse.....	50
12.2	Haltung der Mäuse.....	50
13	Gewebeisolierung.....	51
13.1	Retina.....	51
13.1.1	Präparation zur RNA- oder Proteinisolation.....	51
13.1.2	Präparation für immunhistochemische Untersuchungen.....	51
13.1.3	Präparation für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen.....	51
13.1.4	Präparation für transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen.....	52
13.2	Olfaktorisches Epithel.....	52
13.2.1	Präparation zur RNA- oder Proteinisolation.....	52
13.2.2	Präparation für immunhistochemische Untersuchungen.....	52
14	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	53
15	Histologie.....	53
15.1	Nissl-Färbung.....	53

15.2	Hoechst-Färbung	53
16	Immunhistochemie	53
16.2	Fluoreszenzmarkierung von Primärantikörpern	55
16.3	Lektin-Histochemie	56
17	Mikroskopie	56
17.1	Laser-Konfokalmikroskopie	56
17.2	Rasterelektronenmikroskopie	56
17.3	Transmissions-Elektronenmikroskopie	57
18	Elektroretinogramm	57
V.	Ergebnisse	59
1	Analyse des CNGB1-Locus	59
1.1	Codierende Sequenz	59
1.2	Genomische Sequenz: Sequenzierung des CNGB1-BAC-Klons	61
1.3	Erstellung einer Restriktionskarte des CNGB1-Locus	62
2	Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen CNGB1	63
3	Konstruktion eines Targetingvektors für die Deletion von mCNGB1 mittels Gene Targeting	63
3.1	Homologer 3'-Arm	66
3.2	Homologer 5'-Arm	67
3.3	Test auf Funktionalität der loxP-Seiten	67
4	ES-Zell Targeting	68
4.1	Erstes Targeting	69
4.2	Screening der G418-resistenten Klone auf korrekte homologe Rekombination	69
4.3	Überprüfung der positiven Klone auf Intaktheit der loxP-Seiten	72
4.4	Zweites Targeting	72
4.5	Screening der Ganciclovir-resistenten Klone auf konstitutive oder konditionale Deletion des CNGB1-Locus	73
4.6	Überprüfung der positiven Klone mittels PCR	75
5	Blastozysteninjektion positiver ES-Zellklone und Zucht der CNGB1-defizienten Mäuse	76
5.1	Injektion der modifizierten ES-Zellklone in Blastozysten	76
5.2	Zucht der CNGB1 ^{-/-} -Mäuse	76
5.2.1	Postnatale Sterblichkeit	77
5.2.2	Körpergewicht	78
6	Bestätigung der CNGB1-Deletion auf DNA-, RNA- und Proteinebene	79
6.1	Southern Blot Analyse	79
6.2	Genotypisierungs-PCR	80
6.3	RT-PCR	80
6.4	Western Blot Analyse	81
6.5	Immunhistochemie	82
7	Retinaler Phänotyp	82
7.1	CNGA1	83
7.2	Andere CNG-Untereinheiten	84
7.3	Proteine der Phototransduktionskaskade in Stäbchen	85
7.3.1	Rhodopsin	85
7.3.2	GARP	86

7.3.3	Guanylatzyklase E.....	87
7.4	Degeneration der CNGB1-defizienten Retina.....	88
7.4.1	Außensegmente der Photorezeptoren.....	88
7.4.2	Schichtdicke der Körnerschichten.....	90
7.4.3	Funktionalität der verbleibenden Zapfen	91
7.4.4	Gliose	92
7.4.5	Apoptose.....	93
7.5	Innere Retina der CNGB1 ^{-/-} -Mäuse	94
7.5.1	Verlust von Zellfortsätzen in Stäbchen-Bipolar- und Horizontalzellen.....	94
7.5.2	Neuronal sprouting.....	96
7.5.3	Delokalisation von Stäbchen-Bipolarzellen und Horizontalzellen	96
7.6	Untersuchung der Sehfunktion: Elektretinogramm	97
8	Untersuchung heterozygoter Mäuse.....	100
8.1	Klonierung des trunkierten CNGB1a-Proteins	100
8.2	Nachweis von CNGB1a in der HZ-Retina mittels Western Blot Analyse und Immunhistochemie	101
8.3	CNGA1-Expression in der heterozygoten Retina	102
8.4	Untersuchung der HZ-Retina auf denenerative Prozesse.....	103
8.5	Elektretinogramm	104
9	Auswirkungen der CNGB1-Defizienz im olfaktorischen Epithel.....	105
VI.	Diskussion	107
1	Generierung einer CNGB1-defizienten Mauslinie.....	107
2	Bedeutung von CNGB1 für den Stäbchenkanal.....	108
3	Die CNGB1-defiziente Retina: Ein Mausmodell zur Untersuchung des Zapfen-vermittelten Sehens.....	110
4	Degeneration der CNGB1-defizienten Retina: ein Mausmodell für Retinitis pigmentosa	110
5	CNGB1-Defizienz im olfaktorischen Epithel.....	113
VII.	Zusammenfassung.....	115
VIII.	Anhang	117
1	Verwendete Primer	117
2	PCR-Bedingungen.....	120
3	Genomische Sequenz von CNGB1	121
4	Sonden für Southern Blot Analyse	126
5	Verwendete Antikörper	127
5.1	Primärantikörper.....	127
5.2	Sekundärantikörper	128
IX.	Literaturverzeichnis	129
1	Zitierte Veröffentlichungen.....	129
2	Eigene Veröffentlichungen	135
Lebenslauf		136

II. Abkürzungen

ACIII	Adenylatzyklase III
A_{\max}	Absorptionsmaximum
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	bacterial artificial chromosome
bp	base pairs, Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca/CaM	Calcium-Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cds/m ²	Candela-Sekunden pro Quadratmeter
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CNBD	cyclic nucleotide binding domain, Zyklonukleotid-Bindungsdomäne
CNG	cyclic nucleotide gated, zyklonukleotid-gesteuert
cpm	counts per minute
d	Tag
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIC	Differential-Interferenzkontrast (-Mikroskopie)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EF-Zellen	embryonale Feederzellen
E_{\max}	Emissionsmaximum
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FBS	fetal bovine serum, fötales Rinderserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GARP	glutamic acid rich protein, glutaminsäure-reiches Protein
GC-D	Guanylatzyklase D
GC-E	Guanylatzyklase E
GFAP	Glial fibrillary acidic protein, saures Gliafaserprotein
HEK293-Zellen	human embryonic kidney; humane embryonale Nierenzelllinie, Klon 293
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase
HZ	heterozygot; heterozygote Tiere
IHC	Immunhistochemie
INL	inner nuclear layer, innere Körnerschicht
IPL	inner plexiform layer, innere plexiforme Schicht
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kDa	Kilo-Dalton

KLH	keyhole limpet hemocyanin
KO	Knockout
loxP-Seite	locus of X-over of P1; Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase
mAb	monoclonal antibody, monoklonaler Antikörper
MCS	Multiple Cloning Site
Mo	Monat
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MWS-Opisin	mittelwellenlängensensitives Zapfenopsin
ONL	outer nuclear layer, äußere Körnerschicht
OPL	outer plexiform layer, äußere plexiforme Schicht
OR	olfaktorischer Rezeptor
ORN	olfaktorisches Rezeptorneuron
pAb	polyclonal antibody, polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	phosphate buffer, Phosphat-gepufferte, NaCl-freie Salzlösung
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PM	postnataler Monat
PNA	peanut agglutinin, Erdnuß-Agglutinin
PW	postnatale Woche
PZN	Pharmazentralnummer
rad	radiation absorbed dose
<i>rd</i>	retinal degeneration; <i>rd</i> -Maus: Mausmodell für RP
<i>rd</i> s	slow retinal degeneration; <i>rd</i> s-Maus: Mausmodell für RP
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RP	Retinitis pigmentosa
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRY	sex determining region of the Y(-chromosome)
SWS-Opisin	kurzwellenlängensensitives Zapfenopsin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
TSH	thyroid stimulating hormone, Thyrotropin
Wo	Woche
WT	Wildtyp

III. Einleitung

Kationenkanäle, die durch zyklische Nukleotide (cAMP, cGMP) geöffnet werden, spielen eine zentrale Rolle im Seh- und Riechprozeß. Die zyklonukleotid-aktivierten Ströme wurden bereits vor fast 20 Jahren von Fesenko et al. in Photorezeptoren sowie von Nakamura und Gold im olfaktorischen Epithel beschrieben (Fesenko et al., 1985; Nakamura und Gold, 1987). Die Familie der Ionenkanäle, die diese einwärts gerichteten Ströme leiten, wird als CNG-Kanäle (cyclic nucleotide-gated channels) bezeichnet.

1 Die Retina – Struktur und Signaltransduktion

Die Retina (Netzhaut) kleidet den Augenhintergrund aus. Sie ist ein hochspezialisiertes Nervengewebe, in dem Lichtreize in elektrische Signale umgewandelt und dadurch visuelle Reize wahrgenommen und prozessiert werden.

1.1 Aufbau der Retina

Die Retina ist etwa 200µm dick und besteht aus verschiedenen Schichten (Abbildung 1) (Wässle und Boycott, 1991). Zur Rückseite des Augapfels hin ist sie vom Retinalen Pigmentepithel (RPE) begrenzt, in dem 11-*cis*-Retinal regeneriert wird und von dem absterbende Photorezeptor-Außensegmente phagozytiert werden. Direkt unter dem RPE liegen die Außensegmente der Photorezeptoren, in denen die Phototransduktion stattfindet. Sie sind über ein dünnes Zilium mit den Innensegmenten verbunden. Die Somata der Photorezeptoren mit den Zellkernen bilden die äußere Körnerschicht (outer nuclear layer, ONL).

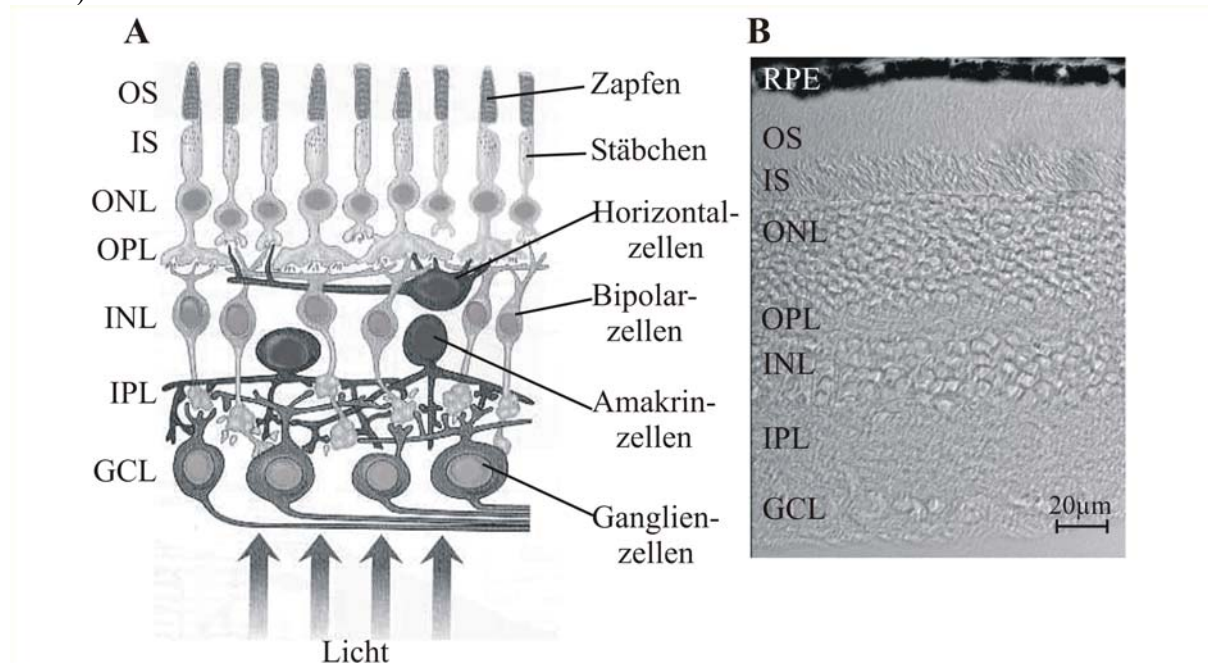


Abbildung 1: Aufbau der Retina

A) Schematische Darstellung der einzelnen Zelltypen und Schichten. OS: Außensegmente. IS: Innensegmente. ONL: äußere Körnerschicht. OPL: äußere plexiforme Schicht. INL: innere Körnerschicht. IPL: innere plexiforme Schicht. GCL: Ganglienzellschicht. Abbildung nach Pomerantz (2004). B) Durchlichtaufnahme des Querschnitts einer Mausretina. RPE: Retinales Pigmentepithel.

In der äußeren plexiformen Schicht (outer plexiform layer, OPL) liegen die Synapsen der Photorezeptoren, an denen die Umschaltung auf sekundäre Neuronen erfolgt. Zu diesen zählen die Bipolarzellen, die Amakrinzellen und die Horizontalzellen, die die innere Körnerschicht (inner nuclear layer, INL) bilden. In der inneren plexiformen Schicht (inner plexiform layer, IPL) erfolgt schließlich die Umschaltung auf die darunterliegenden Ganglienzellen (ganglion cell layer, GCL). Die Axone der Ganglienzellen treten an der Papille als optischer Nerv (nervus opticus) aus dem Auge aus. Müller-Gliazellen durchziehen alle Schichten der Retina.

Licht durchdringt somit zuerst die Hornhaut, die Linse, den Glaskörper, die Schicht der sekundären Neuronen der Retina und die Kernschicht der Photorezeptoren, bis es an die Außensegmente der Photorezeptoren, den Ort der Phototransduktion, gelangt.

Für die große Zahl membranständiger Photopigmente ist eine große Membranfläche der Außensegmente nötig. Bei den Zapfen ist die Plasmamembran der Außensegmente in zahlreiche Einstülpungen gefaltet, während die Stäbchen-Außensegmente sogenannte „Disks“ enthalten, frei aufeinanderliegende Scheiben, in deren Membran die Photopigmente eingelagert sind.

1.2 Skotopisches und photopisches System

Die Retina besitzt zwei Arten von Photorezeptoren, die Stäbchen und die Zapfen.

Das skotopische System (Stäbchen-Sehzellen und nachgeschaltete Neuronen) ist bereits bei schwachem Dämmerlicht aktiv, da es in der Lage ist, einzelne Photonen zu detektieren. Die Stäbchen besitzen einen weit höheren Sehpigmentanteil als Zapfen und zeigen eine langsamere Lichtantwort, so daß alle Signale innerhalb von 100ms in einer Lichtantwort zusammenfallen. Auch sind viele Stäbchensynapsen mit einer Bipolarzelle verschaltet. Die räumliche und zeitliche Auflösung des skotopischen Systems ist somit gering, die Empfindlichkeit jedoch sehr hoch.

Die Zapfen-Sehzellen (photopisches System) besitzen weniger Sehpigment, benötigen also eine größere Zahl an Photonen, um aktiviert zu werden, und generieren schneller eine Lichtantwort als Stäbchen. So können sie ein Flimmern von 55Hz noch als getrennte Lichtsignale detektieren. Auch projizieren nur ein oder wenige Zapfen auf eine Bipolarzelle. Die Zapfen ermöglichen somit bei Tageslicht eine große Sehschärfe.

Unterschiede zwischen Stäbchen und Zapfen finden sich auch auf molekularer Ebene in verschiedenen Proteinen. Eine zentrale Bedeutung haben hier die Sehpigmente. Sehpigmente bestehen aus einem kleinen Chromophor, dem 11-*cis*-Retinal, das eine Schiff'sche Base mit einem membranständigen Protein bildet. Der Proteinanteil bestimmt das Absorptionsmaximum (A_{\max}) des gesamten Pigments. Stäbchen enthalten ausschließlich Rhodopsin mit einem A_{\max} von 493nm (humanes Rhodopsin). Zapfen hingegen besitzen verschiedene Sehpigmente, so findet man beim Menschen ein kurzwellenlängensensitives (426nm, blue cones), ein mittelwellenlängensensitives (530nm, green cones) und ein langwellenlängensensitives (552 bzw. 557nm, red cones) Opsin (Nathans, 1992). Die Zapfen ermöglichen somit die Unterscheidung von Farben. Mäuse sind im Gegensatz zu Primaten Dichromaten, sie besitzen nur kurz- und mittelwellenlängensensitive Zapfenopsine (SWS bzw. MWS).

1.3 Signaltransduktion in den Photorezeptoren

Das Prinzip der Phototransduktion beruht auf der Umsetzung eines Lichtreizes in eine Änderung der intrazellulären cGMP-Konzentration, welche in einem zweiten Schritt das Membranpotential des Photorezeptors verändert und so die Neurotransmitterfreisetzung an den Synapsen der Photorezeptoren moduliert (Abbildung 2).

Im Dunkelzustand erfolgt in den Außensegmenten der Photorezeptoren die permanente Synthese von cGMP durch eine tonisch aktive Guanylatzyklase (GC-E). Die hohe cGMP-Konzentration hält die zyklonukleotid-aktivierten Ionenkanäle in der Membran der Photorezeptoren offen. Der daraus resultierende $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstrom führt zu einer anhaltenden Depolarisation der Membran auf etwa -40mV . Gegengerichtet ist ein K^+ -Auswärtsstrom im Innensegment der Photorezeptoren. Die Depolarisation führt zu einer tonischen Glutamat-Freisetzung an den Synapsen, über die die Photorezeptoren mit den sekundären Neuronen verschaltet sind.

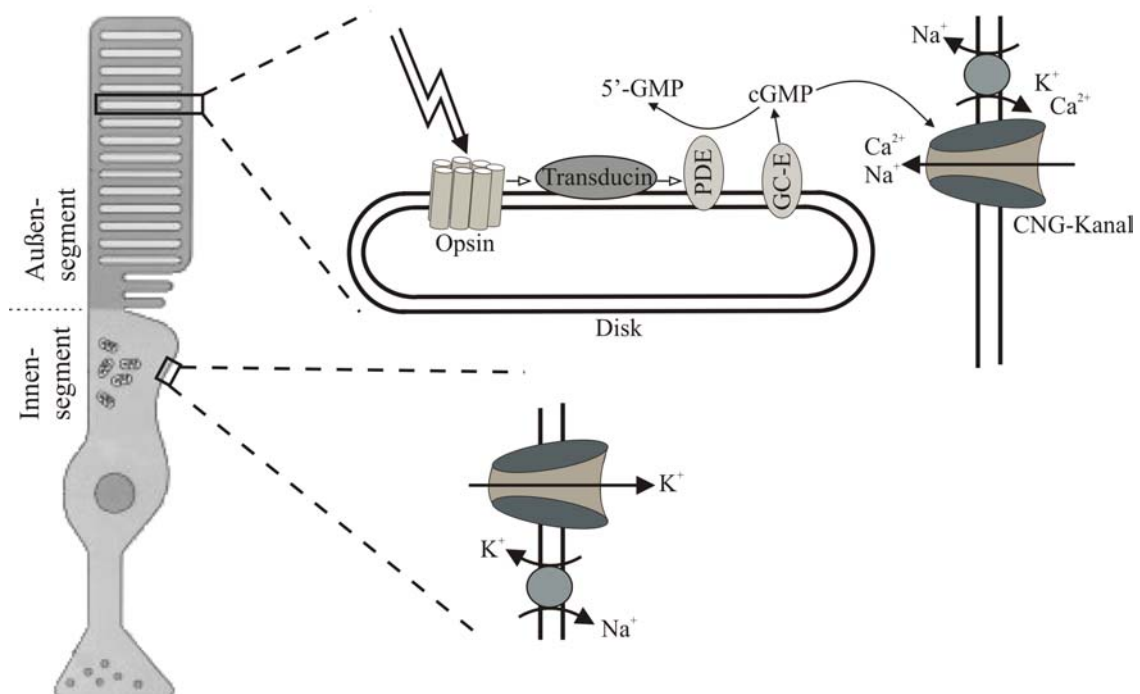


Abbildung 2: schematische Darstellung der Phototransduktion

Das nach Absorption eines Photons in seiner Konformation veränderte Opsin aktiviert das G-Protein Transducin. Dieses wiederum aktiviert die Phosphodiesterase (PDE), die cGMP spaltet. Der erniedrigte cGMP-Spiegel bewirkt eine Schließung des CNG-Kanals. Unverminderter K^+ -Ausstrom im Innensegment bewirkt eine Hyperpolarisation des Photorezeptors auf das Equilibriumpotential von K^+ (-70mV).

Absorbiert ein Opsin ein Photon (Abbildung 2), so kommt es initial zu einer Isomerisierung des 11-*cis*-Retinals zum all-*trans*-Retinal. Die Folge ist eine Konformationsänderung des gesamten Sehpigments zum Metarhodopsin II, durch das ein G-Protein, das Transducin, aktiviert wird. Transducin aktiviert eine Phosphodiesterase, die cGMP zu GMP spaltet und so die cGMP-Konzentration in den Photorezeptoren erniedrigt. Die CNG-Kanäle, die im Dunkeln durch die hohe cGMP-Konzentration offen gehalten werden, schließen, und es kommt aufgrund des andauernden K^+ -Ausstroms zu einer Hyperpolarisation der Zelle auf -70mV (Kandel et al., 2000).

Die Hyperpolarisation der Photorezeptoren führt zu einer verminderten Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat an den Synapsen. Eine verminderte Glutamatausschüttung bewirkt je nach Bipolarzelltyp eine Depolarisation oder Hyperpolarisation der Bipolarzellen bzw. auch der anderen Sekundärneuronen, die dann über die Ganglienzellen als Aktionspotentiale ins Gehirn weitergeleitet werden.

Die Sehkaskade ist sehr effektiv, da durch die Absorption eines Photons bis zu 150 Moleküle PDE pro Sekunde aktiviert werden, die wiederum je 2000 Moleküle cGMP pro Sekunde spalten können (Leskov et al., 2000).

Die Rückkehr der Zelle in den Dunkelzustand wird über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert. Im Ruhezustand wird die Ca^{2+} -Konzentration in den Außensegmenten durch den Ca^{2+} -Einstrom durch die CNG-Kanäle sowie einen entgegengerichteten $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - K^+ -Austauscher bei 350 – 500 nM im Gleichgewicht gehalten. Sinkt durch die Schließung der CNG-Kanäle die Ca^{2+} -Konzentration auf $<100\text{nM}$, wird die GC-E-abhängige cGMP-Synthese stimuliert. Dies geschieht durch Proteine namens GCAP (guanylyl cyclase activating protein). GCAP hat im inaktiven Zustand vier Ca^{2+} -Ionen gebunden. Durch die Entfernung des Ca^{2+} wird GCAP in seine aktive Form überführt, die die Guanylatzyklase stimuliert. Die erhöhte cGMP-Konzentration führt zur Öffnung der CNG-Kanäle, das Membranpotential erreicht wieder -40mV und der Photorezeptor ist wieder für eine Aktivierung durch Licht bereit. Über verschiedene Rückkopplungsschritte, die ebenfalls über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration vermittelt werden, ist eine Adaptation der Photorezeptoren möglich, so daß der Sehprozeß bei Lichtstärken, die sich um den Faktor 10^{11} unterscheiden, ablaufen kann (Pugh et al., 1999).

2 Das olfaktorische Epithel

Die Wahrnehmung von Duftstoffen findet im olfaktorischen Epithel statt, das im hinteren Teil der Nasenhöhle beim Menschen eine Fläche von etwa 5cm^2 auskleidet (Kandel et al., 2000). Die Duftstoffe werden von spezialisierten Neuronen, den olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN, olfactory sensory neurons, OSNs, Abbildung 3) erkannt. Sie liegen eingebettet zwischen gliaähnlichen Stützzellen (supporting cells, SC).

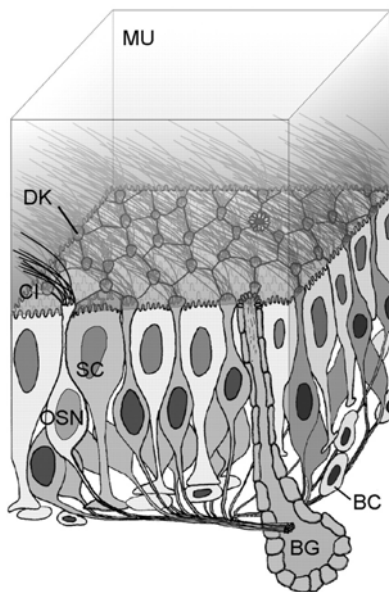


Abbildung 3: das olfaktorische Epithel

OSN: Olfactory sensory neurons, olfaktorische Rezeptorneuronen. SC: supporting cells (Stützzellen). Cl: Zilien. BC: Basalzellen. BG: Bowman's Gland, Bowmansche Drüsenzelle. DK: Dendritic Knob, Dendritenköpfchen. MU: Mukus. (Abbildung aus Kaneko et al. (2004)).

Die ORN nehmen eine Sonderstellung unter Neuronen ein, da sie nur eine Lebensdauer von 30 bis 60 Tagen besitzen und dann aus den basalen Stammzellen (basal cells, BC) wieder neu gebildet werden. Die Somata der ORN liegen in der Mitte des Epithels. Ein einziger Dendrit

führt an die Oberfläche, wo er in einem kleinen Köpfchen endet, dem sogenannten dendritic knob (DK). Von diesem Köpfchen gehen feine Zilien (Cl) mit einem Durchmesser von $<200\text{nm}$ aus, in denen die Perzeption der Duftstoffe stattfindet. Über dem olfaktorischen Epithel liegt Mukus (MU), der von spezialisierten Drüsenzellen (Bowman's Glands, BG) produziert wird. Die Axone der ORN führen aus dem Epithel heraus in den olfaktorischen Bulbus, in dem die weitere Verschaltung erfolgt.

Ein Duftmolekül bindet an einen spezifischen olfaktorischen Rezeptor (OR) (Abbildung 4). Während beim Menschen nur etwa 350 verschiedene olfaktorische Rezeptoren bekannt sind, besitzt die Maus 1000 bis 1300 ORs (Buck und Axel, 1991; Mombaerts, 1999; Zhang und Firestein, 2002). Der Rezeptor ist an das G-Protein G_{olf} gekoppelt und aktiviert hierüber die Adenylatzyklase III (ACIII). Diese synthetisiert cAMP, das den olfaktorischen CNG-Kanal öffnet. Der Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} depolarisiert die Membran bereits leicht, doch wird diese Depolarisation noch verstärkt durch das Öffnen von Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanälen (ClC). Da in den Zilien olfaktorischer Rezeptorneuronen durch aktive Akkumulation eine hohe intrazelluläre Cl^- -Konzentration vorliegt, fließt Cl^- aus der Zelle heraus und depolarisiert die Membran (Kaneko et al., 2004). Die Depolarisation, die zu 90% von Cl^- getragen wird, löst in den Axonen der Neuronen Aktionspotentiale aus, die weiter zum olfaktorischen Bulbus geleitet werden. Der Abbau von cAMP erfolgt durch eine Ca/CaM-abhängige Phosphodiesterase (PDE1C2).

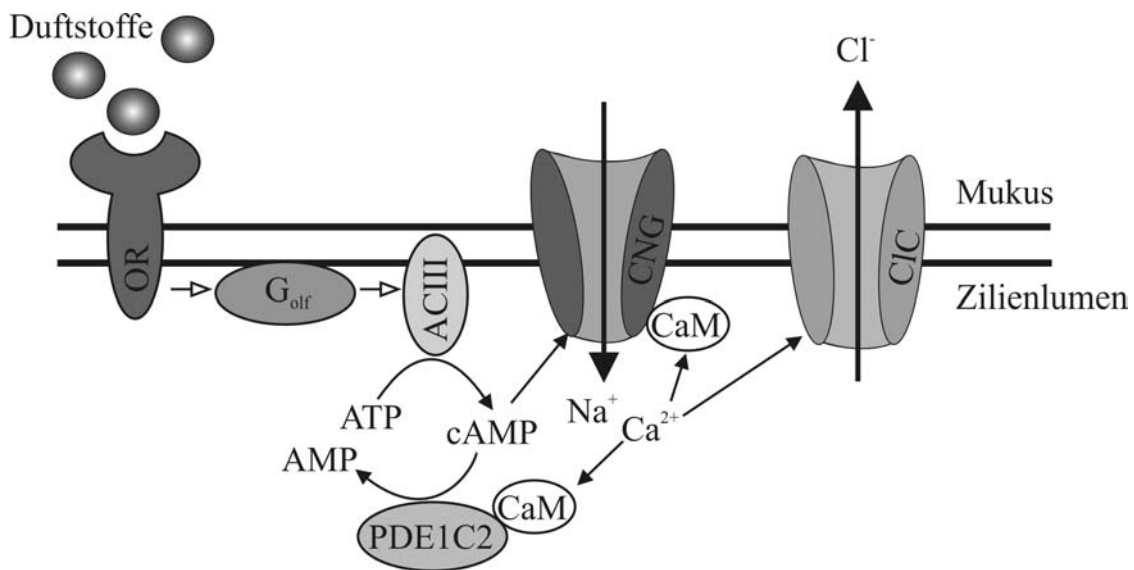


Abbildung 4: Signaltransduktion in den Zilien olfaktorischer Neuronen

Duftstoffe aktivieren einen olfaktorischen Rezeptor (OR). Dieser initialisiert über das G-Protein G_{olf} die Adenylatzyklase-abhängige (ACIII) Synthese von cAMP. Durch cAMP wird der olfaktorische CNG-Kanal geöffnet, Ca^{2+} und Na^+ strömen ein. Ca^{2+} ist zum einen über Calcium-Calmodulin (Ca/CaM) an der Adaptation der olfaktorischen Rezeptorneuronen beteiligt, zum anderen aktiviert es calciumabhängige Chloridkanäle (ClC), durch die Cl^- ausströmt und die Zelle depolarisiert. cAMP wird schließlich durch eine Ca/CaM-abhängige Phosphodiesterase (PDE1C2) zu AMP gespalten.

Jedes ORN exprimiert nur einen der olfaktorischen Rezeptoren, wird also spezifisch von nur einem Duftmolekül erregt (Mombaerts, 2001). Im olfaktorischen Bulbus enden die Axone aller ORN, die denselben Rezeptor exprimieren, in einer kleinen Gruppe von Glomeruli, über die das gebündelte Signal weiter auf zentrale Nervenbahnen umgeschaltet wird.

Auch in der olfaktorischen Signaltransduktion existieren effektive Rückkopplungsmechanismen, die zur Adaptation der Neuronen führen (Zufall und Leinders-Zufall, 2000). Eine wichtige Rolle spielt dabei die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, die durch Öffnen des CNG-Kanals ansteigt (Menini, 1999). Der wichtigste Mechanismus dürfte die Desensitivierung des CNG-Kanals für cAMP durch Calcium-Calmodulin sein (Kurahashi und Menini, 1997).

In einer Subpopulation von olfaktorischen Rezeptorneuronen wurde eine alternative Transduktionskaskade beschrieben. Diese Neuronen, die alle auf circa 9 Glomeruli am hinteren Rand des olfaktorischen Bulbus projizieren, den sogenannten necklace glomeruli, exprimieren kein G_{olf} , ACIII, CNGA2, CNGA4, CNGB1 und PDE1C2. Stattdessen wurde in ihnen eine membranständige Rezeptor-Guanylatzyklase (GC-D), eine cGMP-stimulierte Phosphodiesterase (PDE2) sowie die Zapfenkanal-Untereinheit CNGA3 gefunden (Fülle et al., 1995; Juilfs et al., 1997; Meyer et al., 2000; Meyer et al., 2000). Die Funktion dieser Subpopulation von Neuronen ist noch nicht bekannt.

3 CNG-Kanäle

Zyklonukleotid-aktivierte Kanäle (cyclic nucleotide gated channels, CNG-Kanäle) sind neben den zyklonukleotid-abhängigen Proteinkinasen und Phosphodiesterasen sowie den cAMP-aktivierten Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren die vierte große Klasse von Rezeptoren, die durch Bindung von cAMP bzw. cGMP aktiviert werden.

Strukturell gehören sie zu einer Superfamilie von Ionenkanälen, die 6 Transmembransegmente besitzen. Die ionenleitende Pore sitzt zwischen den Transmembransegmenten 5 und 6, N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Andere wichtige Mitglieder dieser Superfamilie sind verschiedene Arten von spannungsgesteuerten Ionenkanälen oder die Familie der Trp-Kanäle. In Abbildung 5A ist die Struktur einer CNG-Kanal-Untereinheit schematisch dargestellt.

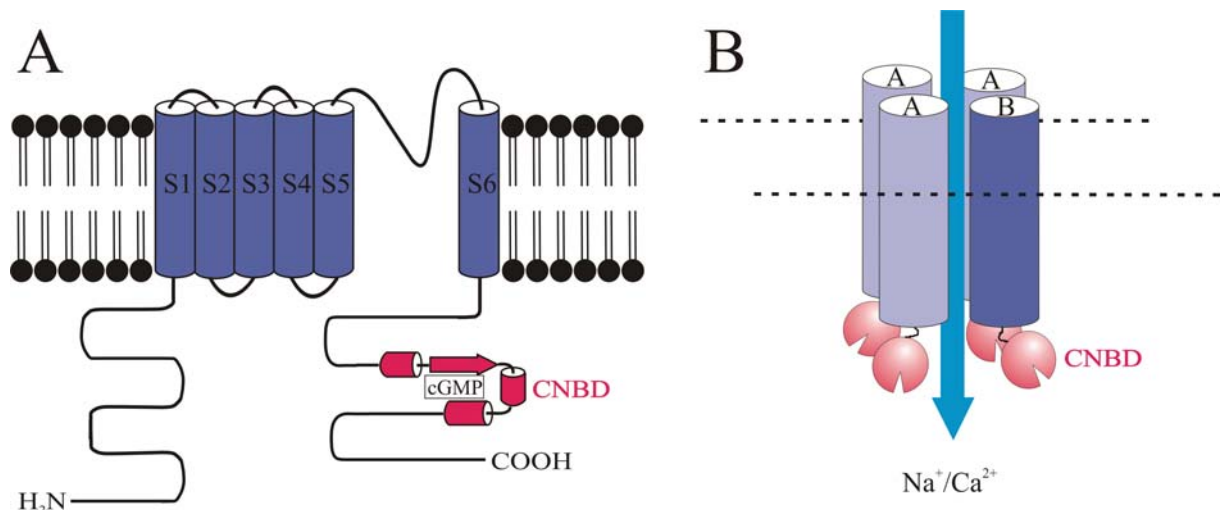


Abbildung 5: Modell eines CNG-Kanals

A) Schematische Struktur der CNGB1-Untereinheit. S1 – S6: Transmembransegmente 1 bis 6. CNBD: Zyklonukleotid-Bindungsdomäne. B) Vereinfachtes Kanalmodell aus drei A- und einer B-Untereinheit.

C-terminal besitzen alle CNG-Untereinheiten eine Bindungstasche für zyklische Nukleotide (CNBD, cyclic nucleotide binding domain) (Kaupp et al., 1989). Diese Bindungstasche ist über viele Klassen zyklonukleotid-bindender Proteine konserviert. So besitzen zum Beispiel

HCN-Kanäle (hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated channels) eine hoch homologe CNBD, deren Kristallstruktur vor kurzem aufgeklärt wurde (Zagotta et al., 2003). Während die retinalen CNG-Kanäle ausschließlich durch cGMP aktiviert werden, ist der olfaktorische CNG-Kanal für cAMP und cGMP gleichermaßen sensitiv. Physiologischer second messenger im olfaktorischen Epithel ist jedoch cAMP (III.2).

CNG-Kanäle sind nichtselektive Kationenkanäle, die mono- und divalente Kationen leiten. *In vivo* wird der Strom vor allem durch Na^+ getragen, sowie je nach Zelltyp zu unterschiedlichem Anteil durch Ca^{2+} . Beim Stäbchen-CNG-Kanal liegt der Ca^{2+} -Anteil je nach Spezies bei 14-20%, beim CNG-Kanal der Zapfen bei etwa 33% (Ohyama et al., 2000). Gleichzeitig blockiert Ca^{2+} über eine Bindungsstelle in der Pore spannungsabhängig den Einstrom monovalenter Kationen (Dzeja et al., 1999).

Die Funktion von CNG-Kanälen im Seh- und Riechsystem ist dagegen hinreichend aufgeklärt (III.1.3, III.2). CNG-Kanäle wurden jedoch in einer Vielzahl weiterer Gewebe nachgewiesen, so im Hoden (Biel et al., 1994), in Spermien (Wiesner et al., 1998), in der Niere (Biel et al., 1994), in der Aorta (Biel et al., 1993), im Herz (Ruiz et al., 1996), im Innenohr (Drescher et al., 2002), in den Geschmacksknospen (Misaka et al., 1997), im Skelettmuskel (Santy und Guidotti, 1997), in der Epiphyse (Sautter et al., 1997), sowie in verschiedenen Hirnregionen (Kingston et al., 1996; Bradley et al., 1997; Strijbos et al., 1999).

Sowohl die physiologische Relevanz als auch die Funktion der CNG-Kanäle in diesen Geweben ist derzeit noch nicht bekannt.

Es wurden 6 Gene für CNG-Kanal-Untereinheiten kloniert und charakterisiert (Kaupp et al., 1989; Dhallan et al., 1990; Ludwig et al., 1990; Chen et al., 1993; Biel et al., 1994; Bradley et al., 1994; Körschen et al., 1995; Sautter et al., 1998; Gerstner et al., 2000). Phylogenetisch werden die bekannten Kanäle in vier A-Untereinheiten und zwei B-Untereinheiten unterteilt (Abbildung 6).

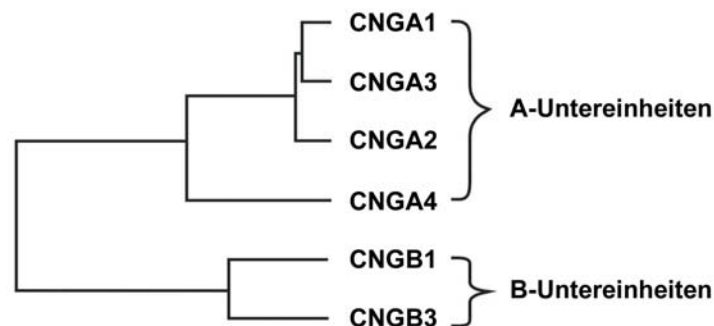


Abbildung 6: phylogenetischer Stammbaum der CNG-Kanal-Untereinheiten

CNGB2 existiert nach der neuen Nomenklatur nicht (Bradley et al., 2001).

Native CNG-Kanäle sind Heterotetramere aus A- und B-Untereinheiten (Liu et al., 1996), die je nach Zelltyp unterschiedlich zusammengesetzt sind. Die Stöchiometrie der Kanäle wurde für einige Zelltypen vor kurzem aufgeklärt. So besteht der CNG-Kanal der Stäbchen aus drei CNGA1- und einer CNGB1a-Untereinheit (Weitz et al., 2002; Zheng et al., 2002; Zhong et al., 2002), der CNG-Kanal der Zapfen aus zwei CNGA3- und zwei CNGB3-Untereinheiten (Peng et al., 2004) und der olfaktorische CNG-Kanal aus zwei CNGA2-, einer CNGA4- und einer CNGB1b-Untereinheit (Zheng und Zagotta, 2004). Abbildung 5B zeigt beispielhaft eine schematische Darstellung der Untereinheiten des Stäbchen-CNG-Kanals in der Zellmembran. In heterologen Expressionssystemen (HEK-Zellen, *Xenopus* Oozyten) gleichen die Ströme durch Heteromere aus den entsprechenden A- und B-Untereinheiten den nativen Strömen. Die heterologe Expression von A-Untereinheiten alleine führt zu funktionellen homomeren

Kanälen. Sie unterscheiden sich jedoch in verschiedenen elektrophysiologischen Eigenschaften von nativen Kanälen. So fehlt ihnen die von nativen Photorezeptorkanälen bekannte Fähigkeit, sehr schnell zu öffnen und zu schließen, das sogenannte „single channel flickering“ (Chen et al., 1993). Auch geht die Blockierbarkeit der Kanäle durch *L-cis*-Diltiazem verloren (Körschen et al., 1995).

CNGB1 trägt N-terminal, kurz vor dem ersten Transmembransegment, eine Bindungsstelle für Calcium-Calmodulin (Ca/CaM) (Weitz et al., 1998). Die Bindung von Calcium-Calmodulin reduziert die Affinität eines heterologen Kanals für zyklische Nukleotide. Dieser Feedback-Mechanismus dient der Adaption von Photorezeptoren und olfaktorischen Neuronen (Hsu und Molday, 1994; Bradley et al., 2001; Bradley et al., 2004) und geht bei Expression homomerer Kanäle aus A-Untereinheiten verloren. Der spannungsabhängige Ca^{2+} -Block von CNG-Kanälen dagegen ist bei homologer Expression der A-Untereinheiten stärker ausgeprägt (Dzeja et al., 1999). Auch die Ionenselektivität der Kanäle wird, wie der Vergleich aus Zellkulturexperimenten und der Permeabilität der nativen Kanäle zeigt, durch die B-Untereinheiten beeinflusst (Körschen et al., 1995). Die B-Untereinheiten können in heterologen Expressionssystemen nicht untersucht werden, da sie keine homomeren Kanäle ausbilden. Sie werden auch als „modulatorische Untereinheiten“ bezeichnet, da viele elektrophysiologischen Charakteristika der CNG-Kanäle nur bei Koexpression der A- und B-Untereinheiten vorhanden sind. Inwieweit diese Eigenschaften, die erst bei Bildung von Heteromeren auftreten, physiologisch relevant sind und welche Funktion sie haben, ist noch nicht bekannt.

4 CNGB1

In der vorliegenden Arbeit wurde die physiologische Bedeutung der CNGB1-Untereinheit untersucht.

Der komplexe CNGB1-Locus liegt beim Menschen auf Chromosom 16, bei der Maus auf Chromosom 8. Von der Arbeitsgruppe um S. J. Pittler wurde der humane CNGB1-Locus kurz vor Beginn der vorliegenden Arbeit aufgeklärt (Ardell et al., 2000). Er besteht aus 33 Exons (Abbildung 7), von denen durch unterschiedliches Spleißen mindestens 4 funktionelle Proteine gebildet werden. Von CNGB1 sind 2 Spleißvarianten gut charakterisiert: CNGB1a, die B-Untereinheit des Stäbchenkanals, entstammt den Exons 1 – 33, während die B-Untereinheit des olfaktorischen Kanals, CNGB1b, erst ab dem alternativen Exon 18a translatiert wird. Beiden CNGB1-Proteinen ist somit die unter III.3 beschriebene Struktur mit einer Ca/CaM-Bindungsstelle, 6 Transmembransegmenten, und einer Bindungstasche für zyklische Nukleotide (CNBD) gemeinsam.

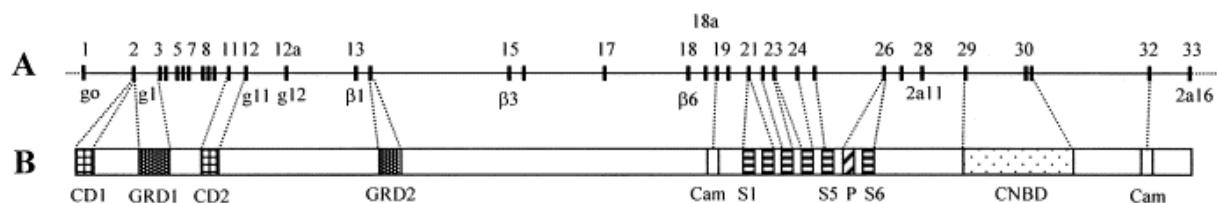


Abbildung 7: humaner CNGB1-Locus

A) Exon-Intron-Struktur des humanen CNGB1-Gens. B) Humanes CNGB1-Protein. Exons 1 - 16 codieren für den GARP-Anteil des Proteins, Exons 17 - 33 für den kanalbildenden Proteinanteil. Abbildung aus Ardell et al. (2000).

CNGB1a und CNGB1b unterscheiden sich lediglich in ihrem intrazellulären N-Terminus. Der lange Aminoterminus von CNGB1a besteht aus einer glutaminsäurereichen Sequenz (glutamic acid rich protein, GARP). Die Funktion des langen N-Terminus von CNGB1 in der Retina ist noch nicht bekannt. Während die Ergebnisse von Körschen et al. (1999) eine Interaktion zwischen der N-terminalen GARP-Domäne von CNGB1 mit der retinalen Guanylatzyklase, der Phosphodiesterase und dem ABCR-Transporter vermuten lassen, haben Poetsch et al. eine Bindung an Peripherin-2, einem Protein in der Disk-Membran beschrieben (Poetsch et al., 2001). Postuliert wird, daß die N-terminale GARP-Domäne von CNGB1 über Protein-Interaktionen an der Verankerung der Disks mit der Zellmembran der Außensegmente beteiligt ist.

Der GARP-haltige Aminoterminus von CNGB1 wird auch als eigenes Protein zytosolisch exprimiert. Es wurden zwei Spleißvarianten dieses sogenannten löslichen GARP beschrieben, das die glutaminsäurereiche Sequenz enthaltende „full length GARP“ (fGARP oder GARP1) sowie ein trunkiertes GARP (tGARP oder GARP2), das den N-Terminus des fGARP ohne die glutaminsäurereiche Sequenz darstellt (Molday und Molday, 1998). Die Funktion des löslichen GARP ist noch nicht geklärt. Allen GARP-Varianten gemeinsam sind vier prolinreiche Abschnitte im C-Terminus, die als Regionen für Protein-Interaktionen in Frage kommen (Körschen et al., 1999). GARP1 und GARP2 konnten immunhistochemisch in den Disks der Stäbchen lokalisiert werden, wo sie an periphere Disk-Proteine angelagert sind (Körschen et al., 1999).

5 Zielsetzung der Arbeit

A-Untereinheiten zyklonukleotid-aktivierter Kanäle alleine sowie Heteromere aus A- und B-Untereinheiten können in heterologen Expressionssystemen elektrophysiologisch charakterisiert werden. Aus diesen Untersuchungen ist bekannt, daß sich die Eigenschaften homomerer Kanäle aus A-Untereinheiten von nativen Strömen unterscheiden, bei Koexpression mit den entsprechenden B-Untereinheiten jedoch Kanäle entstehen, die nativen Kanälen gleichen. Die B-Untereinheiten sind in Zellkultursystemen nicht in der Lage, funktionelle Kanäle zu bilden.

Physiologisch sind nur heteromere CNG-Kanäle bekannt. Unklar ist jedoch bis jetzt die Funktion der B-Untereinheiten für die Bildung der Kanäle sowie die physiologische Relevanz der elektrophysiologischen Eigenschaften, die sie heteromeren Kanälen verleihen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vivo* Funktion von CNGB-Untereinheiten, speziell der CNGB1-Untereinheit untersucht. Mittels Gene Targeting wurde eine Maus generiert, die keine der Spleißvarianten von CNGB1 funktionell exprimiert.

Bei der Untersuchung des Phänotyps wurde der Schwerpunkt zunächst auf die Retina gelegt, da die zentrale Rolle von CNG-Kanälen hier bekannt ist.

IV. Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien und Lösungen molekularbiologischer Qualität von den Firmen Roth und Merck bezogen. Zur Sterilfiltration wurden Qualilab[®] Spritzenvorsatzfilter der Firma Merck (Art.Nr. 5122110), sowie verschiedene Kanülen der Firma Terumo eingesetzt. Kunststoffmaterialien wurden von der Firma Sarstaedt bezogen. Das Wasser zur Herstellung aller Lösungen wurde mittels einer EASYpure[®] UV/UF-Anlage (D8612-33, WeteA Wilhelm Werner GmbH) entionisiert und sterilfilteriert.

Bei gängigen Laborarbeiten wurden Zentrifugungen der Firma Heraeus (Biofuge primo, Biofuge fresco, Laborfuge 200) sowie Tomy (Capsulefuge, PMC-060) verwendet.

Für die gentechnologischen Arbeiten lag eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern vom 19.01.00 vor (821-8763.14.469/30).

1 Synthese von DNA-Fragmenten: PCR

1.1 Allgemein

Die PCR (polymerase chain reaction) ist ein Standardverfahren zur selektiven Amplifizierung definierter DNA-Sequenzen. Dazu sind zwei Oligonukleotide erforderlich („Primer“), die im zu amplifizierenden Bereich komplementär zum 3'-Ende jedes Stranges der Doppelhelix sind. In drei Schritten wird zunächst der Doppelstrang aufgeschmolzen (Denaturierung, 94°C), dann erfolgt die Anlagerung der Primer (Annealing, 45-60°C, abhängig von Länge und GC-Gehalt der Primer) und in einem dritten Schritt die Neusynthese eines Gegenstrangs zu jedem Einzelstrang, ausgehend von den Primern, durch eine Polymerase (68-72°C, je nach Polymerase).

In der vorliegenden Arbeit wurde standardmäßig die *TaqI*-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) von Promega verwendet (Kat.Nr. M2665). Für PCR-Fragmente, die im Rahmen von Klonierungen verwendet wurden, wurde die Pfu-Polymerase von Stratagene eingesetzt (aus *Pyrococcus furiosus*, Kat.Nr. 600154-81), da sie eine „proofreading“-Funktion besitzt, also eine geringere Fehlerrate aufweist. Die PCR wurde in einem T1 Thermocycler oder einem Personal Cycler von Biometra[®] durchgeführt.

Lösungen:

10x *Taq*-Puffer (Promega):

TRIS/HCl	100mM
KCl	500mM
Triton [®] X-100	1%

10x Cloned *Pfu*-Puffer (Stratagene):

TRIS/HCl	200mM
MgSO ₄	20mM
KCl	100mM
(NH ₄)SO ₄	100mM
Triton [®] X-100	1%
BSA (nukleasefrei)	1mg/ml

dNTP-Mix je 1,25mM (Roth):

dGTP100mM	10µl
dATP100mM	10µl
dTTP100mM	10µl
dCTP100mM	10µl
H ₂ O	ad 800µl

Reaktionsansatz:

Primer forward (10pmol/μl)	2,5μl
Primer reverse (10pmol/μl)	2,5μl
10x Puffer	5,0μl
dNTP-Mix 1,25mM	8,0μl
Polymerase	0,5μl
DNA	0,5 – 5μl
H ₂ O	ad 50μl

Zur Genotypisierung und für RT-PCRs wurde ein halber Ansatz (25μl) pipettiert.

Als Primer wurden 21- bis 23mere Sequenzen ausgewählt und die Oligonukleotide von der Firma MWG bezogen. Für den Gebrauch wurden Verdünnungen von 10pmol/μl hergestellt.

Standardbedingungen:

initiale Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	variabel	30 sec	25 – 40 Zyklen
Elongation	72°C	variabel	
finale Polymerisation	72°C	4 min	

Die Annealing-Temperatur wurde je nach der Schmelztemperatur des Primerpaares variiert, die Elongationszeit je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments ausgewählt (*Taq*-Polymerase: 1000 bp/min; *Pfu*-Polymerase: 500 bp/min).

Um die Bildung von Artefakten und Nebenprodukten zu reduzieren wurden teilweise vor das Standard-Protokoll 10 Zyklen mit einer 10°C höheren Annealing-Temperatur gesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Synthese von DNA-Strängen für Klonierungen, zur Herstellung von Sonden für Southern Blot Analysen, zum Nachweis von Transkripten (RT-PCR) sowie zur Genotypisierung und Geschlechtsbestimmung der Mäuse verwendet. Im Anhang sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sowie die Reaktionsbedingungen für standardisierte PCRs tabellarisch aufgelistet (VIII.1 und VIII.2).

1.2 Long Template PCR

Zur Synthese von DNA-Fragmenten größer als 2000bp wurde mit dem Expand Long Template PCR System von Roche gearbeitet (Kat.Nr 1 681 834).

Durch Verwendung eines Gemischs aus *Taq* und einer proofreading polymerase können Fragmente bis zu 27kb aus genomischer DNA und 40kb aus Plasmid-DNA amplifiziert werden. Als Puffer wurde 10x Puffer 1 mit 17,5 mM MgCl₂ verwendet.

Reaktionsansatz:

Mix 1		Mix 2	
Primer forward (10pmol/μl)	1,5μl	10x Puffer 1	5μl
Primer reverse (10pmol/μl)	1,5μl	Enzym-Mix	0,75μl
dNTP-Mix 1,25mM	14μl	H ₂ O	ad 25μl
DNA	0,1μg		
H ₂ O	ad 25μl		

Die beiden Mixe wurden unmittelbar vor dem Start der Reaktion vereinigt.

Standardbedingungen:

95°C	2 min	
94°C	30 sec	
60°C	30 sec	10 Zyklen
68°C	4 min	
94°C	30 sec	
54°C	30 sec	25 Zyklen
68°C	4 min 10 sec	
	+10 sec pro Zyklus	
68°C	5 min	

1.3 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde eine Multiplex-PCR entwickelt, mit der alle drei möglichen Genotypen (Wildtyp, Knockout, gefloxt) erfasst werden können (V.6.2). Die Gewebeprobe wurde dazu wie unter IV.6.1.1 beschrieben lysiert.

Reaktionsansatz:

H ₂ O	11,5µl
dNTP-Mix 1,25mM	4,0µl
10x Taq-Puffer	2,5µl
PSHV8F (10pmol/µl)	1,25µl
PSHV6bR (10pmol/µl)	1,25µl
PSHV9R (10pmol/µl)	1,25µl
DNA	3µl
Taq-Polymerase	0,25µl

Reaktionsbedingungen:

94°C	3 min	
94°C	40 sec	
59°C	30 sec	30 Zyklen
72°C	30sec	
72°C	5 min	

10µl des Ansatzes wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Es entstehen Fragmente mit 415 (KO), 480 (WT) und 593 (gefloxt) bp Länge.

1.4 Geschlechtsbestimmung

Lavrovsky et al. haben einen PCR-Assay zur Bestimmung des Geschlechts von Mäusen aus Gewebeprobe entwickelt (Lavrovsky et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde der Assay verwendet um das Geschlecht von neugeborenen Mäusen zu bestimmen, die in der ersten postnatalen Woche starben.

Die Primer detektieren auf dem Y-Chromosom das SRY-Gen (Sex determining region of the Y), das für die Differenzierung der Hoden von Bedeutung ist. Als house-keeping gene wurden Primer für TSH β , der β -Untereinheit des Thyrotropins, verwendet.

Somit wurde bei Männchen ein 249bp-Fragment aus dem SRY-Gen und ein 383bp-Fragment aus dem TSH-Gen amplifiziert, bei Weibchen nur das 383bp-Fragment. (Primer und Reaktionsbedingungen s. VIII.1 und VIII.2)

1.5 RT-PCR

Mittels RT-PCR kann die Expression verschiedener Gene in Wildtyp- und Knockout-Gewebe verglichen werden. Dazu wird aus dem entsprechenden Gewebe, in der vorliegenden Arbeit Retina und olfaktorisches Epithel der Maus, RNA isoliert und die komplementäre cDNA synthetisiert (IV.8). Um die Vergleichbarkeit der cDNA-Chargen zu gewährleisten, wurden für jedes entsprechende Paar WT und KO-cDNA äquivalente Mengen RNA eingesetzt und die cDNA-Synthese parallel durchgeführt.

Aus 0,5µl cDNA wurden spezifische PCR-Fragmente für die CNG-Untereinheiten amplifiziert, mittels PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt und anhand der Bandendicke die Expression der Proteine abgeschätzt. Auch hier wurden die zu vergleichenden Reaktionen parallel (mit dem gleichen Reaktionsmix) behandelt. Als house-keeping gene wurde aus jeder cDNA-Charge ein Fragment der HPRT amplifiziert (Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase). Dieses Protein wird als Enzym des Purinstoffwechsels ubiquitär vergleichbar exprimiert. So kann aus der Dicke der amplifizierten HPRT-Bande die Qualität der cDNA abgeschätzt beziehungsweise Einzeldaten auf die HPRT normiert werden.

Die verwendeten Primerpaare sowie die jeweiligen Reaktionsbedingungen sind im Anhang unter VIII.1 beziehungsweise VIII.2 aufgelistet. Die Primer wurden so gewählt, daß das PCR-Produkt jeweils eine Introngrenze überspannt, um die Amplifikation genomischer DNA auszuschließen. Die Zyklenzahl wurde wenn möglich so gewählt, daß nichtgesättigte Produkte entstanden, also noch linear amplifiziert wurde, um neben qualitativen Aussagen auch die Quantität der Expression abschätzen zu können.

1.6 Einführung von Mutationen durch Overlap-PCR

Bei einer Overlap-PCR werden zwei überlappende DNA-Stränge als Matrize eingesetzt.

Eine Overlap-PCR wurde durchgeführt, um im Expressionsvektor für CNGA2 aus dem Kaninchen (Biel et al., 1993) das Epitop, gegen das der CNGA2-Antikörper (Alomone, gegen Maus) gerichtet ist, in die entsprechende Maus-Sequenz zu mutieren. Dazu war der Austausch von 3 Aminosäuren notwendig (Abbildung 8).

Über die zu mutierende Sequenz wurde je ein die Mutation enthaltender Vorwärts- und Rückwärtsprimer gelegt (PSHA2-2R, PSHA2-3F, Abbildung 8). Zunächst wurden die zwei PCR-Fragmente PSHA2-1F bis PSHA2-2R sowie PSHA2-3F bis PSHA2-4R amplifiziert (25 Zyklen, Annealing-Temperatur 57°C). Ein Gemisch der beiden Produkte wurde als Matrize für die Overlap-PCR (PSHA2-1F – PSHA4R, 20 Zyklen, Annealing bei 57°C) eingesetzt. Das resultierende PCR-Stück wurde mit Bsu36I und BlnI geschnitten und in den ebenfalls mit Bsu36I und BlnI geschnittenen Expressionsvektor eingesetzt. Der modifizierte Kanal wurde in HEK293-Zellen exprimiert und daraus die Membranproteine aufgereinigt.

In Western Blot Analysen erkannte der Antikörper von Alomone dennoch nicht die CNGA2-Bande bei ca. 80kDa, obwohl er in immunhistochemischen Experimenten an die erwarteten Strukturen band.

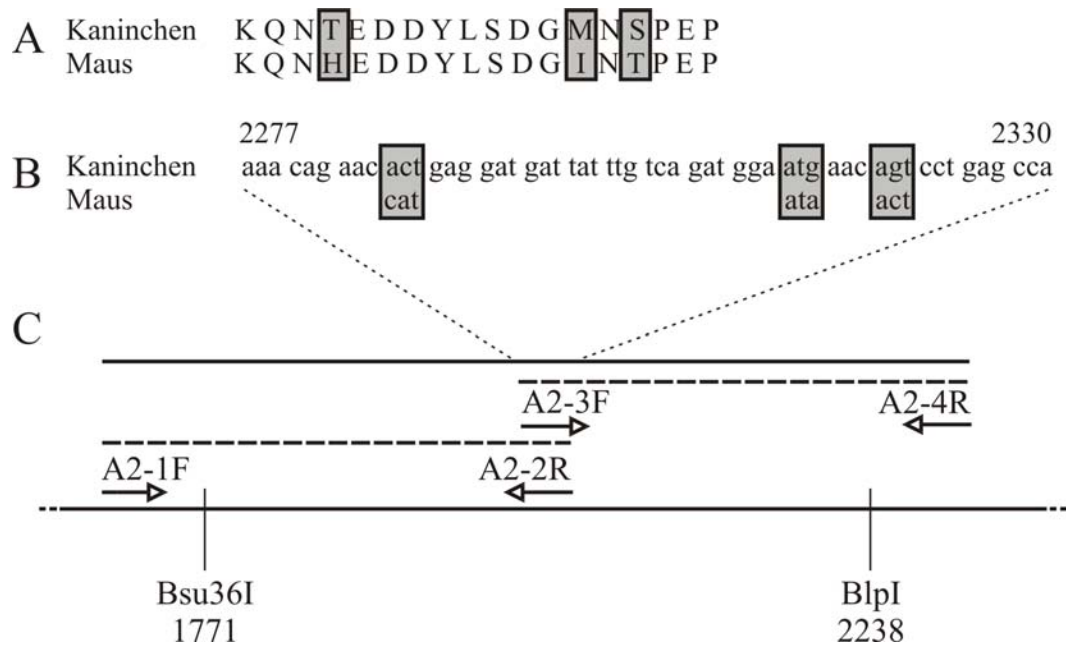


Abbildung 8: Overlap-PCR zur Mutation des CNGA2-Epitops

A) Kaninchen- und Maus-Protein unterscheiden sich im Bereich, gegen den der Antikörper gerichtet ist, nur in 3 Aminosäuren. B) Zur Mutation der Kaninchen- in die Maussequenz ist der Austausch von 4 Basen notwendig. C) PCR-Primer PSHA2-2R und PSHA2-3F enthalten die mutierten Basen. Es wurden zunächst die PCR-Fragmente PSHA2-1F bis PSHA2-2R und PSHA2-3F bis PSHA2-4R amplifiziert (gestrichelte Linien). Ein Gemisch der beiden wurde dann als Matrize für die Overlap-PCR (PSHA2-1F bis PSHA2-4R) eingesetzt. Overlap-PCR-Fragment und Vektor wurden mit Bsu36I und BlnI geschnitten und das die Mutation enthaltende PCR-Stück in den Expressionsvektor ligiert.

2 Auftrennung, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten

2.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten

Da Nukleinsäuren im Alkalischen negativ geladen sind, können sie im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden (Elektrophorese). Zum Größenvergleich wurde ein DNA-Standard aufgetragen (1Kb Ladder, Invitrogen). Dem Auftragspuffer wurden Bromphenolblau und Xylencyanol zugesetzt, um den Verlauf der Elektrophorese zu verfolgen. Mit Ethidiumbromid, einem Interkalator, der bei 302nm (UV-Licht) violett fluoresziert, können die Fragmente visualisiert werden. Die Auswertung erfolgte mit einem Gel Doc 2000 (Biorad).

Lösungen:

10x TBE

TRIS	540g
Borsäure	275g
0,5M EDTA (pH8)	200ml
H ₂ O	ad 5l

Elektrophoresepuffer:

1xTBE (1T 10x TBE + 9T H₂O)

Auftragspuffer (6x Dye):

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18g
0,5M EDTA pH8	24ml
10x TBE	60ml
Bromphenolblau 50µg/ml	3ml
Xylencyanol FF 50µg/ml	3ml
H ₂ O	ad 100ml

Ethidiumbromidlösung:

10mg/ml Lösung in H₂O, Roth

2.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente zwischen 100 und 1000bp wurden meist mittels vertikaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Es wurden 5%ige Gele mit 0,75mm Dicke und 15cm Laufstrecke verwendet. Die Elektrophorese wurde zunächst 10 min bei 100V, dann 50 min bei 260V durchgeführt und das Gel anschließend 5 min in Ethidiumbromidlösung (ca. 0,5µg/ml) gefärbt.

5% Polyacrylamidgel:

Rotiphorese Gel 29:1 (40%)	3,75ml
10x TBE	3ml
H ₂ O	ad 30ml
TEMED	20µl
APS 20%	70µl

2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für Fragmente über 1kb Größe wurden 0,7%ige Agarose-Gele verwendet, sowie teils 2%ige analytische Gele für Fragmente zwischen 250bp und 1000bp. Die Agarose wurde in 1xTBE aufgekocht und Ethidiumbromid (finale Konzentration 0,8µg/ml) zugegeben. Gele mit einer Laufstrecke zwischen 5 und 14cm wurden einer horizontalen Gelelektrophorese bei 70V (präparativ) bis 150V (analytisch) unterzogen.

2.2 Isolierung von DNA aus Gelen**2.2.1 Elektroelution**

Um DNA aus einem präparativen PAGE-Gel zu isolieren wurde die Bande ausgeschnitten und mit 300µl 1xTBE in einen Dialyseschlauch (Sigma) eingebracht. Unter Kühlung wurde die DNA in 2 bis 3 Stunden bei 145mA in 1xTBE eluiert und im Anschluß durch Ethanol-fällung (IV.2.3) aus dem Puffer isoliert.

2.2.2 GFX-Säulen

Aus Agarosegelen wurde DNA teils durch Elektroelution, teils mit Hilfe des GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kits (Amersham Biosciences, Kat.Nr. 27-9602-01) isoliert. Die ausgeschnittene Bande wurde gemäß den Angaben des Herstellers in einem chaotropen Capture-Puffer bei 60°C bis zum Schmelzen des Gels inkubiert, dann affinitätschromatographisch mittels einer mit Glasfasermatrix gefüllten Säule aus der Lösung isoliert und nach zwei Waschrufen mit 10 – 50µl H₂O eluiert.

2.3 Präzipitation von DNA

Um DNA aus wässrigen Lösungen zu präzipitieren wurde die Lösung mit dem 0,1fachen Volumen NaCl 5M oder NaAcetat 3M pH5,2 und dem 2,5fachen Volumen 100% EtOH versetzt. Nach 10minütiger Inkubation wurde 15 min mit 13.000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet zum Waschen in 500µl 70% EtOH resuspendiert und nochmals 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einer Vakuumzentrifuge (Heraeus VR-maxi) getrocknet und in 20 – 50µl H₂O gelöst.

2.4 Aufreinigung von DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Um aus Gewebelysaten störende Proteine zu entfernen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, vorsichtig geschüttelt und 10 min mit 13.000rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Cap überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, geschüttelt und nach nochmaliger Zentrifugation wieder abgenommen. Dieser Schritt dient der vollständigen Entfernung des Phenols.

2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde mit einem Eppendorf BioPhotometer bei einer Absorption von 260nm ermittelt. Eine optische Dichte (OD_{260}) von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1cm 50µg/µl dsDNA oder 40µg ssRNA.

Die Reinheit der Lösung lässt sich aus dem Quotienten $A_{260/280}$ abschätzen, der bei reiner Nukleinsäurelösung bei 2, bei reiner Proteinlösung dagegen bei 0,6 liegt und daher in Nukleinsäurelösungen $> 1,7$ sein sollte.

3 Enzymatische Modifikation von DNA

3.1 Restriktion

Restriktionsverdau von DNA wurde in der vorliegenden Arbeit zur Restriktionsanalyse von PCR-Produkten und rekombinanten Plasmiden, zur Präparation von DNA-Fragmenten zur Konstruktion rekombinanter Plasmide sowie zum Verdau von DNA für Southern Blot Analysen durchgeführt.

Bakterielle Restriktionsenzyme erkennen spezifische, meist palindromische Basensequenzen der Doppelhelix und spalten diese. Die hier verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme spalten die beiden Stränge innerhalb oder unmittelbar neben der Erkennungssequenz entweder gegenüber oder versetzt, so daß entweder glatte (blunt ends) oder einander komplementäre 5'- oder 3'-überhängende Enden (sticky ends) entstehen. Kompatible Enden können später enzymatisch wieder verknüpft werden (IV.3.2).

Es wurden ausschließlich Restriktionsenzyme der Firma NEB (New England BioLabs) sowie die von NEB empfohlenen 10x Puffer verwendet. Jedem Restriktionsverdau wurden standardmäßig 10% 10x BSA (NEB) zugesetzt. Der Verdau erfolgte bei 37°C für 45 min (analytisch) bis 12 Stunden (präparativ). Es wurden je nach DNA-Menge und Aktivität des Enzyms 0,5 – 4µl Enzymstocklösung verwendet.

3.2 Ligation

Die T4-Ligase wurde verwendet, um Vektor-DNA und Fremd-DNA („Insert“) zu rekombinanten Plasmiden zu verknüpfen. Sie katalysiert die Verknüpfung sowohl glatter als auch überhängender kompatibler DNA-Enden. Unter ATP-Verbrauch entsteht eine Phosphodiester-Bindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe und der 5'-Phosphatgruppe der beiden Enden. Insert und linearisierter, dephosphorylierter Vektor wurden im Verhältnis 3:1 gemischt und in Ligase-Puffer (NEB) für 12 – 16 h bei 16°C mit T4-Ligase (NEB) inkubiert. Anschließend wurden mit dem rekombinanten Plasmid wie unter IV.5.3 beschrieben kompetente *E.coli* transformiert und vermehrt.

3.3 Adapterligation

Zur Modifikation der Multiple Cloning Sites der Plasmide pUC18 und pBlueskript® II KS (+/-) (IV.5.1 und IV.5.1) wurden die Vektoren aufgeschnitten und entsprechende Adapter oder Linker eingesetzt. So konnten unerwünschte Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme entfernt sowie neue Erkennungsstellen eingefügt werden.

Ein Linker besteht aus zwei 5'-phosphorylierten Oligonukleotiden, die zueinander komplementär sind und die gewünschte Sequenz (hier Erkennungstellen für Restriktionsenzyme) enthalten. An ihren Rändern bilden sie bei komplementärer Anlagerung Überhänge, die mit den entsprechenden Überhängen des Vektors kompatibel sind. So können sie in den aufgeschnittenen Vektor ligiert werden.

Die 5'-phosphorylierten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen. Zur komplementären Anlagerung wurden die beiden Oligonukleotide gemischt (je 100pmol) und 2 min auf 75°C erhitzt. Es folgte langsames, 30minütiges Abkühlen. 2µl der Mischung wurden wie unter IV.3.2 beschrieben in den linearisierten Vektor ligiert.

3.4 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei Ligation in einen linearisierten Vektor den Ringschluß des Leervektors (Religation) auszuschließen, wurden nach der Linearisierung des Vektors die 5'-Phosphatgruppen abgespalten, die die T4-Ligase zur Verknüpfung benötigt. Dem Restriktionsansatz wurde 1µl alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, calf intestine phosphatase) zugesetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde wie unter IV.3.2 beschrieben ligiert.

3.5 Cre-vermittelte Rekombination

Die Cre-Rekombinase erkennt und rekombiniert spezifische 34bp lange DNA-Sequenzen, die sogenannten loxP-Seiten.

Um *in vitro* die Funktionalität von loxP-Seiten zu überprüfen wurde die DNA mit Cre-Rekombinase der Firma Novagen (Kat.Nr. 69247-3) in Cre-Puffer (Novagen) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und das Enzym anschließend 5 min bei 70°C denaturiert.

4 Sequenzanalyse

Die Aufklärung von DNA-Sequenzen erfolgte in Anlehnung an die von Sanger et al. entwickelte Didesoxymethode (Sanger et al., 1977). Dabei wurde zunächst im Thermocycler eine der PCR vergleichbare „Cycling-Reaktion“ durchgeführt, bei der nur ein Primer zugegeben wird, die Polymerase also nur den komplementären Strang zu einem Strang des DNA-Templates synthetisieren kann. Weiter werden außer Desoxynukleotiden (dNTPs) auch

verschiedenfarbig fluoreszenzmarkierte 2',3'-Dideoxynukleotide zugesetzt. Das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe verhindert eine Strangverlängerung, so daß es zum Kettenabbruch kommt. So entstehen zu jeder Base der DNA-Matrize DNA-Fragmente der entsprechenden Länge, die am Ende für jede Base unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe tragen (Emission der Farbstoffe: ddGTP 540nm, ddATP 570nm, ddTTP 600nm, ddCTP 630nm).

Für die Reaktion wurde der ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) eingesetzt, der die Polymerase, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs sowie den entsprechenden Puffer bereits enthält.

Reaktionsansatz:

	Plasmid-DNA, PCR-Fragmente	BAC-DNA
DNA	ca. 0,5µg	ca. 1,2µg
Primer (10pmol/µl)	1µl	1µl
Ready Reaction Mix	2,5µl	6µl
H ₂ O	ad 12µl	ad 16 bzw. 20µl

Standardbedingungen:

95°C	2min	
95°C	30sec	
50°C	40sec	25 Zyklen
60°C	4min	

Bedingungen für BAC- DNA:

95°C	2min	
95°C	30sec	
50°C	30sec	50 Zyklen
60°C	4min	

Im Anschluß an die Reaktion wurde die DNA wie unter IV.2.3 beschrieben präzipitiert, getrocknet und in 20µl TSR (Template Suppression Reagent, ABI Prism) gelöst. Nach Denaturierung (95°C, 2 min) wurden die Proben in einem ABI PrismTM 310 Sequencer (PE Applied Biosystems) kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Ein Laserdetektor am Ende der Kapillare regt die Fluoreszenzfarbstoffe an und übermittelt das resultierende Signal an die Software, die daraus die Sequenz ermittelt. Je nach Kapillarlänge konnte pro Reaktion eine Sequenz von 200 bis 800 Basen aufgeklärt werden.

5 Amplifikation und Isolation von Plasmid-DNA

5.1 Verwendete Plasmide

pcDNA3.1

Dieses Plasmid (Invitrogen, Kat.Nr. V790-20) diente als Expressionsvektor für verschiedene rekombinante Proteine. Es enthält ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion von *E.coli*-Kulturen auf Transformanten, ein Neomycinresistenzgen zur Selektion transfizierter eukaryotischer Zelllinien, den *E. coli*-Replikationsursprung, durch den eine hohe Kopienzahl ermöglicht wird, sowie eine Multiple Cloning Site (MCS) unter Kontrolle eines CMV-Promotors.

Die Klonierung des trunkierten CNGB1a-Proteins (CNGB1a_{trunk}, s. V.8.1) erfolgte in dem modifizierten pcDNA3.1/myc-His[®]. Dieses Plasmid enthält am 3'-Ende der MCS ein Myc-Epitop (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) sowie einen Polyhistidin-Tag (6x His). Bei Transkription entsteht somit ein Fusionsprotein, das C-terminal über einen Myc- oder His-Antikörper nachgewiesen wurde.

pUC18

Das Plasmid pUC18 (Pharmacia) wurde zur Subklonierung von DNA-Fragmenten verwendet. Es enthält ebenfalls ein Ampicillinresistenzgen, den *E. coli*-Replikationsursprung sowie einen Teil des lacZ-Gens (α -Peptid der β -Galaktosidase). Wird der *E. coli*-Stamm XL1-blue, bei dem eine Deletion im β -Galaktosidasegen vorliegt, nach Transformation mit pUC18 kultiviert, kann durch α -Komplementierung wieder funktionstüchtige β -Galaktosidase gebildet werden und X-Gal als chromogenes Substrat zur Blaufärbung führen. Wird jedoch exogene DNA in die MCS einkloniert, wird das Gen für das α -Peptid zerstört, so daß bereits durch Blau-Weiß-Selektion der Klone inserthaltige Vektoren erkannt werden können.

pUC18mod

Zur Konstruktion des Targetingvektors wurde das Plasmid pUC18 in seiner Multiple Cloning Site modifiziert. Durch Restriktion mit BamHI und EcoRI und Einsetzen eines Linkers (IV.3.3) aus den Oligonukleotiden LpUC18ClaNheXhoF und LpUC18ClaNheXhoR (VIII.1) wurden die Schnittstellen für XmaI, SacI und Acc65I deletiert sowie Erkennungssequenzen für ClaI, NheI und XhoI eingefügt (siehe Abbildung 9).

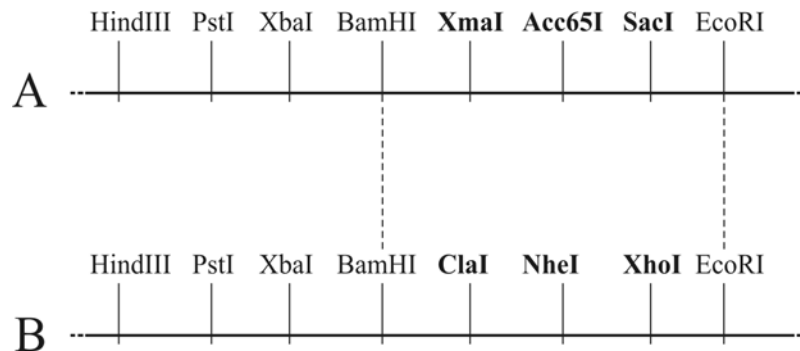


Abbildung 9: modifizierte MCS von pUC18mod

A) Teil der MCS von pUC18 B) MCS von pUC18mod nach Einsetzen des Linkers.

pBlueskript[®] II KS (+/-)

Das Plasmid pBluescript[®] II KS (+/-) (Stratagene) stammt von pUC19 ab. Es trägt wie pUC18 ein Ampicillinresistenzgen, den *E. coli*-Replikationsursprung und das Gen für das α -Peptid der β -Galaktosidase zur Blau-Weiß-Selektion.

pBluescriptNeoTkmod

Für den Targetingvektor wurde eine modifizierte Form von pBluescript[®] II KS (+/-) verwendet. Von Herrn Dr. Robert Feil wurde freundlicherweise eine Version des Vektors zur Verfügung gestellt, die in der MCS zwischen den Schnittstellen für EcoRI und HindIII bereits eine loxP-Seite, ein Neomycinresistenzgen, das Thymidinkinasegen aus dem Herpes simplex Virus Typ1 sowie eine weitere loxP-Seite trug. Dieser Vektor wurde mit BamHI linearisiert und mit einem Linker aus den Oligonukleotiden LpBlueNheF und LpBlueNheR (VIII.1) eine zusätzliche NheI-Schnittstelle eingefügt.

Die finale MCS von pBluescriptNeoTkmod mit den loxP-Seiten sowie der Resistenzkassette ist in Abbildung 10 dargestellt.

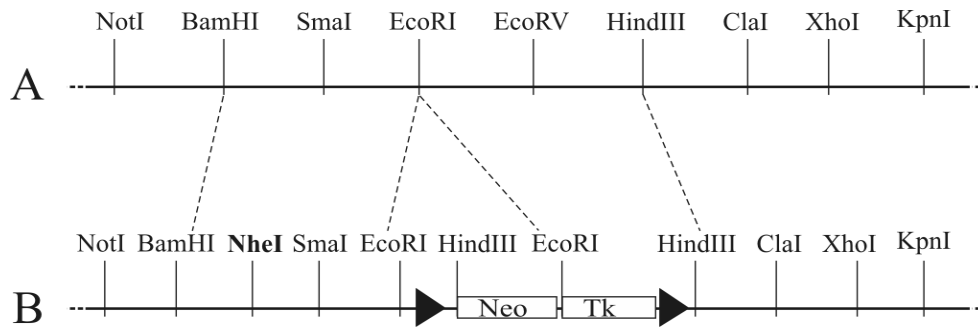


Abbildung 10: pBluescriptNeoTkmod

A) MCS des Ursprungsvektors pBluescript® II KS (+/-). B) MCS von pBluescriptNeoTkmod mit der Resistenzkassette und zwei loxP-Seiten.

pBeloBAC

pBeloBAC ist der Vektor des BAC-Systems (bacterial artificial chromosome), der in der Lage ist, Fremd-DNA bis zu einer Länge von 240kb aufzunehmen. Sie werden über eine HindIII-Schnittstelle in die cloning site eingesetzt. Es handelt sich um ein single copy plasmid, eine Zelle trägt also nur ein Molekül des Plasmids.

5.2 Verwendete Bakterien und ihre Kultur

In dieser Arbeit wurden zur Amplifikation von Plasmiden die *Escherichia Coli* Stämme XL1-blue MRF (Stratagene) sowie DH10B (als BAC-Klon, GenomeSystems) verwendet.

Die Kultur erfolgte bei 225rpm und 37°C in einem Certomat® IS (B.Braun Biotech International) in LB-Medium (Vollmedium Luria-Bertani) bzw. LB-BAC-Medium oder auf Agarplatten bei 37°C im Brutschrank (Heraeus Function Line).

LB(+)-Medium:

Peptone	10g
Hefeextrakt	5g
NaCl	5g
D-(+)-Glucose	1g
H ₂ O	ad 1000ml

LB(-)-Medium:

wie LB(+), ohne Glucose

LB-BAC-Medium:

Peptone	10g
Hefeextrakt	5g
NaCl	10g
H ₂ O	ad 1000ml

Agar-Platten:

Peptone	10g
Hefeextrakt	5g
NaCl	5g
Agar	15g
H ₂ O	ad 1000ml

Zur selektiven Kultur plasmidtragender Bakterien wurde der Kultur je nach Plasmid Ampicillin (finale Konzentration 100µg/ml in Flüssigkulturen, 50µg/ml in Agarplatten) oder Chloramphenicol (finale Konzentration 12,5µg/ml) zugesetzt.

Die Lagerung der transformierten Bakterien erfolgte bis zu 6 Monate auf Agarplatten bei 4°C oder für längere Zeit als Glycerolstock (1 Teil Flüssigkultur + 1 Teil Glycerol) bei -80°C.

5.3 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von Plasmiden erfolgte in TSS-kompetente *E. coli* (IV.5.4). 400µl Zellsuspension wurden 30 min auf Eis mit der Plasmidlösung inkubiert. Nach Zugabe von 2,6ml LB-Medium wurde 50 bis 60 min bei 37°C / 145rpm geschüttelt und anschließend auf Agarplatten ausplattiert.

5.4 Erzeugung TSS-kompetenter *E. coli*

Unter kompetenten Zellen versteht man Bakterienzellen, deren Zellmembran für exogene DNA durchlässig ist. Im vorliegenden Protokoll wurde dies durch die Behandlung mit DMSO erreicht.

Dazu wurde zunächst eine Vorkultur (7ml) von *E. coli* XL1 blue über Nacht kultiviert und am nächsten Morgen in 100ml LB(-)-Medium (IV.5.2) übergeimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,35 - 0,38 wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min, 3000rpm, Beckman Coulter J2-MC). Das Pellet wurde in 15ml TSS resuspendiert und sofort in Aliquots schockgefroren.

TSS (Transformation and Storage Solution):

40% Polyethylenglykol 3350	12,5ml
1M MgCl ₂	2,5ml
DMSO	2,5ml
LB-Medium	ad 50ml

5.5 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

Im kleinen Maßstab (7ml Übernachtskulturen) wurde Plasmid-DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert. Dabei wurden die Bakterienzellen mit Hilfe von NaOH und SDS lysiert, die dabei freiwerdende RNA durch RNase verdaut, Proteine und DNA denaturiert. Bei der nachfolgenden Neutralisation renaturiert die Plasmid-DNA wieder und kann in Lösung bleiben, während genomische DNA, Proteine und Zellbestandteile abzentrifugiert werden können.

Die Kultur wurde abzentrifugiert (10 min / 3500rpm) und in 250µl MP1 wieder resuspendiert. Nach Zugabe von 250µl MP2 wurde 5 min bei Raumtemperatur, nach Zugabe von 250µl MP3 weitere 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000rpm, 15 min) konnte aus dem klaren Überstand die Plasmid-DNA wie unter IV.2.3 beschrieben gefällt und in 20µl H₂O resuspendiert werden.

Lösungen:

MP1 (Resuspensionspuffer):

TRIS	6,06g
EDTA	3,72g
H ₂ O	ad 1000ml
RNase A	100mg
pH8 einstellen	

MP2 (Lysepuffer):

NaOH	8,0g
H ₂ O	900ml
SDS-Lösung 10%	100ml

MP3 (Neutralisationspuffer):

Kaliumacetat	294,5g
H ₂ O	ad 1000ml
pH5,5 mit Eisessig einstellen	

5.6 Plasmidpräparation im Großmaßstab

Um große Mengen hochreiner Plasmid-DNA zu isolieren, wurde das Maxipräp-Kit NucleoBond[®]PC100 der Firma Macherey-Nagel verwendet (Kat.Nr. 740573.100). Es basiert ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, gefolgt von einer säulenchromatographischen Aufreinigung über ein Anionenaustauscherharz, das spezifisch Nukleinsäuren bindet.

In 100ml LB-(+)-Medium wurden die plasmidtragenden Bakterien über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5000rpm, 10 min, Beckman Coulter J2-MC, Rotor JLA 10-5) und das Pellet in 12ml Puffer S1 resuspendiert. Nach Zusatz von 12ml Puffer S2 wurde 5 min bei RT inkubiert, nach Zusatz von 12 ml Puffer S3 weitere 5 min auf Eis. Der Überstand nach Ultrazentrifugation (25000rpm, 40 min, Beckman Coulter Optima[™] LE-80K, Rotor 45Ti) wurde auf eine mit 6ml Puffer N2 equilibrierte AX500 Säule gegeben. Nach zwei Waschschritten mit Puffer N3 wurde mit 15ml Puffer N5 eluiert.

Die Plasmid-DNA wurde mit dem 0,7fachen Volumen Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (8000rpm, 30 min, Beckman Coulter J2-MC Rotor JS-13.1), das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer Vakuumzentrifuge (Heraeus VR-maxi) getrocknet, in 2 x 250µl H₂O gelöst und die Konzentration bestimmt (IV.2.5). Zur Kontrolle wurde eine Restriktion (IV.3.1) mit bekannten Schnittstellen und Fragmentgrößen durchgeführt.

Zusammensetzung der Puffer:

- S1: 50mM TRIS-HCl, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A, pH8.0
- S2: 200mM NaOH, 1% SDS
- S3: 2,8M KAcetat, pH5,1
- N2: 100mM TRIS, 15% Ethanol, 900mM KCl, 0,15% Triton X-100, pH6,3
- N3: 100mM TRIS, 15% Ethanol, 1,15M KCl, pH6,3
- N5: 100mM TRIS, 15% Ethanol, 1M KCl, pH8,5

5.7 Präparation von low-copy Plasmiden

Der verwendete BAC-Klon trug den CNGB1-Locus in pBeloBAC11, einem low-copy Plasmid. Zu dessen Isolation wurde der Nucleobond[®]BAC100-Kit (Macherey-Nagel, Kat.Nr. 740579) verwendet. Er basiert auf dem gleichen Prinzip wie der standardmäßig verwendete NucleoBond[®]PC100 (IV.5.6). Zur säulenchromatographischen Aufreinigung wurden Nucleobond[®]BAC100 Säulen verwendet und die Elution erfolgte nach 3 Waschschritten mit Puffer N3 in zwei Schritten mit je 6 ml Puffer N5.

6 Isolation von genomischer DNA

6.1 Isolation von DNA aus Mausgewebe

DNA aus Mausgewebe wurde für die Durchführung von Genotypisierungs-PCRs und Southern Blot Analysen benötigt.

6.1.1 Isolation von DNA für PCR

Zur Genotypisierung wurden kleine Gewebeprobe der Mäuse mit Proteinase K lysiert.

Reaktionsansatz pro Gewebeprobe:

10x <i>Taq</i> -Puffer	5µl
Proteinase K, 20µg/µl, Roche	1µl
H ₂ O	ad 50µl

Die Lyse erfolgte bei 55°C und 600rpm für 3 bis 12 Stunden in einem Thermomixer compact (Eppendorf). Die Proteinase wurde für 15 min bei 95°C denaturiert. Für die PCR wurden ohne weitere Abtrennung der Zellreste 3µl Flüssigkeit entnommen.

6.1.2 Isolation von DNA für Southern Blot Analysen

Größere Gewebeprobe wurden über Nacht bei 55°C und 600rpm lysiert und abschließend die Proteinase K für 15 min bei 95°C denaturiert.

Reaktionsansatz pro Gewebe:

Proteinase K-Puffer	500µl
Proteinase K (Roche)	4µl

Proteinase K-Puffer:

1M TRIS pH8,5	50ml
0,5M EDTA pH8	5ml
SDS 10%	10ml
5M NaCl	20ml
H ₂ O	ad 500ml

Im Anschluß wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (IV.2.5) durchgeführt.

Die DNA wurde durch Zusatz von des 0,7fachen Volumens Isopropanol präzipitiert. Durch vorsichtiges Mischen wurde die Aggregation der DNA angeregt, die DNA-Flocke mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze aus der Lösung geholt und zum Waschen in vorgelegten 70%igen Ethanol gelegt. Die Flocke wurde wieder aufgenommen und in ein frisches Cap gelegt, in dem sie unter einer Laminar Flow Box (Reinraum-Arbeitsplatz 8580, Köttermann) getrocknet wurde.

Die DNA wurde in 50 – 100µl H₂O über Nacht bei 50°C und 300rpm gelöst.

Um die Qualität der DNA zu überprüfen, wurden 5µl Lösung auf einem 0,7%igen Agarosegel einer Gelelektrophorese unterzogen. Bei intakter, ungescherter DNA waren keine Fragmente < 12kb zu sehen.

6.2 Isolation von DNA aus ES-Zellen

Zur Isolation von ES-Zell-DNA wurden pro 96Well-Platte 6ml Lysepuffer mit 100µl Proteinase K versetzt (finale Konzentration 0,25mg/ml).

Pro Well wurden 50µl zugegeben und über Nacht bei 55°C lysiert. Am nächsten Tag wurde die DNA nach dem gleichen Prinzip wie unter IV.2.3 beschrieben gefällt: Zugabe von 100µl EtOH / NaCl pro Loch, 1 Stunde Inkubation, nach Abkippen der Flüssigkeit 3 x Waschen mit 70% EtOH und trocknen lassen.

Für den Restriktionsverdau wurde die gefällte DNA direkt mit dem Reaktionsmix versetzt.

Lysepuffer:

5M NaCl	1ml
0,5M TRIS/HCl pH7,4	10ml
0,5M EDTA	10ml
N-Laurylsarcosin	2,5g
H ₂ O	ad 500ml

Proteinase-K:

Roche (Kat.Nr. 1373196), 15,6mg/ml

7 Southern Blot Analyse

Southern Blot Analysen wurden zur Erstellung einer Restriktionskarte des CNGB1-Locus, zum Screenen der ES-Zellklone, sowie zur Bestätigung der Deletion im Mausgenom durchgeführt.

Lösungen:

3M NaCl:

NaCl	175,32g
H ₂ O	ad 1000ml

1M NaH₂PO₄:

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	69,0g
H ₂ O	ad 500ml

1M TRIS:

TRIS	121,14g
H ₂ O	ad 1000ml
pH8 oder 7,5 einstellen	

20x SSC:

NaCl	350,6g
Na ₃ -Citrat x 2H ₂ O	176,4g
H ₂ O	ad 2000ml

0,5M TRIS/3M NaCl:

TRIS 1M	500ml
H ₂ O	ca. 300ml
NaCl	175,32g
H ₂ O	ad 1000ml

20% SDS:

SDS	200g
H ₂ O	ad 1000ml

1M Na₂HPO₄:

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	355,98g
H ₂ O	ad 2000ml

1M NaOH:

NaOH	20g
H ₂ O	ad 500ml

0,2M HCl:

HCl _{konz.}	10ml
H ₂ O	ad 500ml

0,5M EDTA:

EDTA	93,06g
H ₂ O	ad 500ml
pH8 einstellen	

TE-Puffer:

TRIS 1M pH8	10ml
EDTA 0,5M pH8	2ml
H ₂ O	ad 1000ml

ssDNA 10mg/ml:

Salmon sperm DNA (Invitrogen, Kat.Nr.15632-011)	500mg
H ₂ O	ad 50ml

Church-Puffer:

BSA	5g
H ₂ O	50ml
Na ₂ HPO ₄ 1M	193,5ml
NaH ₂ PO ₄ 1M	56,5ml
20% SDS	175ml
EDTA 0,5M pH8	1ml
ssDNA (vor Gebrauch 5min / 100°C denaturieren)	5ml
H ₂ O	ad 500ml

Gelelektrophorese:

Plasmid-DNA, Stammzell-DNA oder genomische DNA aus Mausegewebe wurde über Nacht einer enzymatischen Restriktion unterzogen (IV.3.1).

Die verdaute DNA wurde auf Agarosegelen (0,5 – 1%) aufgetrennt (IV.2.1.3).

Das fertige Gel wurde 10 min in 0,2M HCl geschwenkt. Dies führt zu partieller Depurinierung und dadurch zu Strangbrüchen. Nach 30minütiger Denaturierung in 0,5M NaOH / 1,5M NaCl wurde 30 min in 0,5M TRIS pH8 / 3M NaCl neutralisiert.

Blottingverfahren:

Die DNA wurde nun über Nacht auf eine Nylonmembran (Genescreen Plus[®], Perkin Elmer, Kat.Nr. NEF988) transferiert.

Dazu wurde die Membran auf das Gel aufgelegt und durch einen mit 10x SSC getränkten Schwamm unter dem Gel und einen Stapel Saugpapier auf dem Gel Kapillarkräfte erzeugt, die die DNA auf die Membran übertragen. Der detaillierte Aufbau ist in Abbildung 11 gezeigt.

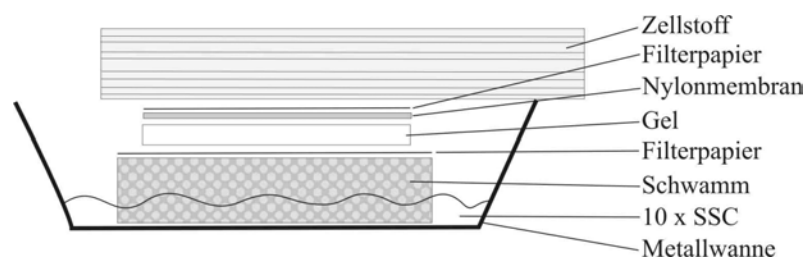


Abbildung 11. Southern Blot Analyse: Aufbau zum Transfer der DNA auf die Nylonmembran

Am folgenden Tag wurde die Membran 1 min in 0,4M NaOH inkubiert und 1 min in 0,2M TRIS/HCl pH7.5 / 1x SSC neutralisiert. Im Anschluß wurde die Membran zur kovalenten Bindung der DNA in einem Cl-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP) mit UV-Licht bestrahlt

(120 mJ/cm²) und 2 Stunden bei 80°C in einem Heraeus Vacutherm Ofen (VT 6025) gebacken.

Herstellung einer ³²P-markierten Gensonde:

Die Matrizen für die Sonden wurden durch PCR oder durch Restriktion von Plasmid-DNA gewonnen. Eine tabellarische Übersicht der verwendeten Sonden ist im Anhang in Tabelle VIII.4 zu finden.

Die Herstellung erfolgte mit dem Random primed Labeling Kit (Roche, Kat.Nr. 1004760). Dabei wird ein Gemisch aus Hexanukleotiden als Primer verwendet. Von diesen ausgehend wird der komplementäre Strang unter Einbau von $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham) durch das Klenow-Enzym synthetisiert.

Reaktionsansatz:

DNA	ca. 100ng
H ₂ O	ad 7 μ l

=> 10 min Denaturierung bei 97°C

dXTP-Mix (dATP, dGTP, dTTP, je 0,5mM)	3 μ l
Reaction-Mix (Hexanukleotide + Puffer)	2 μ l
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	7 μ l
Klenow-Enzym	1 μ l

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert, über eine NickTM Column (Pharmacia) aufgereinigt (Größenausschluß-Chromatographie) und die spezifische Aktivität der eluierten Sonde mit Hilfe eines Szintillationszählers (Beckman LS 6500) bestimmt.

Hybridisierung:

Blots mit Plasmid-DNA wurden mit 5×10^5 cpm/ml, Blots mit genomischer DNA mit 5×10^6 cpm/ml hybridisiert.

Die Membran wurde 2 bis 4 Stunden in 15ml Church-Puffer bei 60°C prähybridisiert, um freie Bindungsstellen zu maskieren. Die Hybridisierung mit der ³²P-markierten Sonde erfolgte in 10ml Church-Puffer in einem Rollhybridisierer (Biometra Compact Line OV4) bei 60°C. Am nächsten Morgen wurde 15 min in 2x SSC / 0,1% SDS bei 60°C, sowie in 0,4x SSC / 0,1% SDS 30 min bei 65°C und 40 min bei 68°C gewaschen.

Die Visualisierung der Banden erfolgte zunächst durch Auflegen einer Phospho-Imager-Platte über Nacht (Fujifilm Imaging Plate BAS-MP 2040S, Auswertung mit einem Fujifilm BAS-1500) sowie durch Auflegen eines Films für 7 Tage (Amersham HyperfilmTM MP, Entwicklung mit Entwickler und Fixierer von Adefo (T-Matic, 00034 bzw. 00091) in einer Agfa Curix 60 Entwicklermaschine).

Waschen und Rehybridisierung der Blots:

Um einen Blot mit einer zweiten Sonde hybridisieren zu können, wurde in 2 bis 3 Waschrufen à 15 min bei 97°C in 0,4x SSC / 0,1% SDS die Sonde wieder von der Membran gewaschen. Zur Kontrolle wurde über Nacht eine Phospho-Imager-Platte aufgelegt und bei Bedarf am nächsten Tag nochmals gewaschen.

War auf der Membran keine Radioaktivität mehr detektierbar, wurde sie wieder prähybridisiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde rehybridisiert.

8 Isolation von RNA und Synthese von cDNA

Beim Umgang mit RNA wurde allgemein darauf geachtet, zügig und unter Vermeidung der Kontamination mit RNAsen zu arbeiten. Da RNAsen sehr stabil sind und auch durch Autoklavieren bei 121°C nicht inaktiviert werden können, wurden alle verwendeten Glaswaren für 3 Stunden bei 220°C gebacken.

8.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Mausgewebe

Zur Isolation von RNA aus Retinae oder olfaktorischem Epithel wurde das Gewebe zügig isoliert (IV.13) und sofort in 100µl RNAlater (Quiagen) überführt. RNAlater ist ein Stabilisierungsreagenz, das schnell ins Gewebe eindringt und den RNA-Abbau verhindert.

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Protect Mini Kit (Quiagen, Kat.Nr. 74124) nach Herstellerangaben. Das Gewebe wurde in einem denaturierenden Lysepuffer zweimal 20 Sekunden mit einem Ultra-Turrax T8 (Dispergierwerkzeug S8N-5G von IKA Labortechnik) homogenisiert. Dazwischen wurde auf Eis gekühlt und kurz abzentrifugiert. Die RNA wurde affinitätschromatographisch über eine mit Silicagel gefüllte Säule aus der Lösung isoliert und nach mehreren Waschschritten mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Die Konzentration der eluierten RNA wurde, wie unter IV.2.5 beschrieben, photometrisch bestimmt und die RNA sofort bei -80°C gelagert.

8.2 Synthese von cDNA

RNA wurde mit Hilfe des SuperscriptTM II RT H- Kits von Invitrogen in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese werden Reverse Transkriptasen verwendet, virale Polymerasen, die RNA als Matrize verwenden, um DNA-Stränge zu synthetisieren.

Die SuperscriptTM II Reverse Transkriptase ist eine bis zu 50°C thermostabile Mutante der nativen M-MLV RT (Moloney murine leukemia virus RT), bei der die RNase H-Aktivität fast gänzlich eliminiert ist und so deutlich höhere Ausbeuten an cDNA erzielt werden können. Um vergleichbare Chargen cDNA zu erhalten, wurden jeweils äquivalente Mengen RNA eingesetzt (1- 5µg RNA).

Der Reaktion wurden Oligo-dT₍₁₂₋₁₈₎-Primer zugesetzt, die spezifisch an den Poly-A-Schwanz von Boten-RNA binden, so daß nur diese in cDNA umgeschrieben wird. Zu Beginn der Reaktion wurde eventuell mitsolierte DNA mit DNase verdaut. Nach der reversen Transkription wird die verbleibende RNA mit RNase H entfernt.

Zur Beurteilung der Güte zweier parallel synthetisierter cDNA-Chargen (WT + KO) wurde eine RT-PCR mit HPRT-Primern durchgeführt (IV.1.5).

Standardprotokoll:

RNA-Lösung	10µl	
10x RT-Puffer	2 µl	
25mM MgCl ₂	2µl	
0,1M DTT	1µl	
DNase	0,1µl	
RNasin	1,0µl	
		30 min, 37°C DNA-Verdau
		5 min, 75°C Inaktivierung d. Enzyme
Oligo-dT-Primer	+ 1µl	
		10 min, 70°C Primeranlagerung
10mM dNTPs	+ 1µl	
0,1M DTT	+ 1µl	
		5 min, 42°C
Superscript RTII	+1µl	
		50 min, 42°C Reverse Transkription
		5 min, 90°C Inaktivierung der RT
		10 min, 4°C Kühlung
RNase H	+ 1µl	
		20 min, 37°C RNA-Verdau

9 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen**9.1 Isolierung von Membranproteinen aus Zellen oder Gewebe**

Zur Verwendung in Western Blot Analysen wurden Membranproteine aus Mausgewebe (Retina, olfaktorisches Epithel) oder transfizierten HEK293-Zellen isoliert.

Dabei wird die durch Homogenisation in einem „Potter“ entstandene Mikrosomenfraktion, die die Membranproteine enthält, durch Zentrifugation von den restlichen Zellbestandteilen getrennt.

Da Proteine nach der Zerstörung der Zelle sehr schnell durch Proteasen gespalten werden, wurden alle Arbeitsschritte zügig und auf Eis durchgeführt sowie dem Lysepuffer ein Gemisch aus Proteaseinhibitoren zugesetzt.

Das Zellpellet bzw. das Gewebe wurde mit 2 ml Lysepuffer versetzt und mit circa 10 Hüben auf Eis mit einem Potter (Potter S, B.Braun Biotech International) homogenisiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 5000g (8.700rpm) / 4°C wurde der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde noch zweimal nach demselben Procedere behandelt. Die Überstände wurden einer Ultrazentrifugation unterzogen (45 min / 30000rpm, Beckman Coulter Optima™ LE-80K) und das Pellet in 100µl Lysepuffer resuspendiert.

3x Lysepuffer:

MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)	3,15g
Sucrose	77g
EDTA 0,5M	6ml
H ₂ O	ad 200ml

Unmittelbar vor Gebrauch erfolgte die Verdünnung des Lysepuffers und der Zusatz der Proteaseinhibitoren in folgenden Finalkonzentrationen:

Leupeptin 1µg/ml (Calbiochem, Stock in 50% EtOH)
 Pepstatin A 1µM (Calbiochem, Stock in 50% EtOH)
 Antipain 1ng/ml (Calbiochem, Stock in 50% EtOH)
 PMSF 100 nM (Sigma, Stock in 100% EtOH)
 Orthophenanthrolin 1mM (Sigma, Stock in 100% EtOH)
 Benzamidin 1mM (Sigma, Stock in H₂O)
 Iodacetamid 0,9mM (Sigma, Stock in H₂O)

9.2 Quantifizierung von Proteinen

Die Proteinkonzentration von Membranpräparationen wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt.

Proteine binden im sauren Milieu an den Farbstoff Coomassie Brilliantblau, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nach 595nm verschiebt. So kann über die Farbtintensität bei 595nm (blau) die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt werden.

5µl Probe wurden mit 95µl 0,15M NaCl und 1ml Coomassie Brilliantblau G250-Lösung versetzt und nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur die Absorption bei 595nm vermessen (BioPhotometer, Eppendorf).

Zur Kalibration des Gerätes wurde zuvor eine BSA-Standardreihe (1 – 30µg Protein) erstellt und wie die Probe vermessen.

Coomassie Brilliantblau G250-Lösung:

Coomassie brillant blue G250	50mg
Ethanol 95%	25ml
H ₃ PO ₄ 85%	50ml
H ₂ O	ad 500ml

Lagerung der filtrierten Lösung bei 4°C

9.3 Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse ist ein Verfahren, bei dem Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und dort mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden. Dadurch können sowohl qualitative Aussagen (Proteingröße) als auch quantitative Aussagen (Proteinmenge) gemacht werden.

Lösungen:**4x TRIS-Cl/SDS pH8,8:**

(1,5M TRIS-Cl; 0,4% SDS)

TRIS	18,2g
SDS	0,4g
H ₂ O	ad 100ml
pH8,8 mit HCl einstellen, sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	

4x TRIS-Cl/SDS pH6,8:

(0,5M TRIS-Cl; 0,4% SDS)

TRIS	3,02g
SDS	0,2g
H ₂ O	ad 50ml
pH6,8 mit HCl einstellen, sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	

6x Lämmli-Probenpuffer:

4x TRIS-Cl/SDS, pH6,8	7ml
Glycerol	3ml
SDS	1g
Bromphenolblau	0,004%
H ₂ O	ad 10ml
Lagerung bei -20°C	

5x Elektrophoresepuffer:

TRIS	15,1g
Glycin	72,0g
SDS	5,0g
H ₂ O	ad 1000ml
Lagerung bei 4°C	

Transferpuffer (pH8,3):

TRIS	3,03g
Glycin	14,4g
Methanol	200ml
H ₂ O	ad 1000 ml

10x TBS pH8:

TRIS	12,1g
NaCl	80,23g
H ₂ O	ad 1000ml

TBST:

1xTBS
0,1% Tween 20

Blockierlösung:

1x TBST
5% BSA

Inkubationslösung:

1x TBST
1% BSA

Ponceau-S 0,5%:

Ponceau S	0,5g
Eisessig	1ml
H ₂ O	ad 100ml

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Zur denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) wurden Apparaturen der Firma Biorad verwendet (Mini Protean II Cell).

SDS denaturiert die Proteine und lagert sich in einem konstanten Verhältnis von 1,4g pro g Protein an. Die negative Ladung des SDS dominiert über die Eigenladung der Proteine, so dass ein lineares Verhältnis aus Proteinmasse und Ladung entsteht und die Proteine nur ihrem Molekulargewicht folgend im elektrischen Feld aufgetrennt werden.

Durch Variation des Gehalts an Acrylamid und Bisacrylamid können der Vernetzungsgrad und damit die Trenneigenschaften des Gels beeinflusst werden. Zur Polymerisation wird APS als Radikalstarter sowie TEMED als Katalysator zugesetzt. Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus dem eigentlichen Trenngel (5 – 10%ig) und einem Sammelgel, in dem die Proteine fokussiert werden.

Trenngel 7%:

Acrylamid für SDS-PAGE (Roth) (30% Acrylamid + 0,8% Bis- acrylamid)	3,5ml
4x TRIS-Cl/SDS pH8,8	3,75ml
H ₂ O	7,75ml
TEMED	10µl
APS 20%	30µl

Sammelgel:

Acrylamid für SDS-PAGE (Roth) (30% Acrylamid + 0,8% Bis- acrylamid)	0,65ml
4x TRIS-Cl/SDS pH6,8	1,25ml
H ₂ O	3,05ml
TEMED	5µl
APS 20%	25µl

Die Proben wurden mit Lämmli-Auftragspuffer versetzt und 4 min bei 95°C denaturiert. Als Größenstandard wurde Benchmark Protein Ladder (Invitrogen) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 100 bis 120 Volt in Elektrophoresepuffer durchgeführt.

Blottingverfahren:

Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran (Protran[®], Schleicher&Schuell) überführt. Dazu wurden in Transferpuffer 1 Stunde lang 100V / max. 300mA in einer Blottingapparatur von BioRad (Mini Trans Blot[®]) an ein „Sandwich“ aus Filterpapier (GC, Schleicher&Schüll), Gel und Membran angelegt.

Anschließend wurde die Membran 10 min in Ponceau-Lösung gefärbt und 2 min in Wasser entfärbt, um den Größenstandard nachzuzeichnen und die Qualität des Proteintransfers abzuschätzen.

Detektion:

Die Membran wurde nach Waschen in TBST für 2 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur in Blockierlösung geschwenkt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Über Nacht wurde sie auf einem Überkopfschüttler (GFL[®] 3025) bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert. Eine Tabelle mit den verwendeten Antikörpern und Konzentrationen ist im Anhang unter VIII.5.1 zu finden. Nach dreimaligem Waschen in TBST erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 bis 2 Stunden. Es wurden mit Meerrettichperoxidase gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus (NA931, Amersham Pharmacia) oder Kaninchen (NA934, Amersham Pharmacia) verwendet. Die Detektion erfolgte nach weiteren 5 Waschschritten mit den ECL Western Blotting Detection Reagents von Amersham Pharmacia (Kat.Nr. RPN2109). Bei diesem System („enhanced chemiluminescence“) wird durch die Peroxidase in Anwesenheit von H₂O₂ Luminol zu 3-Aminophthalat oxidiert. Dabei durchläuft die oxidierte Form einen angeregten, energiereicheren Zustand, von dem aus sie unter Lichtemission wieder in den Grundzustand übergeht. Diese Chemilumineszenz wurde durch Auflegen eines Films (Hyperfilm[™] ECL, Amersham Pharmacia, Kat.Nr. HP7 9NA) nachgewiesen.

Rehybridisierung:

Um auf einem Blot erneut mit einem zweiten Antikörper Proteine zu detektieren, wurde der Blot „gestrippt“, d.h. Primär- und Sekundärantikörper wieder entfernt. Dazu wurde der Blot zunächst bei RT 4 mal 5 min in TBST gewaschen, dann im Schüttelwasserbad (GFL[®] 1083) für 30 Minuten bei 50°C in Stripping-Puffer geschwenkt. Nach 6 weiteren Waschschritten in TBST (Raumtemperatur) konnte der Blot wieder blockiert und mit Antikörperlösung inkubiert werden.

Stripping-Puffer:

TRIS	3,8g
SDS	10g
β-Mercaptoethanol	3,5ml
H ₂ O	ad 500ml
pH6,8 einstellen, vor Gebrauch sterilfiltrieren	

9.4 Aufreinigung von Antikörpern

Zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen den C-Terminus von CNGB1 wurde die Sequenz EAAGPPEPSVRIRVSPGP ausgewählt. Da das Peptid zu klein ist, um eine Immunreaktion hervorzurufen, wurde es an KLH (keyhole limpet hemocyanin) gebunden. Die Synthese des Peptids sowie die Immunisierung der Kaninchen geschah durch die Firma Gramsch. Das Immuneserum wurde affinitätschromatographisch aufgereinigt.

9.4.1 Herstellung der Affinitätssäulen:

Sowohl das CNGB1-Peptid als auch KLH wurden an Sepharose gebunden. Die Peptide wurden dazu reduziert, aufgereinigt und mit Sepharose inkubiert.

Lösungen:**Kopplungspuffer:**

1M TRIS	50ml
0,5M EDTA	10ml
H ₂ O	ad 1000ml
pH8,5 einstellen	
Lagerung bei 4°C	

1M DTT

Dithiothreitol	1,5g
3M NaAcetat pH5,2	33 µl
H ₂ O	ad 10ml
Lagerung bei -20°C	

10% NaN₃

NaN ₃	1g
H ₂ O	ad 10ml
Lagerung bei 4°C	

PB/0,5M NaCl

NaCl	10,61g
PBS	500ml
autoklavieren; Lagerung bei 4°C	

4,5M MgCl₂

MgCl ₂	91,48g
H ₂ O	ad 100ml
autoklavieren, Lagerung bei 4°C	

50mM Cystein

Cystein	0,061g
Kopplungspuffer	10ml
sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	

Reduktion des Peptids:

8 bis 10mg Peptid wurden mit 900µl Kopplungspuffer und 100µl 1M DTT 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Reinigung des reduzierten Peptids:

Zur Herstellung einer Sephadex-Säule wurden 7g Sephadex G-10 in 20ml H₂O suspendiert und eine Säule damit befüllt. Die Säule wurde bei Raumtemperatur mit Hilfe einer

Schlauchpumpe mit 200ml 0,2M NaOH vorgespült. Anschließend wurde mit 100ml Kopplungspuffer equilibriert.

Die Peptid-Lösung wurde auf die Säule aufgebracht und mit Kopplungspuffer in 24 Fraktionen à 1ml eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden 1:25 verdünnt und die Extinktion bei 280nm gemessen. Diese Wellenlänge erfasst Tryptophane in den Peptiden. Fraktionen 6 bis 9 enthielten das reduzierte Peptid. Sie wurden vereinigt und bei -80°C weggefroren. Die Säule wurde mit 200ml Kopplungspuffer wieder gespült und in 20ml Kopplungspuffer / 100 μl NaN_3 bei 4°C gelagert.

Kopplungsreaktion:

1ml SulfoLink Coupling Gel (Pierce, Pellet nach Zentrifugation) wurden in einem Kryoröhrchen mit den vereinigten Peptidfraktionen gemischt und 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Das proteinbeladene Gel wurde abzentrifugiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 3ml 50mM Cystein in Kopplungspuffer geschüttelt, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Das Pellet wurde in Kopplungspuffer mit 0,5% NaN_3 resuspendiert und in eine Säule überführt, wo sich das Gel wieder setzte und bei 4°C gelagert werden konnte.

9.4.2 Aufreinigung des Antikörpers:

Die Aufreinigung erfolgte bei 4°C . Die Affinitätssäule wurde mit 50ml PBS gespült (1-2ml/min). 2ml CNGB1-Serum wurden mit 10ml PB / 0,5M NaCl gemischt, sterilfiltriert und auf die Säule aufgebracht. Das Serum wurde über Nacht im Kreislauf über die Säule gepumpt, um eine möglichst quantitative Bindung an die Säule zu erreichen. Am nächsten Morgen erfolgten Waschschritte mit 150ml PB / 0,5M NaCl, 10ml PB / 0,5M NaCl / 0,1% Tween 20 und 50ml PBS. Die Antikörper wurden mit 4,5M MgCl_2 eluiert. Schlieren in den Tropfen, die die Säule verließen, zeigten den Beginn der MgCl_2 -haltigen Eluatfraktion an, welche in 4 x 1ml-Fraktionen in Entsalzungssäulchen aufgefangen wurden. Das Eluat wurde zur Entsalzung mit PBS in jedem Säulchen ad 2ml verdünnt und 40 min bei 4000rpm zentrifugiert. Dieses Procedere wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Der verbleibende Überstand wurde in Auffanggefäße abzentrifugiert (2 min / 1600rpm) und 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA zugegeben. Die Affinitätssäule wurde mit 50ml PBS und 100ml Kopplungspuffer gespült und in 20ml Kopplungspuffer mit 0,5% NaN_3 bei 4°C gelagert.

Um eventuell verschleppte Antikörper gegen KLH aus der Lösung zu entfernen, wurde die aufgereinigte CNGB1-Antikörperlösung noch über KLH-Sepharose aufgereinigt.

Ansatz:

Antikörperlösung	150 μl
PBS	150 μl
5M NaCl	68 μl
BSA (10mg/ml)	140 μl
H_2O	40 μl
KLH-Sepharose	260 μl
10% NaN_3	3,8 μl

Nach 2 Stunden Inkubation unter Agitation wurde die KLH-Sepharose wieder abzentrifugiert und der Überstand (Antikörper-Lösung) bei -80°C gelagert.

10 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Laminar Air Flow durchgeführt (Heraeus, Hera safe HS18). Die verwendeten Medien und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37°C erwärmt.

10.1 Kultur von HEK293-Zellen

Zur heterologen Expression von CNG-Kanälen wurde die Zelllinie HEK293 (ATCC® Nr.CRL 1573) verwendet. Die humane embryonale Nierenzelllinie (human embryonic kidney cells) wurde durch Transfektion mit dem humanen Adenovirus Typ 5 immortalisiert.

10.1.1 Kulturbedingungen

Die Kultur der HEK293-Zellen erfolgte bei 37°C / 10% CO₂ in DMEM-Medium (Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium) der Firma Gibco (Kat.Nr 21885-025, mit GlutaMAX™, 1000mg/l D-Glucose, Natriumpyruvat), dem 10% FBS (Biochrom) sowie Penicillin/Streptomycin (finale Konzentration 100U Penicillin G, 100µg/ml Streptomycin) zugesetzt wurde.

10.1.2 Transfektion von HEK293-Zellen

Größere Mengen rekombinanten Proteins wurden durch transiente Transfektion von HEK293-Zellen gewonnen. Bei der dabei angewandten Calciumphosphat-Methode bildet sich ein CaPO₄-DNA-Präzipitat, das sich auf den Zellen absetzt und durch Endozytose aufgenommen wird. Die Plasmid-DNA wird unabhängig vom Genom der Wirtszelle transkribiert und das gewünschte Protein in großer Menge exprimiert.

In großen Petrischalen (152cm²) wurden je 3x10⁶ HEK293-Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach 36 Stunden wurde der Transfektionsansatz pipettiert, 20 min bei RT inkubiert und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Über Nacht wurde bei 35°C und 3% CO₂ kultiviert und nach 18 Stunden zweimal mit PBS gewaschen. Insgesamt 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden sie zweimal mit PBS gewaschen, in PBS mechanisch von der Kulturschale gelöst, abzentrifugiert (10 min / 1500rpm) und das Pellet bis zur Isolation der Membranproteine (IV.9.1) bei -80°C gelagert.

Transfektionsansatz pro Platte:

2,5M CaCl ₂	150µl
H ₂ O	ad 3000µl (final)
cDNA	72µg
BBS	1500µl

BBS (2x BES-buffered solution):

BES (N,N-Bis-(2-hydroxy-ethyl)-2-amino-ethansulfonsäure)	0,533g
NaCl	0,818g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,013g
H ₂ O	ad 50ml
pH6,95 mit NaOH einstellen	

2,5M CaCl₂:

CaCl ₂	7,35g
H ₂ O	ad 20ml

PBS:

NaCl	40g
KCl	1g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	14,5g
KH ₂ PO ₄	1,2g
H ₂ O	ad 5000ml
pH7,4 einstellen	

10.1.3 Verwendete Expressionsvektoren

Zur Überexpression rekombinanter CNG-Kanäle in HEK293-Zellen wurden verschiedene Expressionsvektoren verwendet.

Plasmid rCNG4.1, das für CNGB1a aus der Ratte codiert, wurde von Frau Dr. Gerstner aus der Epiphyse kloniert (Sautter et al., 1997). Plasmid rCNG4.3, codierend für das Rattenprotein CNGB1b wurde ebenfalls von Frau Dr. Gerstner publiziert (Sautter et al., 1998). CNGA2, das von Herrn Prof. Biel aus der Kaninchen-Aorta kloniert wurde (Biel et al., 1993) wurde, wie unter IV.1.6 beschrieben, mutiert, um die Erkennungsstelle für den gegen das Mausprotein gerichteten CNGA2-Antikörper (Alomone) in die entsprechende Mausequenz abzuändern. rCNGA4 wurde von Frau Dr. Gerstner in pcDNA3 kloniert (unpublizierte Daten).

10.2 Kultur und genetische Modifikation (Gene Targeting) von murinen embryonalen Stammzellen

Die Deletion des CNGB1 Locus erfolgte in R1 ES-Zellen. Die murine ES-Zelllinie (Nagy Lab) stammt von männlichen 129SvJ-Mäusen. Ein Aliquot der 15. Passage wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Robert Feil zur Verfügung gestellt.

Grundsätzlich wurde nach den Protokollen von „Manipulating the Mouse Embryo“ (Nagy et al., 2003) gearbeitet.

10.2.1 Kulturbedingungen

Die Kultur der ES-Zellen erfolgte bei 37°C / 5% CO₂ im Brutschrank. Als Nährmedium wurde Gibco DMEM High Glucose (Invitrogen, Kat.Nr. 31966-021, mit GlutaMAXTMI, 4500mg/l D-Glucose, Natriumpyruvat) verwendet, dem FBS, LIF, β-Mercaptoethanol und G418 bzw. Ganciclovir zur Selektion zugesetzt wurden.

ES-Medium:

DMEM	399ml
FBS	100ml
LIF (0,5x10 ⁶ U/ml)	1ml
β-Mercaptoethanol (Sigma)	3,5µl

zur Selektion:

G418-Lösung (100mg/ml)	2ml
oder	
Ganciclovir-Lösung (10mM)	100µl

FBS (Fötales Rinderserum):

Für ES-Zellkultur getestetes FBS wurde von Biochrom bezogen (Kat.Nr. S0115, Charge Nr. 437A). Jede Flasche wurde 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

LIF (Leukämie-inhibierender Faktor):

Durch LIF-Zusatz wird eine Ausdifferenzierung der pluripotenten Stammzellen verhindert. In der vorliegenden Arbeit wurde ESGROTM, ein muriner rekombinanter Leukämie-

inhibierender Faktor verwendet (Kat.Nr. ESG1106, Lot Nr. 11051051, Chemicon). Der Stock (10^7 U/ml) wurde in 20ml EF-Medium verdünnt und in 1ml Aliquots bei 4°C gelagert. Die finale Konzentration im Medium betrug 1000U/ml.

G418-Lösung 100mg/ml:

Mit Hilfe von Geneticinsulfat (G418, Kat.Nr. 11811-064, Invitrogen), einer Neomycin-analogen Substanz, wurde eine positive Selektion auf Klone, die den Targetingvektor erfolgreich integriert hatten, durchgeführt. Es wurden Stocks mit 100mg/ml in PBS hergestellt und bei -20°C gelagert. Die finale Konzentration im Medium betrug 0,4mg/ml. Die Zugabe erfolgte 24 Stunden nach der Elektroporation mit dem Targeting-Vektor.

Ganciclovir-Lösung:

Im 2. Targeting erfolgte die Selektion auf die erfolgreiche Deletion des Thymidinkinasegens des Targetingkonstrukts mit Ganciclovir. In Zellen, die die Thymidinkinase noch exprimieren, wird Ganciclovir durch Phosphorylierung aktiviert und die Zellen sterben ab.

Zur Herstellung der Stocks wurde eine Ampulle Ganciclovir-Natrium (Cymeven[®], Roche, PZN 3851388, 500mg Ganciclovir) in 10ml H₂O gelöst, diese Lösung nochmals 1:20 verdünnt und in Aliquots bei -20°C gelagert. Im Medium wurde eine finale Konzentration von 2µM eingesetzt. Die Zugabe erfolgte 48 Stunden nach der Elektroporation mit dem Cre-Plasmid.

Trypsin/EDTA:

Um die ES-Zellen zum Ernten und Passagieren von den Kulturgefäßen zu lösen, wurden sie 9 min bei 37°C mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert. Die Stocklösung (10x Trypsin/EDTA von Invitrogen, Kat.Nr. 35400-027) wurde mit PBS auf 1x Trypsin/EDTA bzw. 2x Trypsin/EDTA verdünnt, in Aliquots bei -20°C weggefroren und nach dem Auftauen bei 4°C gelagert.

Die Kultur der ES-Zellen erfolgte auf Feederzellen (IV.10.2.2). Das Medium der ES-Zellen wurde jeden Tag zur gleichen Zeit (+/- 2 Stunden) gewechselt.

Passagieren / Splitten von ES-Zellkulturen:

Die Stammzellen müssen spätestens bei 60-80%iger Konfluenz des Zellrasens passagiert werden, da die Gefahr besteht, daß die Zellen beginnen auszdifferenzieren, wenn sich die einzelnen Klone im Kulturgefäß berühren. Undifferenzierte Klone erkennt man an einem glatten, schillernden Rand:

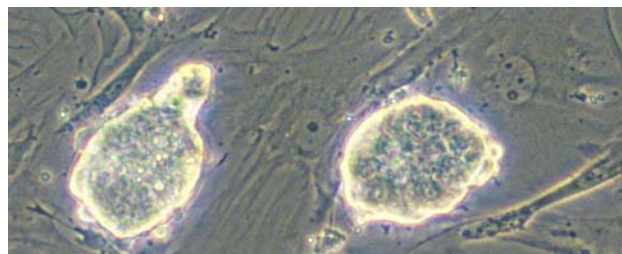


Abbildung 12: ES-Zellklone

Phasenkontrastaufnahme (40fache Vergrößerung). Undifferenzierte Klone sind an der kugeligen, nicht ausgefranst Form und am glatten, schillernden Rand erkennbar.

12 bis 24 Stunden vor der Passagierung wurden Feederzellen ausgesät (IV.10.2.2). Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, dann 9 min bei 37°C mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert. Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe eines vierfachen Volumens ES-Medium gestoppt und die Zellen mit der Pipette vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in den mit Feederzellen vorbereiteten Kulturgefäßen auf der dreifachen Fläche der vorherigen Kultur wieder ausgesät.

Einfrieren der Stammzellen zur weiteren Kultur:

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, dann 9 min bei 37°C mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert. Nach Zugabe des sechsfachen Volumens Einfriermedium (9Vol ES-Medium, 1Vol DMSO) wurden die Zellen gut resuspendiert und langsam (2 Stunden -20°C, dann -80°C) tiefgefroren.

Einfrieren der Stammzellen zur DNA-Isolation:

Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen, bei -20°C weggefroren und wie unter IV.6.2 beschrieben lysiert.

10.2.2 Präparation und Kultur von Feederzellen

Stammzellen werden auf sogenannten Feederzellen oder EF-Zellen kultiviert. Dabei handelt es sich um embryonale Fibroblasten, die Nährstoffe und Cytokine produzieren und so die Differenzierung der Stammzellen verhindern.

Damit die Feederzellen auch unter Selektionsbedingungen wachsen, wurden sie durch Verpaarung eines CNGA3^{-/-}-Männchens mit einem WT-Weibchen gewonnen. Die CNGA3^{-/-}-Mäuse (Biel et al., 1999) tragen eine Neomycinresistenz, bei Verpaarung mit Wildtyp-Mäusen sind somit alle Embryonen heterozygot für das Resistenzgen und die aus ihnen gewonnenen Fibroblasten können in Selektionsmedium überleben. Eine Schwangerschaft wurde angenommen, wenn das Weibchen am Morgen nach der Verpaarung „plug-positiv“ war, also ein vaginaler Pfropf aus Samenflüssigkeit zu sehen war.

Die Embryonen wurden an Tag 14,5 post coitum isoliert. Der Kopf sowie Herz, Leber und Lunge (rotes Gewebe) wurden entfernt, der Rest der Körper kleingeschnitten und in 1ml 1x Trypsin/EDTA pro Embryo 5-10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, mit einer Pipette resuspendiert, nochmals 5-10 min inkubiert und wieder resuspendiert. Durch Zugabe von 1,5ml EF-Medium wurde der Trypsin-Verdau gestoppt, die Zellen nochmals mit der Pipette vereinzelt und 10 min gewartet, bis Zelltrümmer und Gewebereste abgesunken waren. 1ml der verbleibenden Zellsuspension wurde in 20ml EF-Medium in großen Zellkulturflaschen (150cm²) bei 37°C / 5% CO₂ kultiviert. Nach 4 bis 8 Tagen wurden die konfluenten Zellen mit PBS gewaschen und 5-10 min bei 37°C trypsinisiert (4ml 1x Trypsin/EDTA). Die Reaktion wurde mit 6ml EF-Medium abgestoppt, 9ml der Zellsuspension entnommen und 1ml als 2. Passage weiter in der Flasche kultiviert. Insgesamt wurden bis zu 5 Passagen der Feederzellen präpariert. Die Zellsuspensionen wurden vereinigt, 10 min mit 5000rpm zentrifugiert und in 4ml EF-Medium pro Flasche resuspendiert. Durch Röntgenstrahlung wurden die Feederzellen teilungsunfähig gemacht. Nach Bestrahlung der Suspension mit 5000rad wurden die Zellen wieder abzentrifugiert, in Einfriermedium resuspendiert (3 Gefrierstocks à 1ml aus einer großen Flasche) und stufenweise bis auf -80°C eingefroren.

Auftauen der Feederzellen:

Die Feederzellen wurden jeweils 12-24 Stunden bevor sie für die ES-Zellkultur benötigt wurden, ausgesät. Ein Gefrierstock wurde unmittelbar nach dem Auftauen mit 3ml EF-Medium verdünnt, zentrifugiert (5 min / 1000rpm), das Pellet in 5ml EF-Medium resuspendiert und im entsprechenden Volumen Medium im Kulturgefäß ausgesät. 30 Minuten

vor dem Aussähen der ES-Zellen wurde das EF-Medium abgezogen und ES-Medium zugegeben.

EF-Medium:

DMEM	450ml
FBS	50ml

10.2.3 Elektroporation

Die Elektroporation der Zellen mit der linearisierten Plasmid-DNA erfolgte mit einem Gene Pulser von Biorad.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, 8 min trypsinisiert, abzentrifugiert (5 min / 1000rpm), das Pellet zuerst in 7ml ES-Medium aufgenommen und wieder abzentrifugiert, dann in 10ml PBS aufgenommen und das nach nochmaliger Zentrifugation verbleibende Pellet in 700µl PBS resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,4cm, Peqlab) überführt und mit 50µg linearisierter Targetingvektor-DNA beziehungsweise 20µg nichtlinearisiertem Cre-Plasmid in 100µl PBS vorsichtig gemischt. Die Elektroporation wurde mit 500µF und 0,23kV durchgeführt. Die elektroporierten Zellen wurden 5 min bei RT stehen gelassen, dann mit ES-Medium auf 10ml verdünnt und in 10 Petrischalen (58cm²) ausgesät. Beim ersten Targeting wurde bereits beim ersten Mediumwechsel 24 Stunden nach der Elektroporation ES-G418-Selektionsmedium verwendet, beim zweiten Targeting wurde erst nach 48 Stunden mit der Ganciclovir-Selektion begonnen.

Vorbereitung der DNA:

100µg Targetingvektor wurden über Nacht mit XhoI linearisiert und die vollständige Linearisierung durch ein Gelelektrophorese (1µg auf einem 0,7%igen Agarosegel) überprüft. Das Cre-Plasmid wurde ungeschnitten eingesetzt, da hier keine Integration ins ES-Zellgenom erwünscht ist. Die DNA wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt (IV.2.4) und unter der Sterilbank mit NaAcetat / EtOH gefällt (IV.2.3). Die entstehende DNA-Flocke wurde nicht abzentrifugiert sondern mit einer PCR-Spitze aufgenommen, in 70% Ethanol gewaschen und in ein trockenes Cap gelegt. Das Pellet wurde getrocknet, in 100µl PBS gelöst und 1µl der Lösung zur Kontrolle auf ein 0,7%iges Agarosegel aufgetragen.

10.2.4 Isolation selektions-resistenter ES-Zellklone

7 bis 9 Tage nach der Elektroporation wurde mit der Isolation der im Selektionsmedium überlebenden ES-Zellklone begonnen.

Am Vortag wurden Feederzellen auf 2 96Well-Platten ausgesät und zu Beginn der Isolation in einer leeren 96Well-Platte 30µl PBS pro Loch vorgelegt.

Die ES-Zellklone wurden bei 40facher Vergrößerung (Mikroskop Olympus CK30) unter der Sterilbank mit einer 20µl PCR-Spitze von der Petrischale gelöst und in PBS überführt.

Nach der Isolierung von 96 Klonen wurden pro Loch 30µl 2x Trypsin/EDTA zugegeben und 9 min bei 37°C inkubiert. Mit 60µl ES-Medium wurde der Trypsinverdau gestoppt, die Zellen mit einer 8-Kanal-Pipette vereinzelt und je 50µl Zellsuspension pro Loch in die mit Feederzellen beschichteten Platten ausgesät.

11 Blastozysteninjektion modifizierter ES-Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten ES-Zellen stammen aus dem Mausstamm 129SvJ, der bräunliches Fell besitzt. Um den Erfolg der Injektion bereits an der Fellfarbe der Nachkommen abschätzen zu können, wurden Blastozysten der schwarzen Mauslinie C57/B16 verwendet. Die Blastozysten wurden an Tag 3,5 der Schwangerschaft isoliert. Eine Schwangerschaft der Mäuse wurde angenommen, wenn bei den Weibchen am Morgen nach der Verpaarung ein vaginaler Pfropf aus Samenflüssigkeit („plug“) zu sehen war. Einen Tag versetzt wurden Leihmütter mit vasktomierten Männchen verpaart, um scheinchwangere Empfängertiere zu erhalten, denen die Blastozysten an Tag 2,5 post coitum eingesetzt wurden. Die Injektion der ES-Zellen in die isolierten Blastozysten sowie das Einsetzen in die Leihmütter wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Markus Moser und Herrn Prof. A. Pfeifer durchgeführt.

12 Zucht und Haltung genetisch veränderter Mäuse

12.1 Zucht der $CNGB1^{-/-}$ -Mäuse

Die der Blastozysteninjektion entstammenden Nachkommen der Leihmütter (IV.11) wurden zunächst anhand der Fellfarbe beurteilt: Waren die Tiere schwarz, so war davon auszugehen, daß ihre gesamte genetische Information von den Spendertieren der Blastozysten stammte (C57/B16). Braun-schwarz gefleckte Tiere waren dagegen „Chimären“, bei denen ein Teil der Körperzellen die genetische Information des Spendertieres, ein anderer Teil das Genom der modifizierten ES-Zellen trägt.

Da die Stammzellen aus männlichen 129SvJ-Mäusen stammten, wurden die männlichen Chimären wiederum mit C57/B16-Weibchen verpaart. War die Mutation keimbahngängig, waren also die Keimzellen der Chimären aus den modifizierten ES-Zellen entstanden, entstanden braune Nachkommen. Diese waren zur Hälfte Wildtypen, zur Hälfte heterozygot für die $CNGB1$ -Deletion, da die Stammzellen nur auf einem Allel die Modifikation trugen. War die F1-Generation schwarz, so bedeutete dies, daß die Chimäre zwar in einem Teil der somatischen Zellen die $CNGB1$ -Deletion trug, ihn aber nicht an seine Nachkommen weitervererben konnte.

Die heterozygoten Mäuse wurden schließlich untereinander verpaart, um homozygote $CNGB1^{-/-}$ -Mäuse zu erhalten.

Um reine 129SvJ-Tiere zu züchten, wurden die chimären Männchen auch mit 129SvJ-Weibchen verpaart.

12.2 Haltung der Mäuse

Die Mäuse wurden deutschen Vorschriften entsprechend in einem Tierstall gehalten. Sie erhielten Wasser und Futter (Ssniff, Haltungsfutter Ratte/Maus bzw. Zuchtfutter) ad libitum und wurden einem 12h:12h Licht/Dunkelrhythmus ausgesetzt. Die Verpaarung erfolgte im Alter zwischen 6 und 52 Wochen, die Jungtiere wurden bis zur 4. Lebenswoche bei der Mutter belassen. Käuflich erworbene Mäuse wurden von den Firmen Charles River und Janvier bezogen.

13 Gewebeisolierung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Retinae und das olfaktorische Epithel von Mäusen untersucht. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und verschiedene Gewebe entnommen.

Allgemein wurde möglichst schnell und teilweise auf Eis gearbeitet, um eine Degradation von RNA und Proteinen zu vermeiden. Als Waschlösung sowie als Grundlage für Lösungen wurde für die Retina mit 0,1M PB gearbeitet, für Präparate des olfaktorischen Epithels mit PBS (IV.16).

13.1 Retina

13.1.1 Präparation zur RNA- oder Proteinisolation

Die Augen der Tiere wurden entnommen und in gekühltem 0,1M PB zwischengelagert. Unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss) wurde auf einem angefeuchteten Filterpapier mit einer 0,8mm Kanüle an der *ora serrata* eingestochen und mit einer Mikroaugenschere (Mini-Vanas, Schnittfläche 3mm, Frohnhäuser) entlang der *ora serrata* geschnitten. Das Auge wurde wieder in PB überführt und mit zwei Feinpinzetten (Typ #5 Dumont; Fine Science Tools) Hornhaut und Linse entfernt. Durch vorsichtiges Abtrennen vom umliegenden Gewebe wurde die Retina isoliert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren bzw. für die RNA-Isolation in RNAlater überführt.

13.1.2 Präparation für immunhistochemische Untersuchungen

Um die Orientierung der Retina bis zu den Gefrierschnitten verfolgen zu können, wurden an der toten Maus mit einer glühenden Nadel Markierungen auf den vorderen Augapfel gesetzt. Das Auge wurde entnommen, an der *ora serrata* mit einer Kanüle angestochen und sofort für 5 Minuten in 4% PFA / 0,1M PB präfixiert. Anschließend wurden wie unter IV.13.1.1 beschrieben Hornhaut und Linse entfernt und dabei die eingebrannten Markierungen zur Orientierung in kleine Schnitte in den Rand der Retina umgesetzt. Die Augen wurden nun für weitere 1,5 Stunden bei 4°C in 4% PFA / 0,1M PB fixiert. Nach drei Waschschrritten in 0,1M PB zur Entfernung des überschüssigen Fixativs wurden sie über Nacht bei 4°C in 30% Sucrose kryoprotectiert und am nächsten Tag in OCT (Einbettmedium Tissue Tek, Kat.Nr. 4583, SCI Science Services) eingebettet. Durch Lagerung auf Trockeneis wurde das Einbettmedium fest und die Präparate konnten bei -80°C gelagert werden.

13.1.3 Präparation für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Augen wurden wie unter IV.13.1.1 beschrieben präpariert und 10 min präfixiert. Der zentrale Bereich der Retinae wurde isoliert. Die Postfixierung erfolgte über Nacht bei 4°C in 2,5% Glutaraldehyd / 0,1M Natriumcacodylat. Nach einem 2stündigen Waschschrtritt in 0,1M Natriumcacodylat (4°C) wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 1% Osmiumtetroxid / 0,1M Natriumcacodylat fixiert. Von nun an wurde durchgehend bei Raumtemperatur gearbeitet. Drei 10minütige Waschschrritte mit H₂O dienten der Entfernung des überschüssigen Fixativs, bevor 30 min in 25%iger DMSO-Lösung und 30 min in 50%iger DMSO-Lösung kryoprotectiert wurde. Die Retinae wurden nun in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einer vorgekühlten Pinzette einer Gefrierfrakturierung (freeze fracture) unterzogen. Die Fragmente wurden in 50% DMSO wieder aufgetaut. Zur Entfernung des DMSO wurde dreimal mit 0,1M Natriumcacodylat gewaschen und die Fragmente nochmals für eine Stunde mit 1% Osmiumtetroxid / 0,1M Natriumcacodylat postfixiert. Das

Fixativ wurde mit 0,1M Natriumcacodylat wieder ausgewaschen (2 x 10 min) und die Fragmente in einer Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 95% je 10 min, 100% 30 min, 100% 10 min) dehydriert. Die Fragmente wurden in einem Exsiccator getrocknet und wie unter IV.17.2 beschrieben mikroskopiert.

13.1.4 Präparation für transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen

Nach Präparation der Augen wie unter IV.13.1.1 beschrieben wurde 2 min in 4% PFA / 0,1M PB präfixiert und die Retinae im Anschluß isoliert und in kleine Fragmente geschnitten. Die Fixierung erfolgte für 45 min in 2,5% Glutaraldehyd / 4% PFA / 0,1M PB. Nach je drei 10minütigen Waschschritten in 0,1M PB und 0,1M Natriumcacodylat wurde für eine Stunde mit 1% OsO₄ / 0,1M Natriumcacodylat fixiert. Es folgten je 15 min Inkubation in 30% und 50% Ethanol sowie eine Blockkontrastierung mit 2% Uranylacetat in 70% Ethanol für eine Stunde. Nach Dehydrierung in einer Ethanolreihe sowie in Ethanol / Aceton wurden die Präparate in Kunstharz (Epon, Fluka) eingebettet.

13.2 Olfaktorisches Epithel

13.2.1 Präparation zur RNA- oder Proteinisolation

Der Schädel der toten Maus wurde längs gespalten, aufgeklappt und die Nasenscheidewand entfernt, so daß die Turbinalien gut sichtbar waren und mit einer Pinzette unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss) isoliert werden konnten.

Zur RNA-Isolation (IV.8.1) wurden sie sofort zur Deaktivierung der RNAsen in 100µl RNAlater (Quiagen) überführt und bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Wurde das Gewebe zur Proteinisolation benötigt, so wurde es in Eppendorfcaps direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

13.2.2 Präparation für immunhistochemische Untersuchungen

Zur Einbettung und späteren Anfertigung von Gefrierschnitten wurde der vordere (bis ca. 0,5cm hinter dem olfaktorischen Bulbus), obere (Entfernung des Unterkiefers) Quadrant des Mausschädels isoliert.

Er wurde zunächst für 1,5 Stunden in 4% PFA / PBS fixiert, dann in drei Waschschritten in PBS das überschüssige Fixativ wieder entfernt. Es folgte eine Dekalzifizierung in unverdünntem RDO (Rapid Decalcifier, APEX Engineering Products) für 1,5 bis 2 Stunden. Der Endpunkt wurde dabei durch Druck auf das Nasenbein manuell ermittelt. Nach drei Waschschritten in PBS zur Entfernung des Dekalzifizierungsmittels wurde das Gewebe 1 Stunde bis über Nacht zur Kryoprotektion in 30% Succrose / PBS geschwenkt, eine weitere Stunde in 50% Succrose / PBS sowie je eine Stunde in einem Gemisch (1:1) aus 50% Succrose und OCT (OCT-Einbettmedium, Tissue Tek Kat.Nr. 4583, SCI Science Services) und reinem OCT inkubiert. Die letzten beiden Schritte erfolgten gegen Ende der Inkubationszeit für 5 Minuten im Vakuum (Heraeus Vacutherm VT 6025), um das Eindringen des zähflüssigen Einbettmediums in die Nasenhöhle zu forcieren. Die Präparate wurden in vorgefertigten Aluminiumtöpfchen in OCT bis zum Erstarren des Einbettmediums gekühlt und bei -80°C gelagert.

14 Anfertigung von Gefrierschnitten

Von den in OCT eingebetteten Geweben (IV.13) wurden in einem Kryotom der Firma Microm (HM-500) Gefrierschnitte angefertigt. Die Präparate wurden mit OCT auf Schneidetellern (Microm) befestigt und bei -30°C (Retina) bzw. -27°C (Schnauzen) $10\mu\text{m}$ (Retina) bzw. $12\mu\text{m}$ (Schnauzen) dicke serielle Schnitte angefertigt, die auf Superfrost Plus Objektträger (Roth) geschmolzen wurden, bei Raumtemperatur getrocknet und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert wurden.

15 Histologie

15.1 Nissl-Färbung

Zur Visualisierung von Gewebestrukturen sowie zur Beurteilung von Schnittebene und Qualität der Gefrierschnitte wurde die Nissl-Färbemethode verwendet.

Dabei werden durch eine 1% Kresylviolettacetat-Lösung Zellkerne sowie die basophile Nisslsubstanz (RNA-reiches rauhes endoplasmatisches Retikulum) angefärbt. Die Schnitte wurden zunächst 20 sec gefärbt, dann achtmal in 70% Ethanol getaucht und schließlich für 30 sec in 100% Ethanol belassen. Zur Erhaltung der gefärbten Schnitte wurde teilweise nach Xylol-Behandlung mit Roti-Histoclear (Roth) eingedeckelt.

Nissl-Reagenz:

Kresylviolett	1g
Essigsäure konz.	250 μl
H ₂ O	ad 100ml

15.2 Hoechst-Färbung

Im Anschluß an fluoreszenzimmunhistochemische Färbungen wurden die Zellkerne, falls angebracht, mit Hoechst visualisiert. Dazu wurden die Gewebeschnitte für 7 Minuten mit einer wässrigen Hoechst-Verdünnung ($5\mu\text{g/ml}$, Hoechst 33342, Molecular Probes) inkubiert und überschüssiger Farbstoff in drei Waschschrinen wieder entfernt.

16 Immunhistochemie

Durch immunhistochemische Färbemethoden können Aussagen zur Expression von Proteinen, ihrer Lokalisation im Gewebe sowie die Kolo-kalisation mit anderen Proteinen getroffen werden. Dabei dienen die Proteine als Antigene für hochspezifische Antikörper. Diese werden nach ihrer Anlagerung durch gegen Immunglobuline der Spezies des Primärantikörpers gerichtete, meist fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper visualisiert.

Die bei -20°C gelagerten Gewebeschnitte wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Um das Volumen benötigter Lösungen zu minimieren, wurde jeder Schnitt auf dem Objektträger mit einem Fettstift (Super PAP-Pen liquid blocker, SCI Science Services) umkreist. Generell wurde darauf geachtet, daß die Schnitte nicht austrocknen konnten, um unspezifisches Anlagern oder Ausfällen der Antikörper zu vermeiden. Es wurde zügig gearbeitet sowie die Inkubation in einer mit feuchtem Papier ausgekleideten verschließbaren Kunststoffbox durchgeführt.

Grundsätzlich wurden Retina-Schnitte in 0,1M PB behandelt, Schnitte des olfaktorischen Epithels dagegen in PBS. Wurde mit dem CNGB3 Antikörper detektiert, so wurde 0,1M PB verwendet, dem 1,2M NaCl zugesetzt wurden. Dadurch wurde die Spezifität des Antikörpers erhöht und störendes Background-Signal minimiert.

Zur Maskierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte mit Normal Goat Serum (NGS, Vector) blockiert. Sollte die Detektion der Antigene mit einem Ziegen-Antikörper erfolgen so wurde mit Normal Chicken Serum (NCS, Vector) geblockt. Um den Antikörpern das Binden an die Antigene zu erleichtern, wurde der Blockier- und Inkubationslösung Triton[®]X-100, teils auch Tween 20 zur Permeabilisierung zugesetzt. Die Inkubation mit den Sekundäantikörpern erfolgte in 2% NGS bzw. NCS. Zum Eindeckeln der Schnitte wurde Permafluor Aqueous Mounting Medium (PN IMO752, Beckman Coulter) verwendet.

Standardprotokoll:

	Retina	olfaktorisches Epithel
Rehydrieren	5 min 0,1M PB	-
Fixieren	10 min 4% PFA	15 min 4% PFA
Waschen	3 x 5 min 0,1M PB	3 x 5 min PBS
Blockieren	Blockierlösung Retina 1 – 4 h, RT	Blockierlösung olf. Epithel über Nacht, 4°C
	Blockierlösung abgießen	Blockierlösung abgießen
Inkubation mit Primäantikörper	Inkubationslösung Retina, über Nacht, 4°C	Inkubationslösung olf. Epithel, 4h, RT
Waschen	3 x 5 min 2% NGS	3 x 5 min 2% NGS
Inkubation mit Sekundäantikörper	in 2% NGS 1-2 h, RT bei biotinyliertem 2. AK: 3 x 5 min Waschen in 2% NGS Streptavidin 547 1:1000 in 2% NGS, 1h, RT	in 2% NGS 1 – 2 h, RT bei biotinyliertem 2. AK: 3 x 5 min Waschen in 2% NGS Streptavidin 547 1:1000 in 2% NGS, 1h, RT
Waschen	1 x 5 min 2% NGS	1 x 5 min 2% NGS
Waschen	2 x 5 min 0,1M PB	2 x 5 min PBS
Visualisierung der Zellkerne (optional)	Gegenfärbung mit Hoechst 33342 danach 3 x 5 min 0,1M PB	-
	eindeckeln in Permafluor	eindeckeln in Permafluor

Um mehrere Proteine gleichzeitig zu detektieren wurden entweder direkt fluoreszenzmarkierte Primäantikörper (IV.16.2) oder ein Gemisch der entsprechenden Primäantikörper verwendet, das dann mit einem Gemisch von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Sekundäantikörpern detektiert wurde. Im letzten Fall konnten nur Primäantikörper aus unterschiedlichen Spezies zusammen verwendet werden.

Die Auswertung der immunhistochemischen Experimente erfolgte konfokalmikroskopisch, wie unter IV.17.1 beschrieben.

Verwendete Lösungen:**PB 0,2M:**

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	28,48g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	5,52g
H ₂ O	ad 1000ml
pH7,4 einstellen; unmittelbar vor Gebrauch Verdünnung auf 0,1M und Sterilfiltration	

PBS:

NaCl	40g
KCl	1g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	14.5g
KH ₂ PO ₄	1.2g
H ₂ O	ad 5000ml
pH7,4 einstellen	

4% PFA:

Paraformaldehyd (Merck)	6g
0,1M PB bzw. PBS	ad 150ml
bei 60°C lösen, nach Abkühlung sterilfiltrieren und bei -20°C lagern	

Blockierlösung:

	Retina	olf.Ep.
NGS bzw. NCS	10%	10%
Triton [®] X-100	0,3%	1%
Tween 20	-	0,2%
in 0,1M PB bzw. PBS		

Inkubationslösung:

	Retina	olf.Ep.
NGS bzw. NCS	5%	5%
Triton [®] X-100	0,3%	0,5%
in 0,1M PB bzw. PBS		

2% NGS bzw. 2% NCS:

NGS bzw. NCS	2%
in 0,1M PB bzw. PBS	

16.2 Fluoreszenzmarkierung von Primärantikörpern

Bei direkter Markierung von Primärantikörpern entfällt die Detektion mit Sekundärantikörpern. So können mehrere Primärantikörper aus der gleichen Spezies auf demselben Schnitt eingesetzt werden.

Die Markierung der Antikörper erfolgte mit NHS-Estern der Firma Dyomics. NHS-Ester (N-Hydroxysuccinimidylester) gehen bei pH8-9 kovalente Bindungen mit Aminogruppen von Peptiden ein. Die Ester DY-631 sowie DY-547 wurden verwendet, um Antikörper gegen CNGA3, CNGB3 sowie CNGB1 direkt mit violetten bzw. roten Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren.

Der Ester wurde in wasserfreiem DMSO (Fluka) gelöst (10mg/ml). 30µg Antikörper wurden mit Microcon YM-30 Säulchen umgesalzen und von NaN₃ befreit. Dazu wurde die Lösung mit Natriumbicarbonat-Puffer auf 250µl verdünnt und in den Säulchen 15 min bei 4°C mit 12000rpm zentrifugiert. Die verbleibende, konzentrierte Antikörperlösung wurde über Kopf mit 3500rpm in 3 min wieder aus den Säulchen in frische Caps abzentrifugiert.

Es wurden 1µl NHS-Esterlösung pro Milligramm Antikörper zugesetzt und der Ansatz für 1 Stunde unter Lichtschutz geschüttelt.

Die Aufreinigung erfolgte nach Verdünnung mit PBS ad 300µl wieder über eine Microcon-Säule, es wurde nochmals 15 min bei 4°C mit 12000rpm zentrifugiert. Durch Umdrehen der Säule wurde die verbleibende Antikörperlösung wieder in Caps abzentrifugiert und der Antikörperlösung BSA (finale Konzentration 1mg/ml) sowie NaN₃ (0,05%) zugesetzt.

Natriumbicarbonat-Puffer pH9,0:

NaHCO ₃	2,1g
H ₂ O	ad 500ml
pH9,0 einstellen	

16.3 Lektin-Histochemie

Lektine oder Agglutinine besitzen eine hohe Affinität zu einzelnen Oligosacchariden.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Erdnuß-Lektin aus *Arachis hypogaea* (PNA, Peanut agglutinin) bindet in der Retina spezifisch an Galaktosyl(β-1,3)N-acetylgalaktosamin-Reste, extrazelluläre Strukturen der Zapfen-Photorezeptoren (Blanks und Johnson, 1984). Es wurde daher zur Visualisierung der Zapfen in immunhistochemischen Experimenten verwendet.

Biotin- oder FITC-markiertes PNA (Sigma) wurde in einer Verdünnung von 1:100 entweder der Sekundäntikörper-Lösung zugesetzt oder in 2% NGS im Anschluß an die immunhistochemische Detektion aufgebracht. Biotinyliertes PNA wurde in einem zweiten Schritt mit fluoreszenzmarkiertem Avidin visualisiert (FITC-Avidin, Rockland oder DY-547-SA, Dyomics).

17 Mikroskopie**17.1 Laser-Konfokalmikroskopie**

Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen erfolgte an einem LSM 510 Meta Laser-Konfokalmikroskop der Firma Zeiss.

Folgende Laser wurden dabei verwendet:

Laser	benutzte Laserlinien:	verwendet für Farbstoffe:
UV	351 nm	Hoechst
Argon2	488 nm	FITC
HeNe/1	543 nm	Alexa 594, Cy3, DY-547
HeNe/2	633 nm	DY 630, DY 631

Gleichzeitig wurden auch DIC-mikroskopische Aufnahmen der Schnitte gemacht.

17.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Mintova vom Institut für physikalische Chemie (LMU München) durchgeführt.

Die Proben wurden wie unter IV.13.1.3 beschrieben vorbereitet, mit Carbon-Klebestreifen auf Aluminiumtellerchen aufgebracht und mit Gold bestäubt, um die Elektronendichte zu erhöhen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem Rasterelektronenmikroskop XL 40 der Firma Philips.

17.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die Einbettung der Gewebeproben erfolgte wie unter IV.13.1.4 dargestellt. Nach Anfertigung ultradünner Schnitte wurden im Labor von Frau Dr. Haverkamp (MPI für Hinforschung, Frankfurt) wie in Claes et al. (2004) beschrieben elektronenmikroskopische Aufnahmen mit einem EM10 (Zeiss) erstellt.

18 Elektroretinogramm

Im Arbeitskreis von PD Dr. Mathias Seeliger (Universitäts-Augenklinik, Tübingen) wurden die CNGB1-defizienten Mäuse, wie in Seeliger et al. (2001) beschrieben, mit Hilfe von Ganzfeld-Elektroretinogrammen (ERGs) auf ihre Sehfunktion getestet.

Im Blitz-ERG wird die gesamte Retina durch Lichtreize aktiviert und die resultierenden elektrischen Antworten gemessen. Es dient bei Dunkeladaptation (skotopische Bedingungen) der Beurteilung der Stäbchenfunktion, bei vorheriger Helladaptation (photopische Bedingungen) als Funktionstest der Zapfen. Beides wurde bei den CNGB1-defizienten Mäusen durchgeführt.

Die Mäuse wurden für 12 Stunden dunkeladaptiert und anästhesiert. Kreisförmige Elektroden wurden an jedem Auge in direkten Kontakt mit der Cornea gebracht und die Referenzelektrode an der Stirn befestigt. Auf einem Wärmebett wurden die Tiere in eine Perimeterkugel eingebracht und steigenden Blitzintensitäten von 10^{-4} cds/m² bis 25cds/m² ausgesetzt. Durch eine Hintergrundbelichtung mit 30 cd/m² wurde das Stäbchensystem gesättigt und mit einer erneuten Serie von Blitzen nur die elektrischen Antworten des Zapfensystems aufgezeichnet.

V. Ergebnisse

1 Analyse des CNGB1-Locus

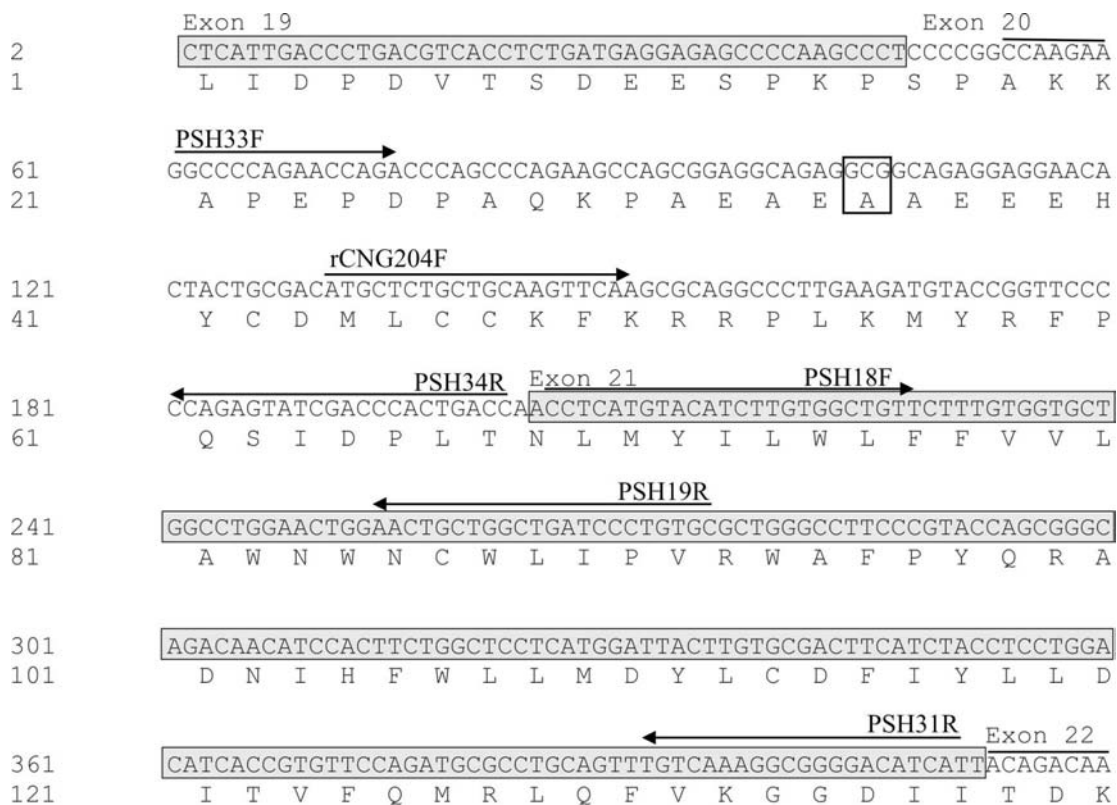
Um einen Targetingvektor für den murinen CNGB1-Locus konstruieren zu können, wurde zunächst das murine CNGB1-Gen, dessen Sequenz bei Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht veröffentlicht war, soweit als möglich sequenziert und eine Übersicht über die Schnittstellen für Restriktionsenzyme erstellt.

1.1 Codierende Sequenz

Mit degenerierten Primern, die anhand der CNGB1-Sequenz der Ratte ausgewählt wurden, wurde aus muriner Retina-cDNA die codierende Sequenz im Bereich der Exons 19 bis 30 mittels PCR amplifiziert und sequenziert.

Abbildung 13 zeigt den im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Teil der codierenden Sequenz des murinen CNGB1-Locus. Mittlerweile wurde die murine CNGB1b-Sequenz veröffentlicht (Strausberg et al., 2002, Accession Nr. BC046523). Sie unterscheidet sich von der in dieser Arbeit ermittelten Sequenz in einer Base bzw. einer Aminosäure, die in Abbildung 13 durch einen schwarzen Rahmen gekennzeichnet ist. Die veröffentlichte Sequenz trägt hier GTG statt GCG, also ein Valin statt Alanin im Protein. Der entsprechende Bereich wurde mehrmals von verschiedenen Chargen cDNA amplifiziert und sequenziert, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die hier vorgestellte Sequenz dem nativen Kanal unserer Wildtyp-Mäuse entspricht.

Ausgehend von den Exon-Intron-Grenzen des humanen CNGB1-Locus (Ardell et al., 2000) wurden in jedes Exon mindestens ein forward- und ein reverse-Primer gelegt, die ebenfalls in Abbildung 13 eingezeichnet sind.



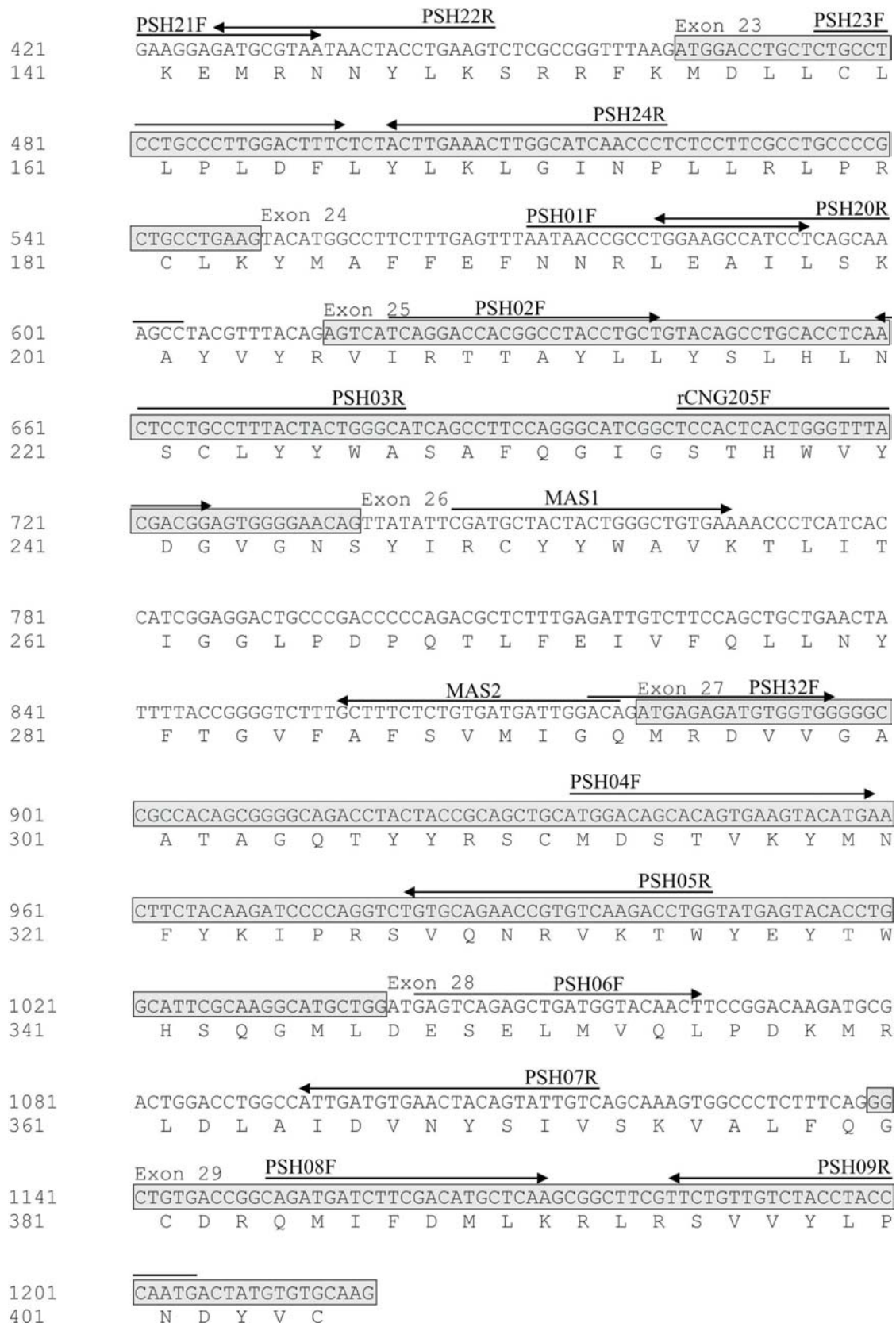


Abbildung 13: codierende Sequenz von mCNGB1 (Ausschnitt)

Um einen Überblick über die Exongrenzen zu geben, ist jedes zweite Exon grau markiert. Die forward- und reverse-Primer, die in jedes Exon gelegt wurden, sind als schwarze Pfeile dargestellt. Die schwarz umrandete Box markiert das Basentriplett, das von der veröffentlichten Sequenz abweicht.

Auch der absolute C-Terminus des Proteins wurde mit degenerierten Primern amplifiziert und sequenziert (Abbildung 14). Gegen das durch eine graue Box markierte C-terminale Epitop wurde ein polyklonaler Antikörper zur Detektion von mCNGB1 hergestellt (V.2).

```

GGACCCTCCGAAGCCACCAGGGCCACCAGAGCCCTCAGCCCAGAGCTCTCCACCTCCAGC
  D P P K P P G P P E P S A Q S S P P P A

CTCAGCAAAGCCCCGAGGAAAGCACGGGGGAGGCAGCAGGGCCCCCGGAGCCCTCGGTGAG
  S A K P E E S T G E A A G P P E P S V R

GATCCCGTGTGAGTCCAGGCCCTGATCCCGGGGAGCAGACACTGTCCGGTGGAGGTGCTGGA
I R V S P G P D P G E Q T L S V E V L E

GGAGAAGAAAAGAGGGGGCGGAGTGAGGTGCATGAAGCGCCCAGATCCCATCCCCAGACCT
  E K K E G A E

TTGAACCACCTGCCTC

```

Abbildung 14: codierende Sequenz und Aminosäuresequenz des C-Terminus von mCNGB1

1.2 Genomische Sequenz: Sequenzierung des CNGB1-BAC-Klons

Das BAC-System (bacterial artificial chromosome) ist ein rekombinantes Plasmid, das durchschnittlich 120kb große DNA-Fragmente im pBeloBAC11 Vektor trägt und in den *E. coli* Stamm DH10B elektroporiert wurde.

Von Genome Systems wurde ein BAC-Klon aus einer Bibliothek genomischer Maus-DNA bezogen, der durch Screening mit dem Primerpaar MAS1 – MAS2 (Exon 26) positiv auf das CNGB1-Gen getestet worden war. Wie sich im Laufe der Arbeit zeigte, enthält er den CNGB1-Locus zumindest von Exon 19 bis 33, was zur Erstellung der Targetingstrategie ausreichend war.

Mit je einem Intron-überspannenden Primerpaar (Abbildung 13) wurde mittels ELT-PCR das jeweilige Intron amplifiziert und auf einem 0,7%igen Agarosegel aufgetragen, um die Größe des Introns abschätzen zu können.

Die Sequenzierung der Introns erfolgte, soweit möglich, direkt aus einer Maxipräp des CNGB1-BAC-Klons, zunächst mit den Exonprimern, später mit Sequenzierprimern, die in die bereits bekannte Intronsequenz gelegt wurden. Es zeigte sich, daß die Exon/Intron-Struktur des murinen Gens mit der Struktur des humanen Locus übereinstimmt (Ardell et al., 2000). Alle verwendeten Exon- und Intronprimer sind im Anhang unter VIII.1 aufgeführt.

Die sequenzierten Fragmente der codierenden Sequenz sowie der Introns wurden zur genomischen CNGB1-Sequenz zusammengesetzt. Sie ist im Anhang unter VIII.3 zu finden. Der Vergleich mit Contigs aus Gendatenbanken, die mittlerweile veröffentlicht sind, zeigt nur geringfügige Unterschiede in einzelnen Basenpaaren.

1.3 Erstellung einer Restriktionskarte des CNGB1-Locus

Die ermittelte genomische Sequenz wurde einer Restriktionsanalyse unterzogen, um geeignete Schnittstellen zu finden, über die die Konstruktion eines Targeting-Vektors erfolgen konnte.

Um die durch Sequenzierung ermittelten Schnittstellen für Restriktionsenzyme zu bestätigen, sowie weitere Schnittstellen außerhalb des sequenzierten Bereichs zu bestimmen, wurden Southern Blot Analysen durchgeführt (IV.7).

Die DNA des BAC-Klons wurde mit gängigen Restriktionsenzymen verdaut (XmaI, SacI, BamHI, AgeI, NotI, Acc65I, EcoRI, HindIII, XhoI, XhoI / EcoRV) und auf 0,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Über Nacht wurde die DNA auf eine Nylonmembran geblottet und im Anschluß mit verschiedenen Exon-Sonden hybridisiert (für eine Übersicht der verwendeten Sonden siehe VIII.4). Aus der Größe der Banden wurde die Entfernung der beiden Schnittstellen des jeweiligen Enzyms ermittelt.

So konnte eine detaillierte Restriktionskarte im Bereich der Exons 19 bis 30 (codierend für die Transmembransegmente 1-6, die Pore sowie den Beginn der CNBD) erstellt werden (Abbildung 15). Die Enzyme NotI und XhoI schneiden innerhalb der untersuchten Sequenz nicht.

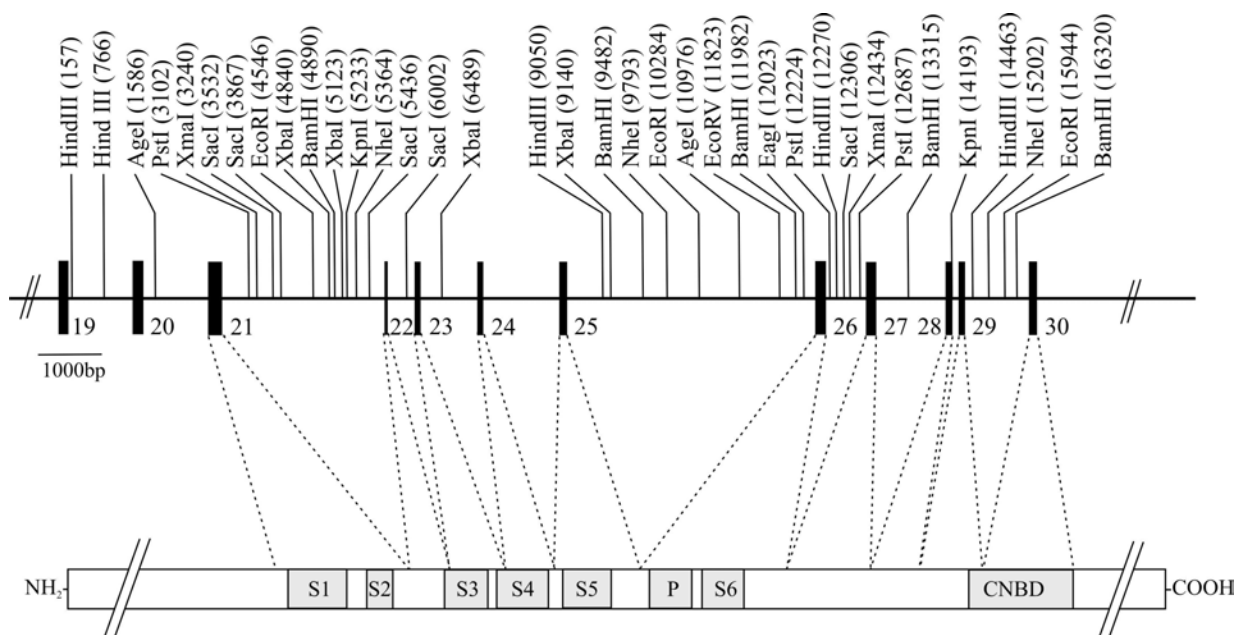


Abbildung 15: Restriktionskarte des CNGB1-Locus und Exon-Intron-Struktur (Exons 19 - 30)

Oben: CNGB1-Locus. Exons 19 bis 30 sind als schwarze Boxen dargestellt und die Schnittstellen wichtiger Restriktionsenzyme markiert. Unten: Kernregion des CNGB1-Proteins. Die Transmembransegmente (S1 bis S6), die Pore (P) sowie die Zyklonukleotid-Bindungsdomäne (CNBD) sind als graue Balken dargestellt. Gestrichelte Linien zeigen an, welches Exon für welchen Bereich des Proteins codiert. Die Zählung der Basenpaare beginnt in Exon 19, s. Sequenz im Anhang unter VIII.3 .

Durch Verdau von genomischer DNA und anschließender Southern Blot Analyse wurden einige der aus dem BAC-Klon ermittelten Schnittstellen nochmals auf ihre Richtigkeit überprüft.

2 Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen CNGB1

Um im Western Blot und immunhistochemisch alle Spleißvarianten von CNGB1 nachweisen zu können, wurde ein Antikörper gegen den C-Terminus des Proteins hergestellt. Ein Fusionsprotein aus der C-terminalen Sequenz EAAGPPEPSVRIRVSPGP und KLH wurde synthetisiert, Kaninchen damit immunisiert und das Antiserum, wie unter IV.9.4 beschrieben, aufgereinigt. Die Lösung des polyklonalen Antikörpers wurde in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt.

Im Western Blot detektierte der Antikörper spezifisch die 120kDa bzw. 240kDa große CNGB1-Bande aus Membranpräparationen von HEK-Zellen, die mit den entsprechenden Expressionsvektoren für CNGB1a und CNGB1b (IV.10.1.3) transfiziert worden waren (Abbildung 16).

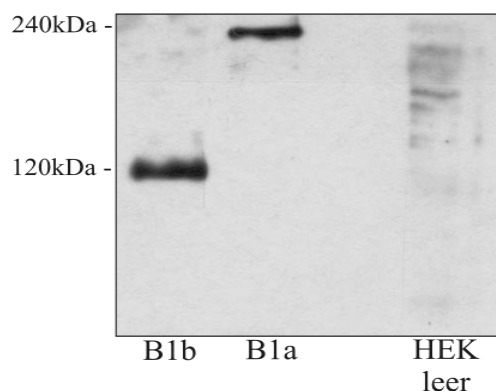


Abbildung 16: spezifische Detektion des CNGB1-Proteins durch den C-terminalen Antikörper

Aufgetragen sind von links nach rechts Membranpräparationen von HEK293-Zellen, die mit CNGB1b und CNGB1a transfiziert wurden sowie nicht transfizierte HEK293-Zellen (ganz rechts)

3 Konstruktion eines Targetingvektors für die Deletion von mCNGB1 mittels Gene Targeting

Gene Targeting, die gezielte Modifikation eines Gens im Genom embryonaler Stammzellen durch homologe Rekombination, und die nachfolgende Injektion dieser modifizierten Stammzellen in Blastozysten ist heute eine gängige Methode zur Einführung von Deletionen, Insertionen und Mutationen ins Genom von Mauslinien. Auf diese Weise erzeugte transgene Mauslinien sind in den letzten 15 Jahren wichtige Modelle zur Untersuchung der *in vivo* Funktion von Genen geworden. Der klassische Ansatz zur Generierung einer KO-Maus führt dabei eine Resistenzkassette, meist ein Neomycinresistenzgen, an essentieller Stelle in den Locus ein, der durch die Insertion zerstört beziehungsweise inaktiviert wird. Die Zellen, bei denen eine Integration stattgefunden hat, können durch Kultur in einem Neomycin-haltigen Medium selektiert und zur Injektion in Blastozysten kultiviert werden.

Heute stehen der klassischen Methode der Geninaktivierung neue Ansätze gegenüber, die eine Vielzahl von Modifikationen des Mausgenoms ermöglichen (Übersicht in Metzger et al. (1999), Müller et al. (1999), Nagy (2000) oder Kwan (2002)). So können Gene, die bei „klassischen“ KO-Mäusen zu einem letalen Phänotyp führen würden, zeitlich kontrolliert und / oder organspezifisch deletiert werden. Diese Möglichkeit erschließt vor allem die Cre-

Rekombinase (Cre = cyclization recombination), ein 38kDa-Protein, das die Rekombination zweier Erkennungsstellen, sogenannter loxP-Seiten, katalysiert (Hamilton und Abremski, 1984). Eine loxP-Seite (locus of crossover/X-over of P1) ist eine Sequenz von 34bp, die aus einer 8bp langen asymmetrischen Kernregion und zwei sie flankierenden, zueinander palindromischen 13bp langen Sequenzen besteht (Abbildung 17). Die asymmetrische Kernregion führt zu einer Orientierung der loxP-Seite, die schematisch als eine von 5' nach 3' weisende Pfeilspitze dargestellt wird. Die Cre-Rekombinase erkennt hochspezifisch im Genom integrierte loxP-Seiten und rekombiniert die Kernregionen, „vertauscht“ also die DNA-Stränge auf einer Seite der loxP-Seiten. Je nachdem, ob zwei gleichgerichtete oder zwei gegenläufige loxP-Seiten kombiniert werden und ob die Rekombination intramolekular, also innerhalb eines DNA-Strangs, oder intermolekular, zwischen zwei unabhängigen DNA-Molekülen, stattfindet, kommt es zur Exzision, Integration, Inversion oder Translokation von Genabschnitten, wie in Abbildung 17 dargestellt ist (Metzger und Feil, 1999).

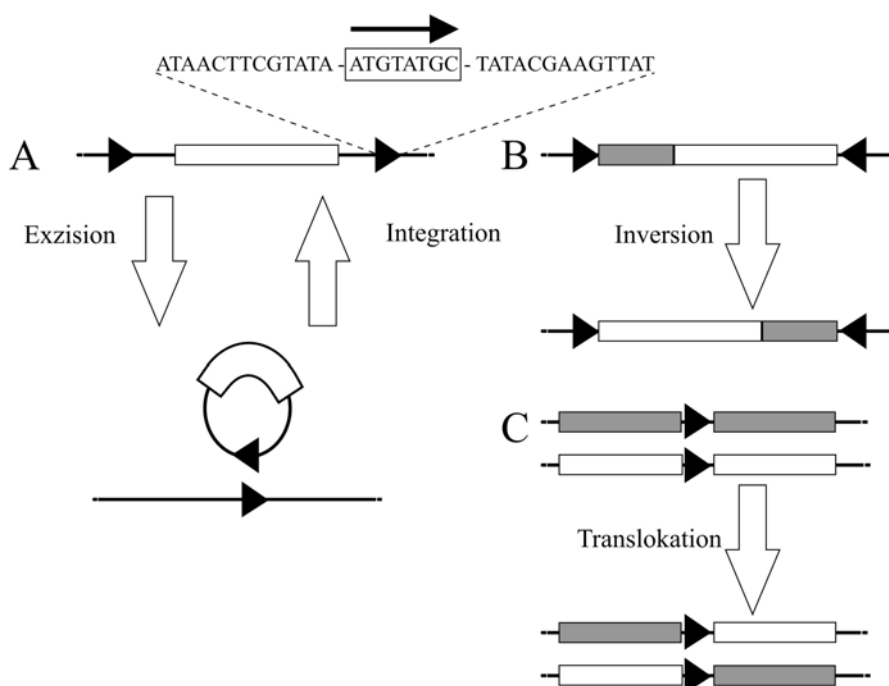


Abbildung 17: Cre-vermittelte Rekombination

Oben: loxP-Sequenz. A) – C) Möglichkeiten Cre-vermittelter Rekombination. Die loxP-Seiten sind als schwarze Dreiecke dargestellt, DNA-Abschnitte als weiße oder graue Balken. A) Exzision bei gleichgerichteten loxP-Seiten und intramolekularer Rekombination sowie Integration bei gegenläufigen loxP-Seiten und intermolekularer Rekombination. B) Inversion bei gegensätzlich gerichteten loxP-Seiten und intramolekularer Rekombination. C) Translokation bei gleichgerichteten loxP-Seiten und intermolekularer Rekombination.

Die Targetingstrategie für den CNGB1-KO wurde so gewählt, daß sowohl Mauslinien mit konstitutiver Deletion als auch mit konditionaler Deletion des Gens generiert werden konnten. Einen konditionalen Knockout erhält man durch Einführung zweier loxP-Seiten links und rechts des zu untersuchenden Gens („gefloxtes Gen“). Durch gezielte Verkreuzung einer solchen Mauslinie mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase ubiquitär, induzierbar oder unter Kontrolle eines zellspezifischen Promotors exprimieren, wird das gefloxt Gen je nach Promotor zeitlich oder räumlich (organ- oder zelltypspezifisch) selektiv deletiert.

Für den konstitutiven Knockout eines Gens bietet das Cre/loxP-System den Vorteil, daß die Resistenzkassette gefloxt und Cre-vermittelt wieder aus dem Genort entfernt werden kann, um eine Beeinflussung des Phänotyps durch die Insertion auszuschließen.

Meist wird nicht das ganze Gen deletiert, sondern lediglich ein kleiner, essentieller Bereich, ohne den das Protein nicht mehr exprimiert wird oder zumindest nicht mehr funktionell ist. Die Deletion größerer Genabschnitte oder ganzer Gene ist zum einen aufwendiger, zum anderen birgt sie die Gefahr, daß das Fehlen großer Bereiche im Genom sich auf benachbarte Gene auswirkt. Zur Inaktivierung von mCNGB1 wurde die Deletion von Exon 26 gewählt. Es codiert für die Pore sowie für Transmembransegment 6 des Kanals und bei seiner Deletion kommt es zu einer Leserahmenverschiebung, die unmittelbar zu Beginn von Exon 27 zum Austausch einer Aminosäure und einem darauffolgenden Stopcodon führt. Es kann davon ausgegangen werden, daß das trunkierte Protein aus den Exons 1 bis 25, sollte es exprimiert werden, nicht funktionell ist, da ihm Pore und CNBD fehlen.

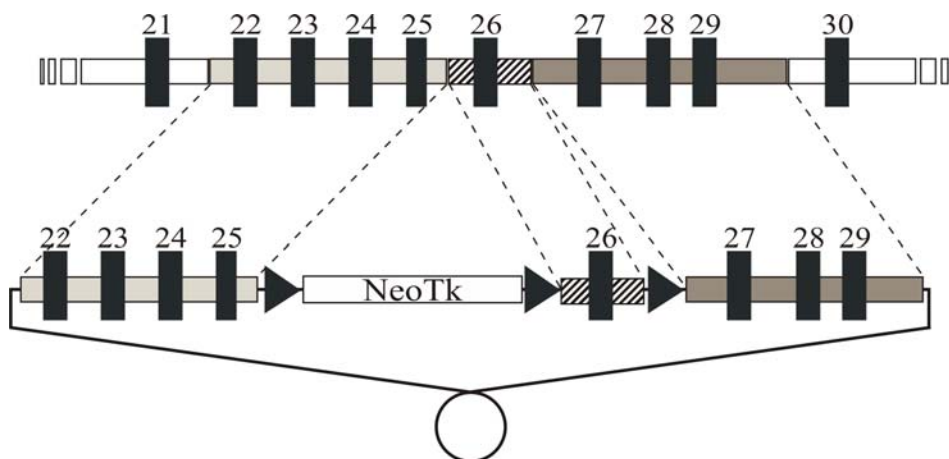


Abbildung 18: Aufbau des Targetingvektors für die CNGB1-Deletion mit Hilfe des Cre/loxP-Systems

Oben: Struktur des CNGB1-Gens. Unten: Targetingvektor. Die einzelnen Exons sind durch schwarze Boxen symbolisiert. Der zu deletierende Bereich ist als schraffierter Balken dargestellt, die sogenannten „homologen Arme“, die mit in den Vektor kloniert werden, in hell- bzw. dunkelgrau, die weitere genomische Sequenz in weiß. Die loxP-Seiten werden durch schwarze Dreiecke symbolisiert, die Resistenzkassette mit dem Neomycinresistenzgen und dem Thymidinkinasegen als weiße Box. Der Targetingvektor wird in ein Plasmid kloniert (symbolisiert durch einen weißen Kreis).

Abbildung 18 zeigt schematisch die Targetingstrategie zur Inaktivierung von CNGB1. Gegenübergestellt sind die genomische Struktur von CNGB1 und der fertig klonierte Targetingvektor. Exon 26 wurde von zwei gleichgerichteten loxP-Seiten flankiert. In die Intronsequenz vor Exon 26 wurde ein Resistenzgen eingeführt, um später eine Selektion der ES-Zellklone, die den Targetingvektor integriert haben, durchführen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde eine „NeoTk-Kassette“ verwendet. Diese enthält zum einen ein Neomycinresistenzgen, so daß mit G418, einem Neomycin-Analoga, Klone selektioniert werden konnten, die die Kassette integriert hatten (positive Selektion). Zum anderen enthält die Resistenzkassette ein Thymidinkinasegen, das Aciclovir-Analoga, im vorliegenden Fall Ganciclovir, durch Phosphorylierung aktiviert. Somit konnten mit Ganciclovir Klone selektioniert werden, bei denen die Resistenzkassette wieder herausgeschnitten wurde (negative Selektion), da alle Klone mit Thymidinkinasegen starben. Um die Resistenzkassette wieder aus dem Gen entfernen zu können, wurde auch sie von zwei loxP-Seiten flankiert. Damit eine homologe Rekombination mit dem gewünschten Gen erreicht wird, muß der Targetingvektor noch sogenannte „homologe Arme“ enthalten. Dies sind Bereiche, die zur Sequenz vor (5') und nach (3') der Modifikation homolog sind und über die sich die Vektor-

DNA ans Genom der ES-Zelle anlagern und ins Genom integriert werden kann (homologe Rekombination).

Die Klonierung des Targetingvektors erfolgte in dem Plasmid pBlueskriptNeoTkmod, das bereits die gefloخته Resistenzkassette enthält (IV.5.1). Die homologen Arme wurden aus BAC-DNA isoliert.

3.1 Homologer 3'-Arm

Der homologe 3'-Arm (NheI 9793 – NheI 15202, 5,4kb) wurde aus der DNA des CNGB1-BAC-Klons durch Restriktion gewonnen und in pUC18mod subkloniert. Mit den Primern PSH58F und PSH59RloxP wurde ein Teil des auf Exon 26 folgenden Introns aus BAC-DNA amplifiziert. Primer PSH59RloxP führt unmittelbar vor der XmaI-Schnittstelle (12434) eine EcoRI-Schnittstelle sowie eine loxP-Seite ein. Das PCR-Stück wurde mit SacI und XmaI geschnitten und in den ebenfalls mit SacI und XmaI verdauten, den 3'-Arm tragenden, pUC18mod eingesetzt. Nun wurde mit NheI der – jetzt eine loxP-Seite tragende – 3'-Arm wieder aus pUCmod isoliert und über die NheI-Schnittstelle in den Vektor pBlueskriptNeoTkmod eingesetzt (siehe Abbildung 19).

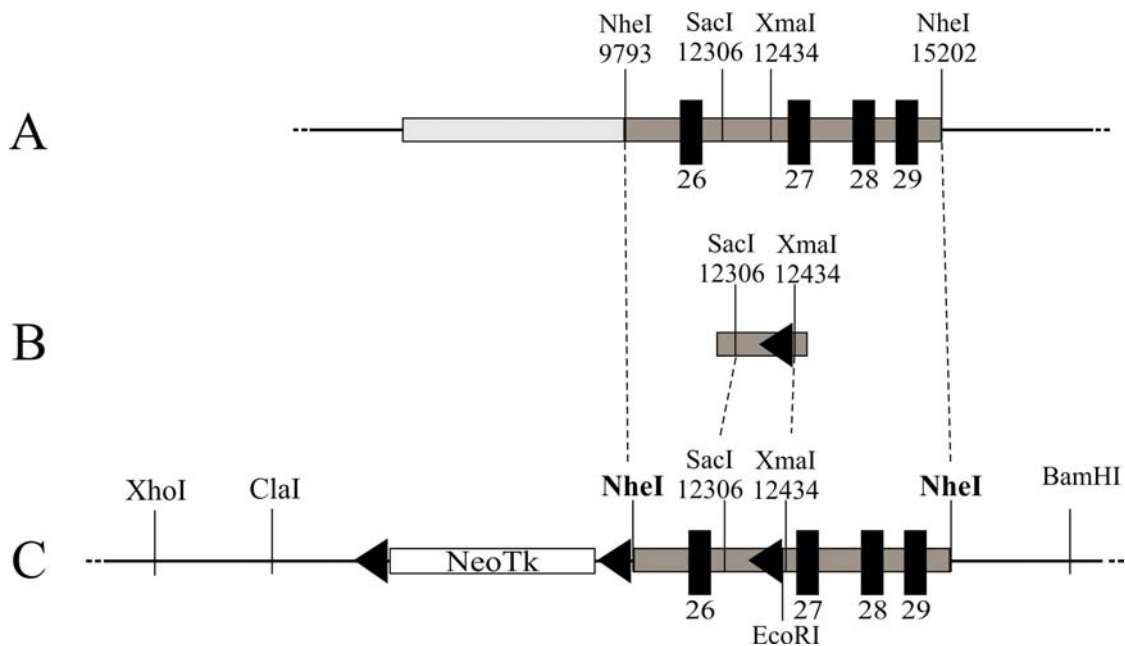


Abbildung 19: Homologer 3'-Arm des Targetingvektors

A) Wildtyp-Locus. Der in dunkelgrau dargestellte 3'-Arm wurde über die beiden NheI-Schnittstellen isoliert und zunächst in pUCmod subkloniert. B) PCR-Fragment mit der nach Exon 26 einzufügenden loxP-Seite. Der subklonierte 3'-Arm wurde mit SacI und XmaI aufgeschnitten und das modifizierte Fragment eingesetzt. Anschließend wurde der 3'-Arm wieder mit NheI aus pUCmod isoliert. C) pBlueskriptNeoTkmod nach Einsetzen des homologen 3'-Arms in die NheI-Schnittstelle.

Die Exons sind als schwarze Boxen dargestellt, die Bereiche der homologen Arme als hell- beziehungsweise dunkelgraue Balken. Schwarze Dreiecke symbolisieren die loxP-Seiten, der weiße Balken die NeoTK-Resistenzkassette. Diese Darstellung wird in den folgenden Abbildungen beibehalten.

3.2 Homologer 5'-Arm

Der 5'-Arm (NheI 5364 – NheI 9793, 4,4kb) wurde über NheI-Restriktion aus BAC-DNA gewonnen und über die NheI-Schnittstelle in den Vektor pUC18mod eingesetzt. Mit ClaI und XhoI wurde er wieder herausgeschnitten und über diese beiden Schnittstellen in den bereits den 3'-Arm tragenden pBlueskriptNeoTkmod eingesetzt (Abbildung 20).

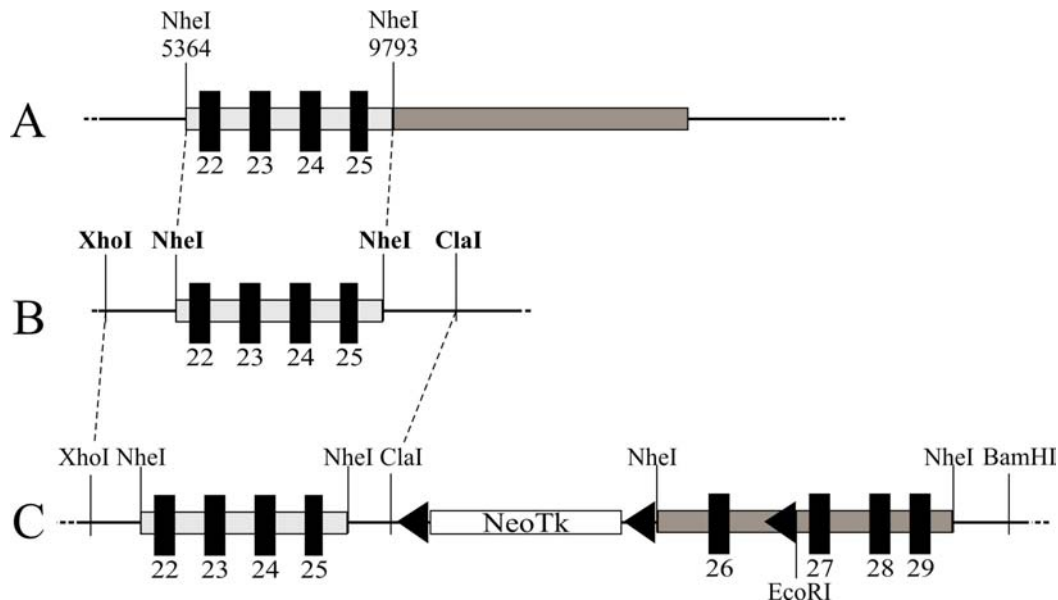


Abbildung 20: Homologer 5'-Arm des Targetingvektors

A) Isolation des in hellgrau dargestellten 5'-Arms aus dem Wildtyp-Locus über NheI. B) Subklonierung des 5'-Arms in puC18mod C) Einsetzen des 5'-Arms in pBlueskriptNeoTkmod über XhoI- und ClaI-Schnittstellen.

Der fertige Targetingvektor (17,3kb) wurde an allen kritischen Stellen sequenziert und für die Elektroporation der Stammzellen mit XhoI linearisiert.

3.3 Test auf Funktionalität der loxP-Seiten

Vor Beginn des ES-Zelltargetings wurde die Funktionalität der loxP-Seiten des Targetingvektors *in vitro* überprüft. Der Vektor wurde mit Cre-Rekombinase verdaut. Theoretisch können, je nachdem welche loxP-Seiten durch die Cre rekombiniert wurden, vier verschiedene Konstrukte vorliegen (Abbildung 21): Ausgehend vom Targetingvektor (A) liegt nach Deletion von NeoTk-Kassette und Exon 26 ein konstitutiver KO-Locus vor (B), nach Deletion der NeoTk-Kassette ein konditionaler KO-Locus (C), sowie nach Deletion von Exon 26 die im Intron verbleibende NeoTk-Kassette (D).

Es wurden vier Primer ausgewählt (PSHV1F, PSHV3F, PSHV4R, PSHV6R, VIII.1), mit denen bei jeweils einem der möglichen Konstrukte ein PCR-Produkt entsteht (Abbildung 21). Aus dem mit Cre-Rekombinase verdauten Vektor wurden die verschiedenen PCR-Produkte amplifiziert und auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

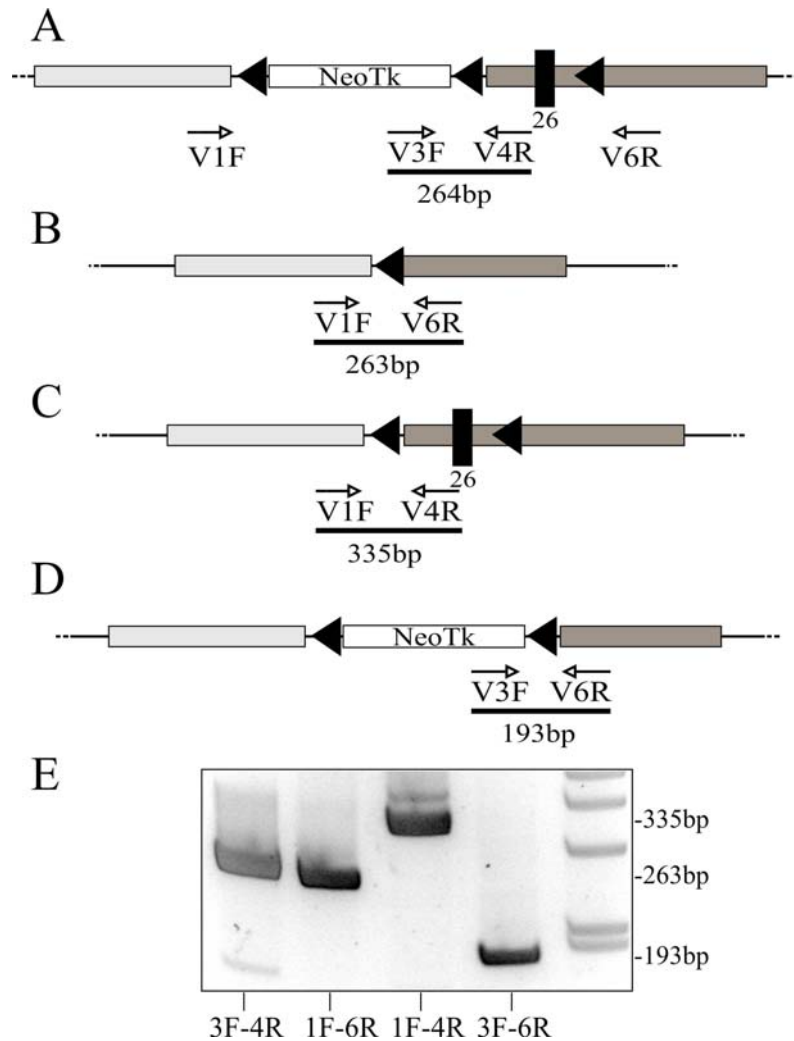


Abbildung 21: Überprüfung der Cre-abhängigen Rekombination am fertigen Targetingvektor

A) Lage der Primer PSHV1F, PSHV3F, PSHV4R und PSHV6R im Targetingvektor. B) – D) Möglichkeiten der Rekombination bei Verdau des Targetingvektors mit Cre-Rekombinase. Jedes Primerpaar führt nur in einem der vier Rekombinationsereignisse A) bis D) zur Amplifikation eines PCR-Produkts. E) Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente.

Die entstandenen PCR-Fragmente wiesen die korrekte Größe auf. Nach Cre-vermittelter Rekombination entstanden also alle vier möglichen Produkte. Somit lagen alle drei loxP-Seiten des Targetingvektors funktionell im Targetingvektor vor.

Durch Sequenzierung der PCR-Produkte wurden die nach Cre-vermittelter Rekombination verbleibenden loxP-Seiten nochmals auf ihre Intaktheit überprüft.

4 ES-Zell Targeting

Unter Gene Targeting versteht man die zielgerichtete homologe Rekombination des Targetingvektors mit dem Genom embryonaler Stammzellen (ES-Zellen).

Dabei sind optimale Kulturbedingungen notwendig, um die Pluripotenz der ES-Zellen zu erhalten. Der undifferenzierte Zustand ist notwendig, um die Differenzierung der injizierten Stammzellen zu Keimzellen zu ermöglichen und damit die Keimbahngängigkeit der Mutation zu gewährleisten. Die ES-Zellen wurden, wie unter IV.10.2.1 beschrieben, auf einem Rasen von Feederzellen unter Zusatz von LIF kultiviert. Feederzellen sind embryonale Fibroblasten,

die zum einen Nährstoffe für die ES-Zellen produzieren, zum anderen Faktoren freisetzen, die eine Differenzierung der ES-Zellen verhindern. Ihre Gewinnung und Kultur ist unter IV.10.2.2 beschrieben. LIF (Leukämie-inhibierender Faktor) ist ein Zytokin, das ebenfalls die Pluripotenz der embryonalen Stammzellen erhält.

Wichtig ist, daß für die Injektion eine nicht zu hohe Passage von ES-Zellen verwendet wird, um sicher zu sein, daß die Pluripotenz der Zellen noch erhalten ist und somit eine Keimbahngängigkeit der Mutation möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurden R1-ES-Zellen der 15. Passage verwendet. Nach dem ersten und zweiten Targeting befanden sie sich bei der Injektion in der 27. bis 29. Passage.

4.1 Erstes Targeting

Ziel des ersten Targetings war die homologe Rekombination des Targetingvektors mit dem CNGB1-Wildtyp-Locus der Stammzellen.

Ein Aliquot ES-Zellen wurde aufgetaut und in einer kleinen Zellkulturflasche (25cm²) kultiviert. Einen Tag später waren die Zellen bereits ausreichend konfluent (50-70%), so daß sie in eine 75cm² Flasche passagiert werden konnten. Nach 2 weiteren Tagen wurden die Stammzellen geerntet, mit dem linearisierten Targetingvektor wie unter IV.10.2.3 beschrieben elektroporiert und auf 10 Petrischalen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde die Selektion mit ES-G418-Medium begonnen. Am 7., 8., 9., 11., 13., 14. und 15. Tag nach der Elektroporation wurden insgesamt 665 G418-resistente ES-Zellklone isoliert und sofort auf 2 96Well-Platten (Platten A und B) gesplittet. Etwa 4 Tage nach der Isolation war der Zellrasen zu 50-70% konfluent, so dass Platte A bei -80°C in Einfriermedium bis zum Auftauen gelagert werden und Platte B nochmals auf 3 96Well-Platten gesplittet werden konnte (Platten C,D und E). Diese wurden weitere 3 bis 5 Tage ohne Mediumwechsel kultiviert und für die DNA-Isolation weggefroren, sobald die Zellen zu 70-90% konfluent waren und das Medium gelb wurde.

4.2 Screening der G418-resistenten Klone auf korrekte homologe Rekombination

Da der Targetingvektor bei einem Großteil der ES-Zellen zufällig an einer ungewollten Stelle im Genom integriert wird und um eine unvollständige Integration (zum Beispiel das Fehlen der einzelnen loxP-Seite) auszuschließen, wurden die isolierten G418-resistenten Klone auf homologe Rekombination getestet.

Dazu wurde aus den Platten C,D,E, wie unter IV.6.2 beschrieben, DNA isoliert und ein Restriktionsverdau durchgeführt.

Die verdaute ES-DNA wurde auf 0,7%igen Agarosegelen aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet.

Um die vollständige homologe Rekombination des Vektors zu testen, wurde eine Southern Blot Analyse mit einer 5'-Sonde und einer 3'-Sonde durchgeführt. Die Schnittstellen und Sonden wurden dabei so gewählt, daß die Sonde und eine der Schnittstellen außerhalb des Targetingvektors, die zweite Schnittstelle innerhalb des Targetingvektors liegt. Durch die Schnittstelle im Targetingvektor muß nach Restriktion ein Fragment entstehen, das sich vom Fragment des Wildtyp-Locus unterscheidet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die ES-Zell-DNA mit EcoRI verdaut und mit den Sonden K und W gescreent (s. Übersicht der Sonden in VIII.4). Wie in Abbildung 22 A,B ersichtlich ist, entstehen dabei mit der 3'-Sonde W ein 5,6kb-Fragment im Wildtyp sowie ein 3,5kb-Fragment im KO-Locus, das durch die mit der einzelnen loxP-Seite zusätzlich eingefügte EcoRI-Schnittstelle entsteht.

Die 5'-Sonde K führt zu einem 5,7kb-Fragment im Wildtyp sowie zu einem 8,1kb-Fragment im KO-Locus (Abbildung 22A,B).

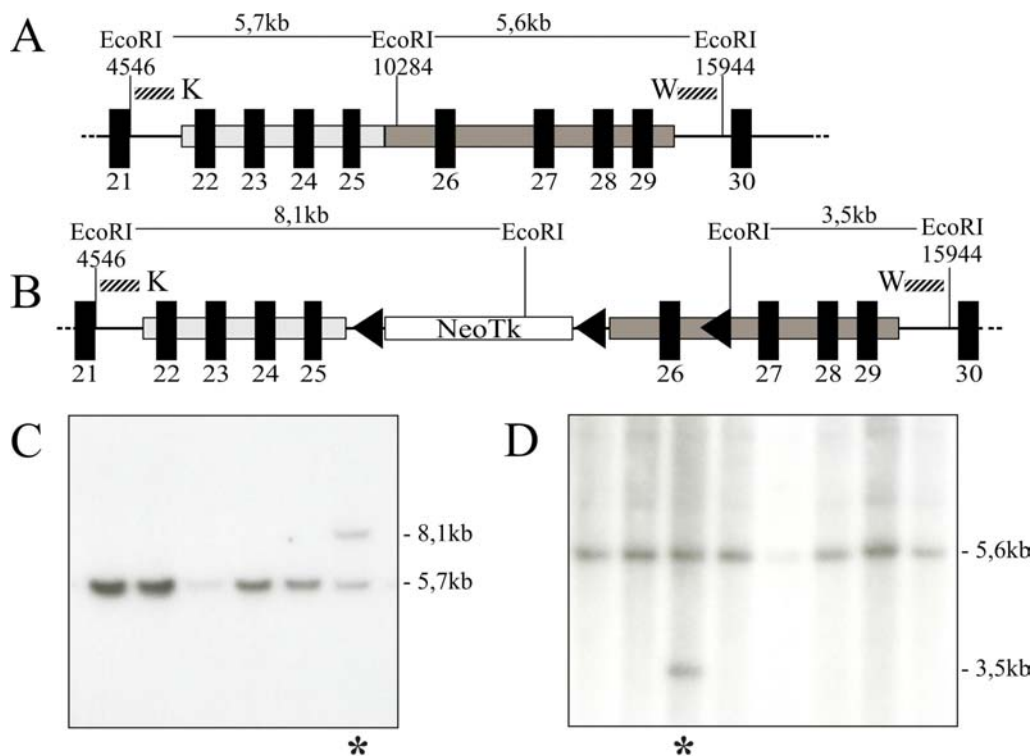


Abbildung 22: Screening der G418-resistenten Klone

A) Wildtyp-Locus mit EcoRI-Schnittstellen. Sonde K führt zu einem 5,7kb-Fragment, Sonde W zu einem 5,6kb-Fragment. B) Locus nach homologer Rekombination. Nach EcoRI-Verdau liegt Sonde K auf einem 8,1kb-Fragment, Sonde W auf einem 3,5kb-Fragment. C) Southern Blot Analyse mit Sonde K. D) Southern Blot Analyse mit Sonde W. Klone, die auf einem Allel den Targetingvektor korrekt integriert haben, sind mit * gekennzeichnet.

Die Sonden sind als gestreifte Balken dargestellt.

Schon durch das Screenen von 4 Platten (384 Klone) mit Sonde W wurden 16 positive Klone gefunden. Sie trugen auf einem Allel den Wildtyp-Locus, auf dem anderen Allel den Locus, bei dem eine homologe Rekombination stattgefunden hatte, waren also heterozygot. Ein Beispielblot ist in Abbildung 22D zu sehen.

Die Blots wurden gewaschen und mit Sonde K rehybridisiert. 14 der positiven Klone zeigten die erwartete KO-Bande bei 8,1kb (exemplarisch ein Blot in Abbildung 22C).

Um auszuschließen, daß der Targetingvektor mehrfach im Genom der Stammzellen integriert vorlag, wurde eine weitere Southern Blot Analyse mit einer Sonde auf der Neomycin-Kassette (VIII.4) durchgeführt. Die DNA der positiven Klone wurde mit KpnI verdaut und nach Auftrennung auf einem 0,7%igen Agarosegel auf eine Nylonmembran geblottet. Hier war bei homologer Rekombination ein Fragment von 13,8kb zu erwarten. Auch hier war es wichtig, daß eine der beiden KpnI-Schnittstellen außerhalb der Vektorsequenz lag (Abbildung 23A). Falls die Resistenzkassette mit Teilen des Targetingvektors noch an anderer Stelle im Genom integriert worden wäre, würden bei Hybridisierung mit der Neo-Sonde zusätzliche Banden anderer Größe auftreten.

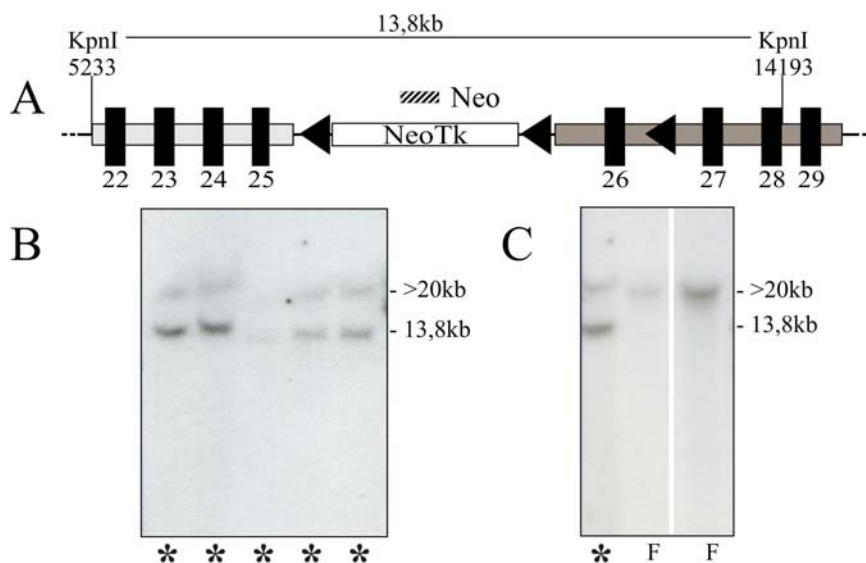


Abbildung 23: Southern Blot Analyse der G418-resistenten Klone mit einer Neo-Sonde

A) KpnI-Fragment im CNGB1-Locus nach homologer Rekombination und Integration der NeoTk-Kassette. B) Southern Blot Analyse von Klonen, die den Targetingvektor homolog integriert haben (*). Alle Klone zeigten die erwartete Bande bei 13,8 kb sowie eine zweite Bande bei >20kb. C) Southern Blot Analyse eines positiven Klons aus dem ersten Targeting (*) sowie verschiedener Konzentrationen KpnI-verdauter Feederzell-DNA (F).

Nach Hybridisierung mit der Neo-Sonde zeigte sich bei allen positiven Klonen, neben der erwarteten 13,8kb-Bande, eine zweite Bande bei >20kb (Abbildung 23B). Da die Feederzellen aus $CNGA3^{+/-}$ -Embryos ebenfalls eine Neomycin-Resistenzkassette tragen, lag die Vermutung nahe, daß die zusätzliche Bande durch die mitisolierte DNA der Feederzellen entstand. Dies wurde durch eine zweite Southern Blot Analyse, bei der auch Feederzellen alleine untersucht wurden, belegt (Abbildung 23C).

Nach dem Screening von 4 Platten standen also 14 positive Klone, bei denen die homologe Rekombination erfolgreich verlaufen war, für das zweite Targeting zur Verfügung:

Klone mit korrekt integriertem Targetingvektor:	
1A5	1C12
1B4	1F9
1B10	2E1
1B11	2H7
1C3	4A3
1C7	4B1
1C8	5B10

Die Bezeichnungen der Klone setzen sich aus der fortlaufenden Nr. der Platte sowie der Loch-Nr. auf der 96Well-Platte zusammen.

4.3 Überprüfung der positiven Klone auf Intaktheit der loxP-Seiten

Die Klone 2H7 und 5B10 wurden zur Weiterführung ins zweite Targeting ausgewählt. Vor dem Auftauen wurden mittels PCR nochmals die loxP-Seiten überprüft.

Um sicherzugehen, daß die im Targetingvektor enthaltenen loxP-Seiten fehlerlos ins Genom integriert worden sind, wurden zunächst die drei loxP-Seiten mit PCR amplifiziert (Abbildung 24). Primerpaar PSH58F – PSHV6R führte dabei zur Amplifikation einer Doppelbande, da es aus dem Wildtyp-Allel die um 40 Basen kürzere Sequenz ohne loxP-Seite ebenfalls amplifiziert.

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, die DNA aus dem Gel eluiert und sequenziert, um die loxP-Seiten zu überprüfen.

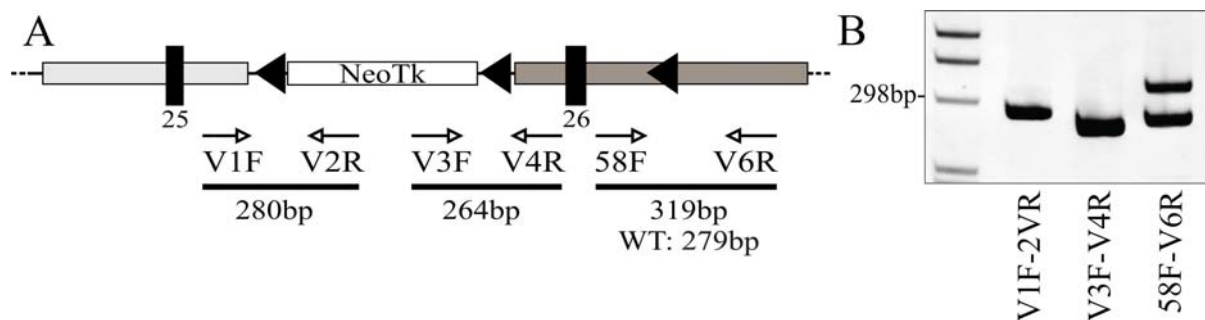


Abbildung 24: PCR zur Überprüfung der loxP-Sequenzen

A) PCR-Primer zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die die loxP-Seiten enthalten. Primerpaar PSH58F – PSHV6R amplifiziert auch aus dem WT-Allel ein 279bp-Fragment. B) PAGE der PCR-Produkte.

4.4 Zweites Targeting

Ziel des zweiten Targetings war die Cre-vermittelte Rekombination der im ersten Targeting im Genom integrierten loxP-Seiten und die Selektion von Klonen mit deletiertem oder gefloxtem Exon 26.

Platten 2 und 5 aus dem ersten Targeting wurden aufgetaut, die Klone 2H7 und 5B10 zunächst in einer 24Well-Platte kultiviert, bei 60-80%iger Konfluenz auf eine 6Well-Platte, in eine 25cm²-Flasche und schließlich in eine 75cm²-Flasche passagiert. 12 beziehungsweise 13 Tage nach dem Auftauen war die Zellzahl ausreichend und es wurde, wie unter IV.10.2.3 beschrieben, mit dem nicht linearisierten Cre-Plasmid elektroporiert und die Zellen in verschiedenen Verdünnungen in Petrischalen ausgesät. 48 Stunden nach der Elektroporation wurde dem ES-Medium Ganciclovir zur Selektion zugesetzt. Ganciclovir wird durch die Thymidinkinase phosphoryliert und damit aktiviert. Dementsprechend sterben alle Zellen ab, die die NeoTk-Kassette noch in ihrem Genom integriert haben, bei denen also entweder keine Cre-Rekombination stattgefunden hat oder bei denen durch die Rekombination der zwei hinteren loxP-Seiten Exon 26 deletiert wurde, die NeoTk-Kassette aber noch im Genom verblieben ist. Nach dieser negativen Selektion sollten theoretisch nur Klone mit deletiertem CNGB1-Locus oder gefloxtem CNGB1-Locus wachsen.

9 Tage nach der Elektroporation konnte mit der Isolation von Ganciclovir-resistenten Klonen begonnen werden, die wie im ersten Targeting zunächst in A- und B-Platten kultiviert wurden. Bei 60-80%iger Konfluenz wurde die A-Platte in Einfriermedium weggefroren und die B-Platte nochmals auf 3 Platten gesplittet, um später DNA daraus zu isolieren. Insgesamt wurden 147 Klone aus dem ursprünglichen Klon 2H7 sowie 48 Klone aus dem ursprünglichen Klon 5B10 isoliert.

4.5 Screening der Ganciclovir-resistenten Klone auf konstitutive oder konditionale Deletion des CNGB1-Locus

In den Platten C,D und E wurde, wie unter IV.6.2 beschrieben, die DNA gefält und je eine Platte mit KpnI und EcoRI verdaut. Wie in Abbildung 25 ersichtlich, ergibt eine Southern Blot Analyse mit Sonde 18 bei gefloxtem Exon 26 eine 9,1kb-Bande, die sich nicht von der 9kb-Bande des WT-Allels unterscheiden lässt, bei deletiertem Exon 26 jedoch eine 6,3kb-Bande. Zur Unterscheidung zwischen Wildtyp-Allel und gefloxtem Locus wurde mit EcoRI verdaut und mit Sonde W hybridisiert. Hier war eine 5,6kb-Bande im Wildtyp, sowie durch die zusätzliche EcoRI-Schnittstelle hinter der loxP-Seite eine 3,5kb-Bande bei deletiertem oder gefloxtem Locus zu erwarten. Wie in Abbildung 25 gezeigt wird, wurden sowohl Klone für einen konstitutiven KO, als auch Klone für einen konditionalen KO in ausreichender Zahl gefunden.

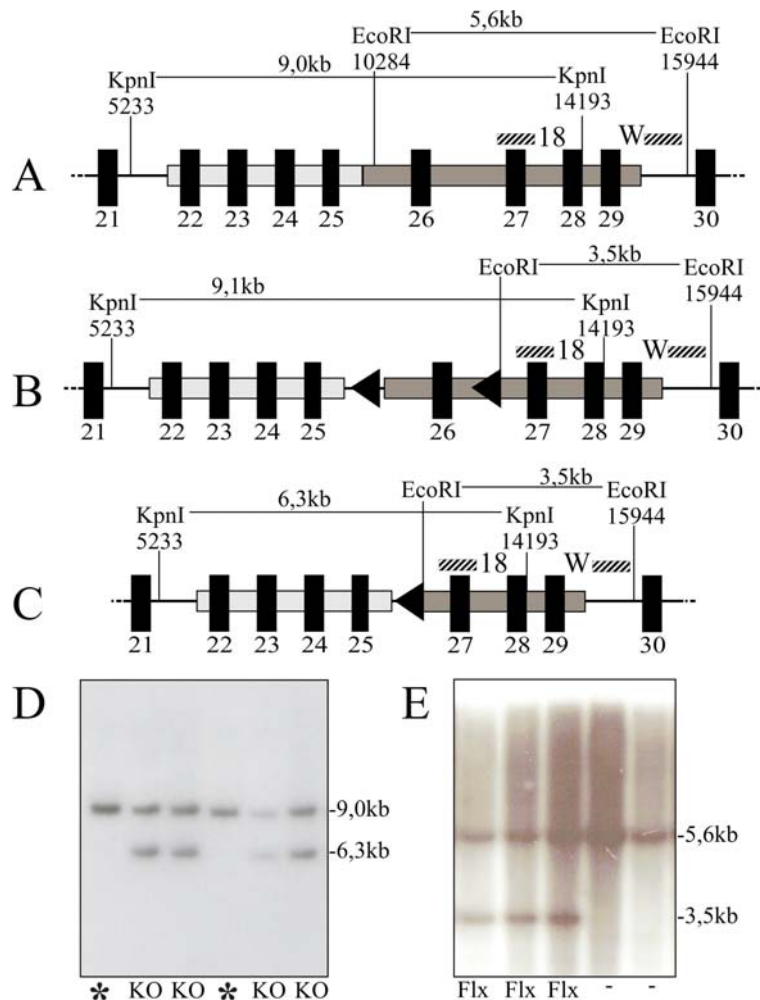


Abbildung 25: Screening der Ganciclovir-resistenten ES-Zellklone

A) Im Wildtyp ergibt Sonde 18 nach KpnI-Verdau ein 9,0kb-Fragment, Sonde W nach EcoRI-Verdau ein 5,6kb-Fragment. Liegt nach der Cre-vermittelten Rekombination Exon 26 gefloxt vor (B), so ist das KpnI-Fragment (9,1kb) nicht vom Wildtyp zu unterscheiden und das EcoRI-Fragment ist auf 3,5kb verkürzt. Im Locus mit deletiertem Exon 26 (C) führt EcoRI-Verdau ebenfalls zu einem 3,5kb-Fragment, das KpnI-Fragment wird durch die Deletion auf 6,3kb verkürzt. D) Hybridisierung mit Sonde 18 nach KpnI-Verdau. Mit KO gekennzeichnete Klone sind heterozygot für den konstitutiven KO-Locus, Klone mit * sollten Klone mit gefloxtem Locus sein und wurden weiter untersucht. E) EcoRI-Verdau verschiedener *-Klone aus (D). Ein großer Teil zeigt die kleinere EcoRI-Bande und ist damit als gefloxt identifiziert (Flx). Einige Klone erscheinen in der Southern Blot Analyse als „Wildtyp-Klone“ (-).

Einige Klone schienen nach der negativen Selektion mit Ganciclovir „Wildtyp-Klone“ zu sein (Abbildung 25E), was jedoch nach der Kultur in G418-haltigem ES-Medium nicht möglich war. Bei diesen Klonen liegt vermutlich die Tk-Kassette noch im Genom vor, wird aber nicht transkribiert (Cheah und Behringer, 2000). Eine andere Möglichkeit wäre, daß im ersten Targeting Wildtyp-Klone in unmittelbarer Umgebung der KO-Klone überleben konnten. Die Klone wurden verworfen.

Um die Abwesenheit der NeoTk-Kassette zu zeigen, wurde die DNA der Klone mit EcoRI verdaut und mit der Neo-Sonde hybridisiert. EcoRI schneidet im Targetingvektor in der Resistenzkassette und unmittelbar hinter den beiden auf die Kassette folgenden loxP-Seiten, so daß sowohl im Locus, wie er nach dem ersten Targeting vorlag, als auch im Falle einer Exzision von Exon 26 unter Verbleib der Resistenzkassette ein 1,9kb-Fragment entsteht (Abbildung 26A). Die Southern Blot Analyse zeigte, daß bei allen positiv getesteten Klonen die Resistenzkassette entfernt wurde, jedoch war auch hier wieder eine bei allen Klonen gleiche, zusätzliche Bande bei ungefähr 6,5kb zu erkennen (Abbildung 26B). Der parallele Blot von reiner Feederzell-DNA sowie von ES-Zellklonen aus einem anderen Gene Targeting-Ansatz, die keine Resistenzkassette mehr trugen und ebenfalls auf CNGA3^{+/-}-Feederzellen kultiviert wurden, zeigte jedoch auch hier, daß die zusätzliche Bande durch die Neomycin-Resistenzkassette der CNGA3^{+/-}-Feeder zustande kommt (Abbildung 26C). Die Spur mit Feederzell-DNA zeigte auf diesem Blot noch eine weitere Bande bei etwa 3,5kb, für die keine Erklärung gefunden werden konnte.

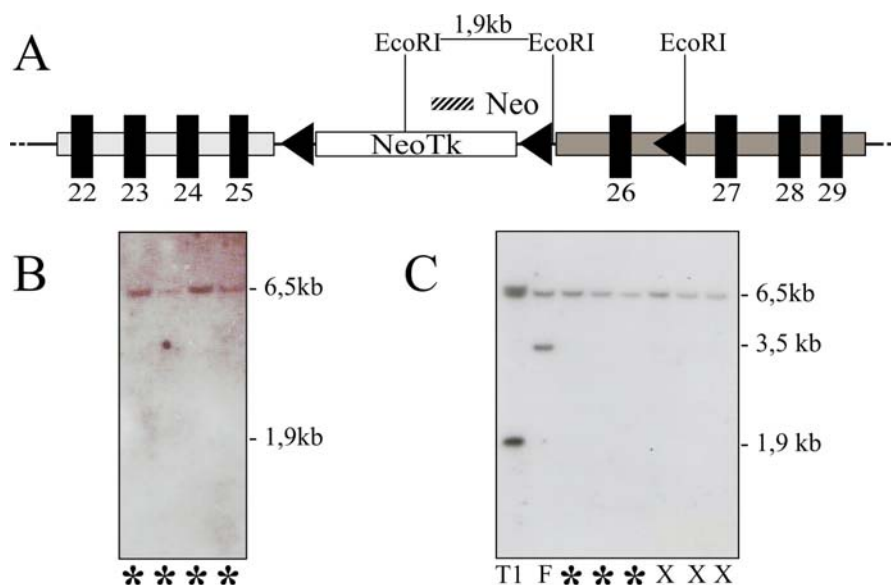


Abbildung 26: Hybridisierung der Ganciclovir-resistenten Klone mit der Neo-Sonde

A) Bei Verbleib der Kassette im CNGA3-Locus entsteht nach EcoRI-Verdau ein 1,9kb-Fragment. B) Alle positiven Klone des zweiten Targetings (*) zeigen mit der Neo-Sonde keine Bande bei 1,9kb, jedoch eine schwache Bande bei etwa 6,5kb. C) Die 6,5kb-Bande stammt aus den Feederzellen. T1: Klon aus dem ersten Targeting mit noch integrierter Resistenzkassette. F: Feederzell-DNA. X: ES-Klone aus einem anderen Gene Targeting Ansatz, die ebenfalls auf CNGA3^{+/-}-Feederzellen kultiviert wurden.

4.6 Überprüfung der positiven Klone mittels PCR

Für die spätere Injektion wurden nach Abschluß der Southern Blot Analysen die Klone 2H7-4A3, 2H7-4B4, 2H7-4E4, 5B10-1C3, 5B10-2D1, 5B10-2G2 (CNGB1^{+/-}-Klone) sowie 2H7-4C4, 2H7-4D1, 2H7-4E3, 5B10-1A4, 5B10-1D4, 5B10-1G3 (CNGB1^{+/^{lox}}-Klone) ausgewählt. Bei diesen Klone wurde nochmals durch PCR-Analyse die korrekt erfolgte Cre-vermittelte Rekombination kontrolliert (Abbildung 27).

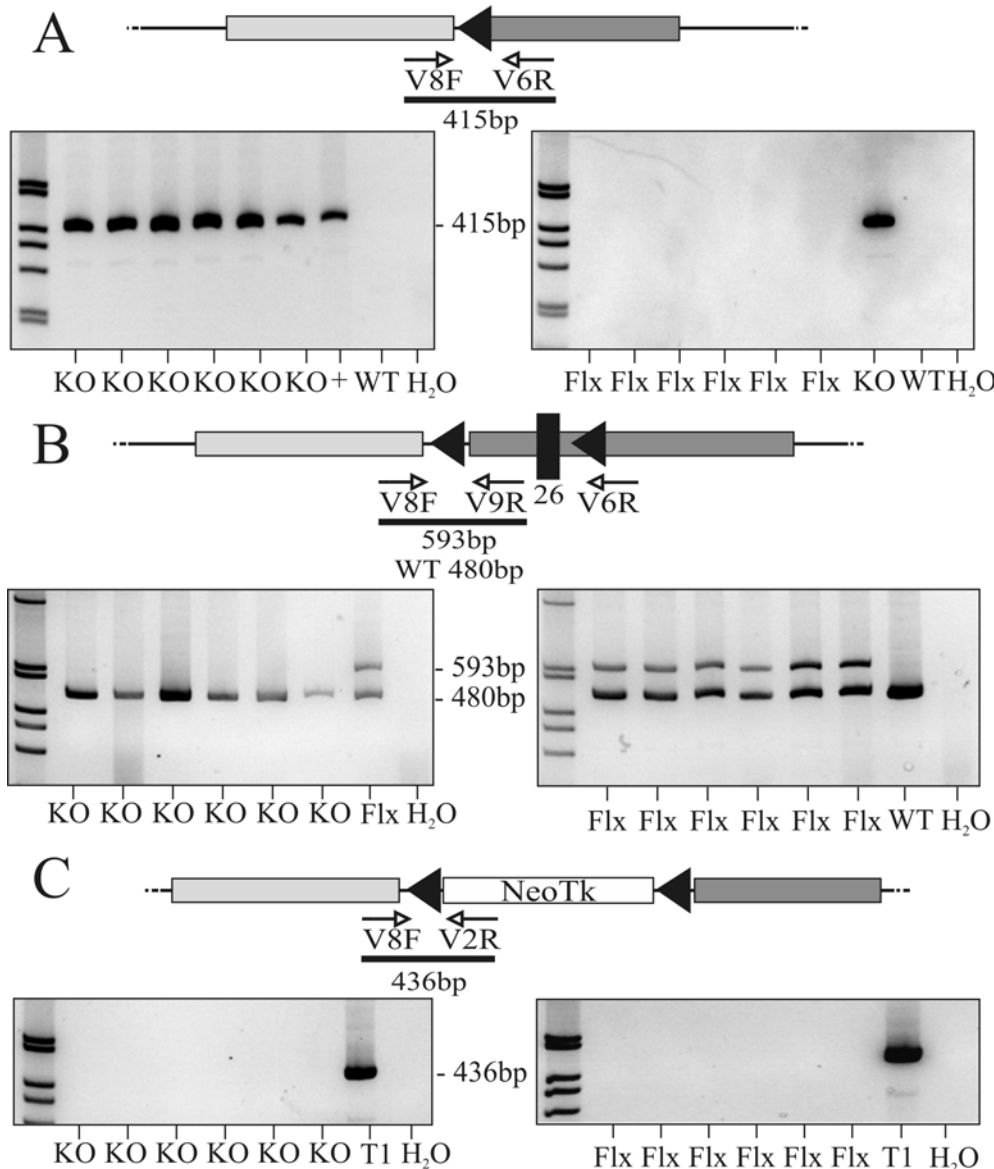


Abbildung 27: Überprüfung der ES-Zellklone mittels PCR und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Produkte (PAGE)

A) Primerpaar PSHV8F - PSHV6R amplifiziert nur aus dem KO-Locus ein 415bp-Fragment. Die KO-Klone zeigen wie eine Positivkontrolle aus Cre-verdaulichem Targetingvektor (+) eine Bande, Wildtyp- (WT) und geflochte Klone nicht. B) Mit den Primern PSHV8F und PSHV9R wird aus dem geflochtenen Allel ein 593bp großes Produkt amplifiziert, aus dem Wildtyp-Allel ein 480bp Produkt. KO-Klone zeigen nur die Wildtyp-Bande, geflochte Klone beide Banden. C) Sollte die Resistenzkassette nicht in allen Zellen entfernt worden sein, so würde wie in den Klone des ersten Targetings (T1) mit dem Primerpaar PSHV8F – PSHV2R ein 436bp-Fragment amplifiziert werden, was aber weder bei KO-Klonen noch bei geflochtenen Klone auftrat.

Außerdem wurde durch die PCR überprüft, ob es sich um Mischklone handelt. Wenn nach Teilung der elektroporierten Stammzelle die Cre-Rekombinase in einer Subpopulation von Zellen weiter aktiv ist, können in einem Klon Zellpopulationen mit unterschiedlichen Rekombinationsereignissen vorliegen. Dies wurde durch PCR mit spezifischen Primerpaaren für jedes Rekombinationsereignis sowohl für die Klone mit deletiertem Exon 26 (konstitutiver CNGB1-KO, KO), als auch für die Klone mit gefloxtem Exon 26 (konditionaler CNGB1-KO, Flx) ausgeschlossen (Abbildung 27).

5 Blastozysteninjektion positiver ES-Zellklone und Zucht der CNGB1-defizienten Mäuse

5.1 Injektion der modifizierten ES-Zellklone in Blastozysten

Die zur Injektion ausgewählten Klone (V.4.6) wurden aufgetaut, zunächst in 24Well-Platten kultiviert und bei 60-80%iger Konfluenz auf eine 6Well-Platte passagiert. War auch diese ausreichend konfluent, wurden die Zellen trypsiniert, je 2/5 als 1ml-Gefrierstock in flüssigem Stickstoff gelagert und die restlichen Zellen 1:10, 1:15 und 1:30 auf eine 6Well-Platte gesplittet. So standen ein bis drei Tage nach dem Splitten Zellen zur Blastozysteninjektion zur Verfügung.

Unmittelbar vor der Injektion wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert, nach Abstoppen des Trypsin-Verdaus abzentrifugiert und zum Transport in ES-Medium resuspendiert.

Die Mikroinjektion der genetisch modifizierten ES-Zellen in Blastozysten wurde wie unter IV.11 beschrieben durchgeführt. Die ^{+/-}-Stammzellen wurden in insgesamt 67 Blastozysten injiziert, aus denen 9 männliche Chimären geboren wurden. Die ^{+/^{flox}}-Klone wurden in insgesamt 29 Blastozysten injiziert und transferiert, aus ihnen wurde jedoch nur eine männliche Chimäre geboren.

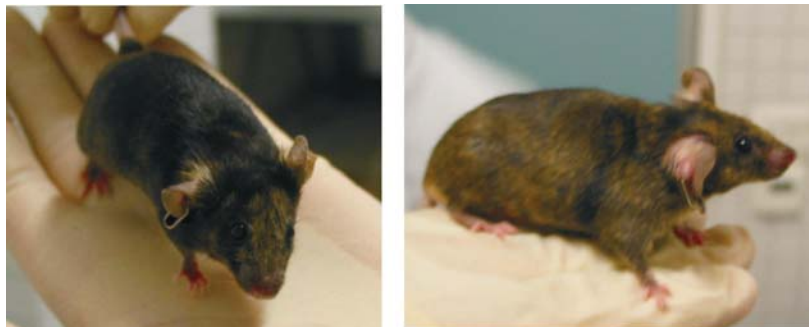


Abbildung 28: zwei Chimären aus der CNGB1^{-/-}-Zucht

An der Zweifarbigkeit des Fells (schwarz/braun) ist zu sehen, daß sie teilweise das Genom des (schwarzen) C57/Bl6 Spendertiers der Blastozysten tragen, teilweise das Genom der (braunen) 129SvJ Stammzellen.

5.2 Zucht der CNGB1^{-/-}-Mäuse

Die Chimären wurden wie unter IV.12.1 beschrieben mit C57/Bl6-Weibchen verpaart. Die ^{+/-}-Chimären zeugten dabei zahlreiche braune Nachkommen, von denen wie erwartet etwa 50% heterozygot für die CNGB1-Deletion waren (16 von 29). Bei der ^{+/^{flox}}-Chimäre dagegen schien die Mutation nicht keimbahngängig zu sein, da ihre Nachkommen alle schwarz waren. Die heterozygote F1-Generation der KO-Linie wurde untereinander verpaart, um CNGB1-defiziente Mäuse zu erhalten.

Aus Verpaarungen heterozygoter Elterntiere wurden die drei möglichen Genotypen nach Mendelscher Verteilung geboren (WT/HZ/KO: 23:64:26, n=103). Auch Männchen und Weibchen wurden im entsprechenden Verhältnis geboren. Von allen KO-Mäusen, die ein Alter erreichten, in dem das Geschlecht erkennbar war oder bei denen das Geschlecht mittels PCR ermittelt worden war (IV.1.4) waren 47 Mäuse weiblich und 49 Mäuse männlich.

Die CNGB1-defizienten Mäuse sind lebensfähig. Sowohl Männchen als auch Weibchen sind fertil. Äußerlich erscheinen die Tiere normal. Unterschiede zwischen WT- und KO-Mäusen zeigten sich lediglich im Körpergewicht sowie in der postnatalen Sterblichkeit.

5.2.1 Postnatale Sterblichkeit

Die KO-Mäuse starben im Vergleich zu WT-Mäusen vermehrt entweder in den ersten 7 Tagen nach der Geburt oder im Alter von 2 bis 4 Wochen.

In der ersten postnatalen Woche starben von 23 WT-Mäusen 3, was $12,1 \pm 6,4\%$ eines Wurfs darstellt, von 26 geborenen KO-Mäusen jedoch 10, was $38,9 \pm 10,7\%$ entspricht. Es starben also etwa dreimal so viele KO-Tiere wie WT-Tiere innerhalb der ersten Woche (t-Test: $p < 0,05$; es wurden nur Würfe ausgewertet, in denen alle toten Tiere gefunden wurden und genotypisiert werden konnten). Es fiel auf, daß durch die Bauchdecke der neugeborenen KO-Mäuse häufig wenig oder keine Muttermilch (sogenannte „Milchflecken“) zu sehen war. Die Vermutung liegt also nahe, daß die Tiere nicht genug Muttermilch trinken und an Unterernährung versterben.

Im Alter von 2 bis 4 Wochen verstarben 6 weitere CNGB1-KO-Tiere und ein HZ-Tier, jedoch keine einzige WT-Maus. Die Tiere, die zu diesem späten Zeitpunkt starben, waren extrem untergewichtig im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern.

Bis jetzt wurden CNGB1^{-/-}-Mäuse bis zu einem Alter von über 12 Monaten gezüchtet, die CNGB1-Defizienz scheint also keinen Einfluß auf die Lebenserwartung der Mäuse zu haben, wenn sie einmal das Erwachsenenalter erreicht haben.

Da zu Beginn der Zucht auffiel, daß deutlich weniger männliche als weibliche KO-Tiere das Erwachsenenalter erreichten, wurde das Geschlecht der in der ersten postnatalen Woche gestorbenen Mäuse bestimmt. Das Geschlecht der Tiere wurde mit einem auf dem SRY-Gen (sex determining region of the Y) liegenden PCR-Primerpaar ermittelt (IV.1.4). Wie in Abbildung 29 exemplarisch gezeigt ist, wird aus DNA von männlichen Mäusen das 249bp-Fragment des SRY-Gens amplifiziert, aus DNA von weiblichen Mäusen jedoch nicht.

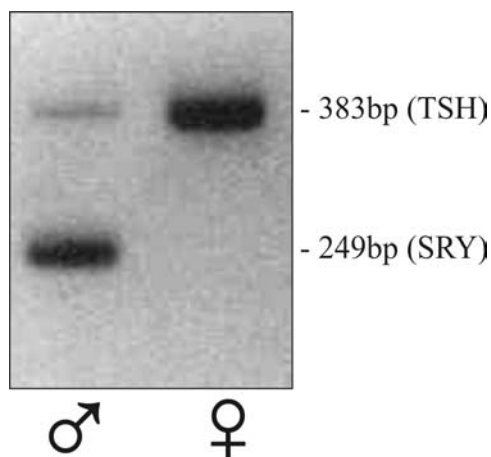


Abbildung 29: Geschlechtsbestimmung mittels PCR

Ein Primerpaar amplifiziert ein Fragment des SRY-Gens aus dem Y-Chromosom (249bp), ein zweites Primerpaar zur loading control ein Fragment des TSH β -Gens (383bp).

Überraschenderweise waren von insgesamt 16 gestorbenen KO-Mäusen, deren Geschlecht bestimmt werden konnte, 14 männlich und nur 2 weiblich. Bei den heterozygoten Mäusen war das Verhältnis ausgewogen (3 : 3), bei den 3 verstorbenen Wildtypmäusen konnte das Geschlecht nicht mehr bestimmt werden.

5.2.2 Körpergewicht

Bereits beim Betrachten von WT- und KO-Geschwistern aus einem Wurf fällt auf, daß die CNGB1-defizienten Tiere vor allem zwischen der 1. und 3. Lebenswoche deutlich kleiner sind (Abbildung 30). Dieser Unterschied ist bei Männchen noch auffälliger als bei Weibchen.

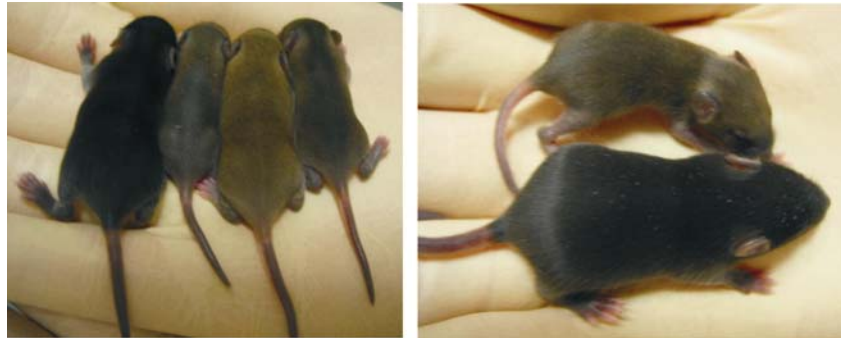


Abbildung 30: verminderte Körpergröße der CNGB1^{-/-}-Mäuse

8 Tage alte Geschwister-Tiere. Links, von links nach rechts: WT, KO, WT, KO. Rechts: oben KO, unten WT.

Um quantitative Aussagen über die Körpermasse der Mäuse machen zu können, wurden sie im Abstand von 2 bis 4 Tagen gewogen.

Die KO-Mäuse waren bis zu einem Alter von 2 Monaten stets leichter als WT-Mäuse. So wogen die KO-Mäuse an Tag 30 nur $10,4 \pm 0,4$ g (n=16), die Wildtypmäuse dagegen $16,2 \pm 0,2$ g (n=17). Über die gesamten ersten 30 Lebenstage betrachtet, sind die KO-Mäuse durchschnittlich 30,8% leichter. Eine zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte die statistische Signifikanz des Gewichtsunterschieds. Abbildung 31 zeigt die Entwicklung des Mausgewichts über die Zeit.

Auffällig war, daß der Gewichtsunterschied zu den Wildtyp-Mäusen bei den Männchen deutlich ausgeprägter war als bei den Weibchen. So wogen die KO-Männchen im Schnitt 34,9% weniger als WT-Männchen, die KO-Weibchen dagegen nur 29,8% weniger als WT-Weibchen.

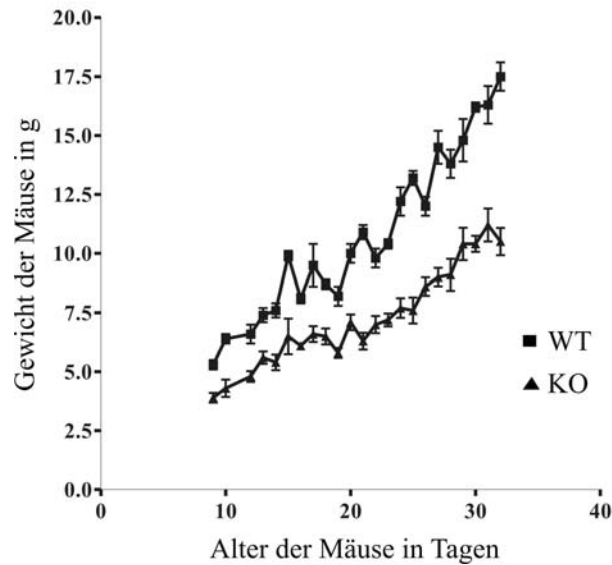


Abbildung 31: Gewichtsvergleich zwischen WT- und KO-Mäusen

Das Gewicht der Mäuse (g) ist gegen das Alter (d) aufgetragen. Quadrate symbolisieren das Gewicht der Wildtyp-Mäuse (obere Datenreihe), Dreiecke das Gewicht der Knockout-Mäuse (untere Datenreihe). WT: n = 3 - 17, KO: n = 4 - 37 (je nach Tag).

6 Bestätigung der CNGB1-Deletion auf DNA-, RNA- und Proteinebene

Die Deletion von Exon 26 des CNGB1-Locus wurde in den Mäusen auf DNA-, RNA- und Proteinebene verifiziert.

6.1 Southern Blot Analyse

Aus Mausschwanz-Proben wurde DNA isoliert (IV.6.1.2), analog zum 2. Targeting mit EcoRI verdaut und mit Sonde W hybridisiert (vgl. V.4.5). Abbildung 32 zeigt die WT-Bande bei 5,6kb, die KO-Bande bei 3,5kb sowie beide Banden bei heterozygoten Mäusen (HZ).

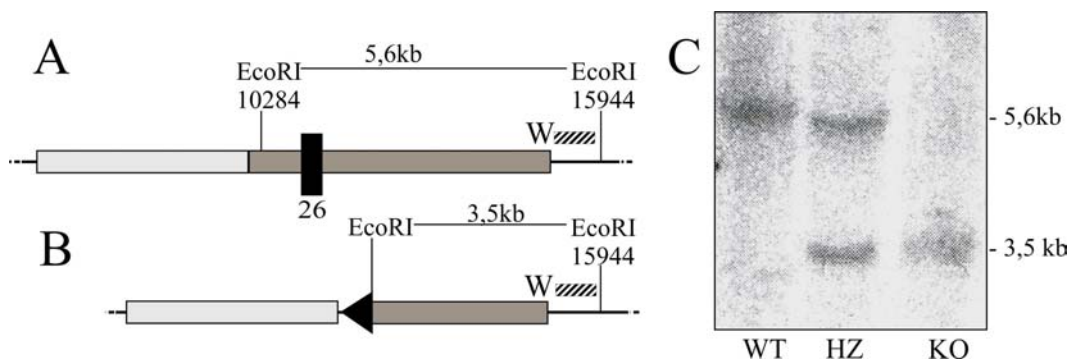


Abbildung 32: Southern Blot Analyse von genomischer DNA der Mäuse

A) Im WT-Locus liegt Sonde W nach EcoRI-Verdau auf einem 5,6kb-Fragment. B) Im KO-Locus hybridisiert Sonde W mit einem 3,5kb-Fragment. C) Eine Southern Blot Analyse der DNA von Wildtyp- (WT), heterozygoten (HZ) und Knockout- (KO)-Mäusen ergibt die erwarteten Fragmentgrößen bei 5,6 bzw. 3,5kb.

6.2 Genotypisierungs-PCR

Zur Überprüfung der erfolgreichen Deletion, vor allem aber zur schnellen Genotypisierung von Mäusen wurde eine Multiplex-PCR entwickelt, mit der gleichzeitig der WT-Locus, der KO-Locus und der gefloxt Locus nachgewiesen werden (IV.1.3). Abbildung 33 zeigt die Genotypisierung von WT-, HZ- und KO-Mäusen.

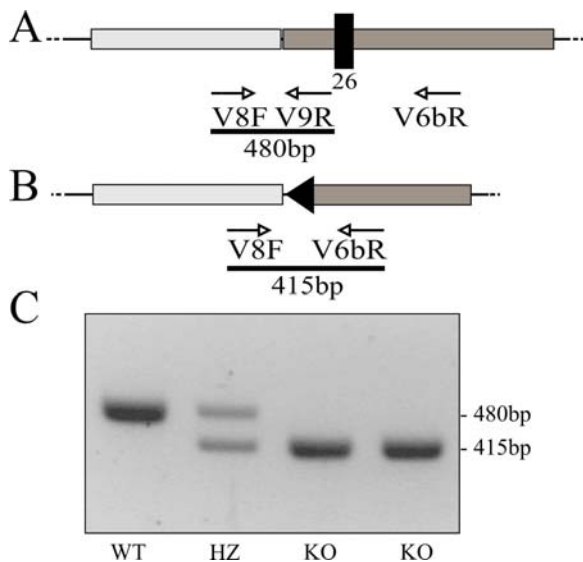


Abbildung 33: Genotypisierung-PCR

A) Im Wildtyp amplifiziert Primerpaar PSHV8F - PSHV9R ein 480bp-Fragment. B) Im KO ergibt nur Primerpaar PSHV8F - PSHV6bR ein PCR-Produkt von 415 bp. C) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der Multiplex-PCR.

Ein gefloxter CNGB1-Locus würde mit Primerpaar PSHV8F–PSHV9R aufgrund der zusätzlichen loxP-Seite ein 593bp-Produkt ergeben.

6.3 RT-PCR

Um die Deletion von Exon 26 auch auf RNA-Ebene zu bestätigen, wurde, wie unter IV.8 beschrieben, RNA aus Retina und olfaktorischem Epithel isoliert und äquivalente Mengen RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt.

Der CNGB1-Locus wurde mit 3 verschiedenen Primerpaaren amplifiziert: PSH33F – PSH31R liegen auf Exon 20 bzw. 21, das PCR-Produkt kann also sowohl aus WT-cDNA als auch aus KO-cDNA amplifiziert werden (Abbildung 34A). Bei den Primerpaaren PSH02F – MAS2 und MAS1 – PSH05R liegt jeweils einer der Primer (MAS1, MAS2) im deletierten Exon 26. Wie Abbildung 34B,C zeigt, entsteht bei fehlendem Exon 26 kein PCR-Produkt.

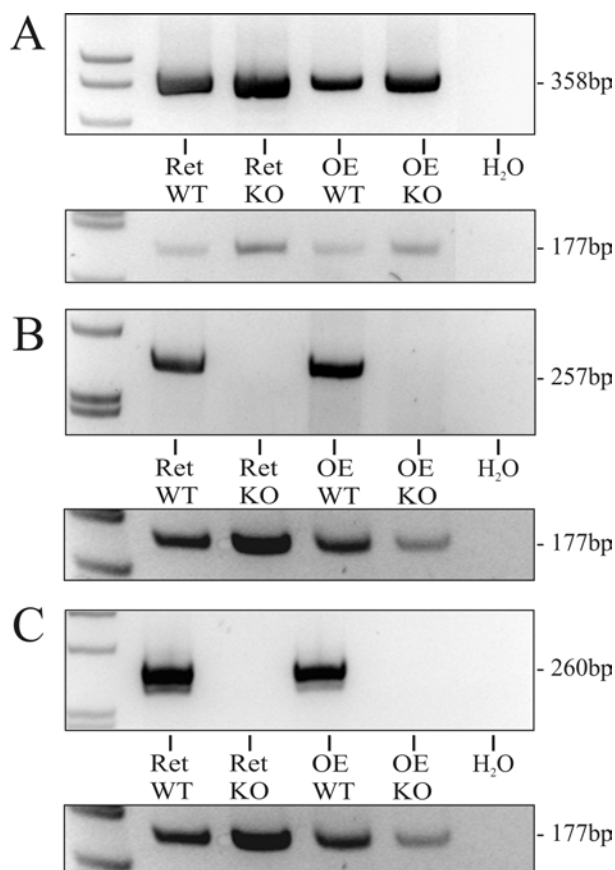


Abbildung 34: RT-PCR mit CNGB1-spezifischen Primern

Die oberen Panele zeigen jeweils die gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkte der CNGB1-spezifischen Primer, darunter die entsprechende HPRT-PCR. A) Primerpaar PSH33F-PSH31R B) Primerpaar PSH02F - MAS2 C) Primerpaar MAS1-PSH05R

6.4 Western Blot Analyse

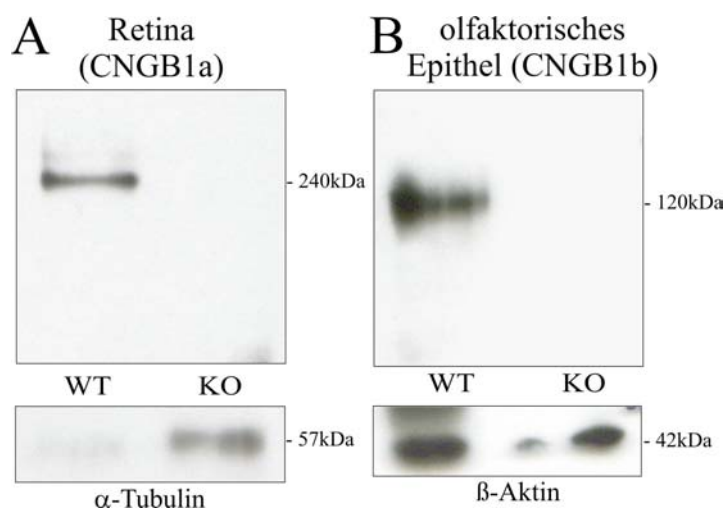


Abbildung 35: CNGB1-Nachweis mit Western Blot Analyse aus Retina und olfaktorischem Epithel

Um zu überprüfen, daß vom KO ausreichende Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Blots als loading control mit α -Tubulin bzw. β -Aktin-Antikörper rehybridisiert (unten).

Zum Nachweis des funktionellen CNGB1-Proteins wurde ein C-terminaler Antikörper verwendet (IV.9.3). Da die Targetingstrategie ein Stopcodon nach Exon 25 zur Folge hat, sollte dieser Antikörper im Gewebe der KO-Mäuse kein Protein erkennen. Es wurden Western Blot Analysen mit Membranpräparationen aus Retina sowie aus olfaktorischem Epithel durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß keine der beiden Spleißvarianten CNGB1a / CNGB1b im Gewebe der transgenen Mäuse nachweisbar ist (Abbildung 35).

6.5 Immunhistochemie

Die Abwesenheit des CNGB1-Proteins in den transgenen Tieren wurde auch in Gefrierschnitten der Retina und des olfaktorischen Epithels immunhistochemisch nachgewiesen (Abbildung 36).

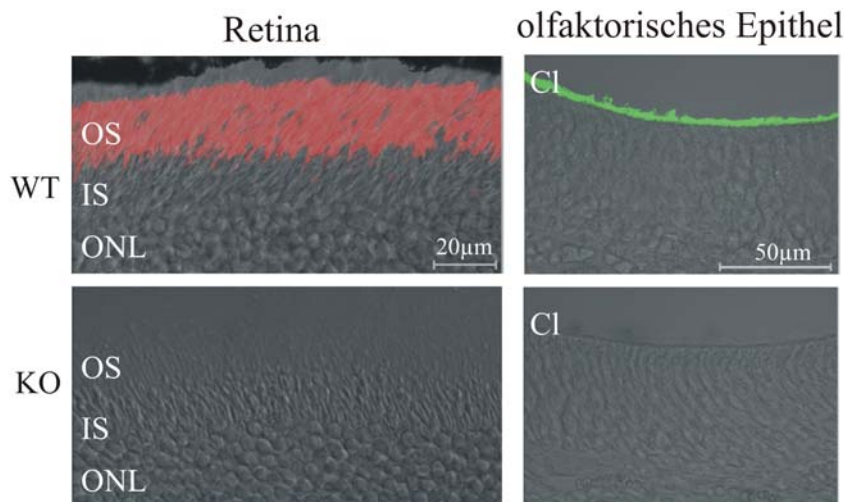


Abbildung 36: immunhistochemischer Nachweis von CNGB1

In der Retina wurde mit Alexa 546-markiertem Sekundärantikörper (rot), im olfaktorischen Epithel mit FITC-markiertem Sekundärantikörper (grün) detektiert. Links: Retinaschnitte von WT- und KO-Mäusen. Rechts: olfaktorisches Epithel von WT- und KO-Mäusen.

7 Retinaler Phänotyp

CNG-Kanäle besitzen eine zentrale Funktion im Sehprozeß (III.1.3). In den Stäbchen ist CNGB1 die modulatorische Untereinheit des CNG-Kanals. Daher wurde das Augenmerk zunächst auf die Retina der CNGB1^{-/-}-Maus gerichtet und der Effekt der CNGB1-Deletion auf die Expression und Lokalisation der anderen CNG-Untereinheiten, auf weitere Proteine der Sehkaskade, auf die Sehfunktion und auf den histologischen Zustand der Retina untersucht.

Retinae von WT- und KO-Mäusen verschiedenen Alters wurden präpariert, wie unter IV.13.1.2 beschrieben für immunhistochemische Untersuchungen eingebettet und Gefrierschnitte angefertigt. Es wurden Mäuse im Alter von 9 Tagen, 15 Tagen, 21 Tagen, 28 Tagen, 2 Monaten, 4 Monaten, 8 Monaten und 10 Monaten untersucht.

7.1 CNGA1

CNGA1 ist die A-Untereinheit, die zusammen mit CNGB1a den Stäbchen-CNG-Kanal bildet. Daher wurde zunächst untersucht, wie sich die CNGB1-Defizienz auf CNGA1 auswirkt.

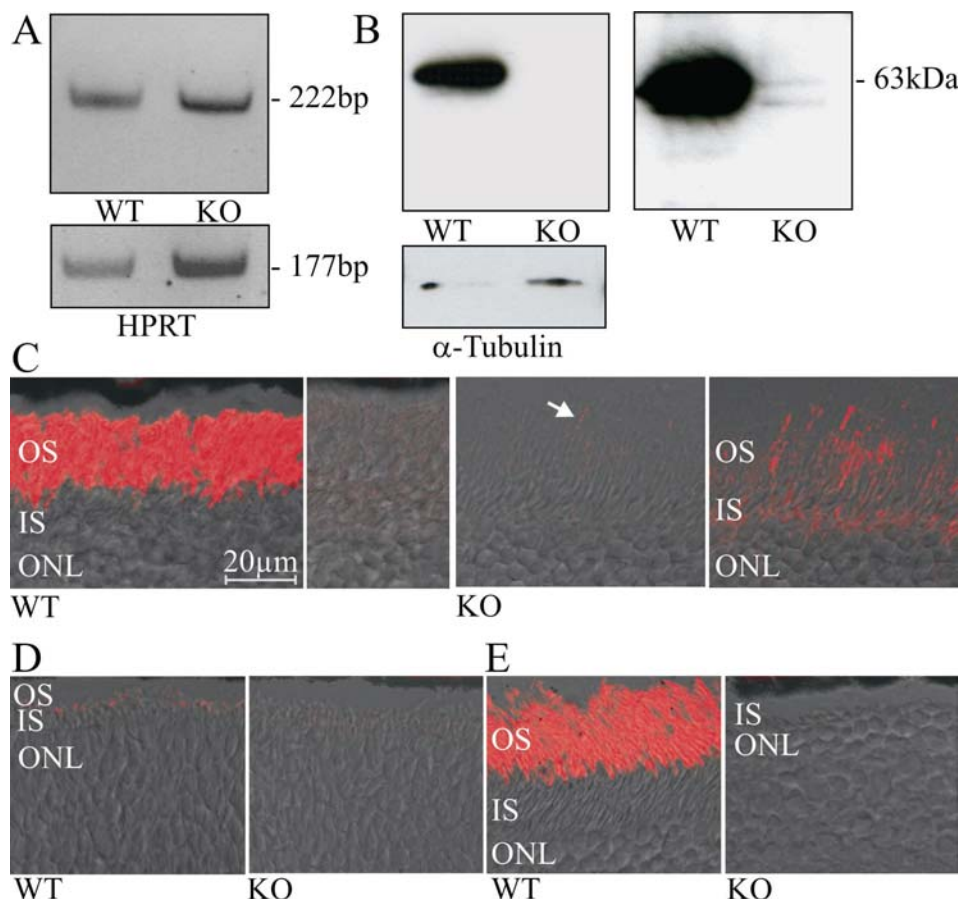


Abbildung 37: CNGA1 in WT- und KO-Retinae im Vergleich

A) RT-PCR aus retinaler cDNA von 2 Monate alten WT- und KO-Mäusen. Unten ist eine RT-PCR mit HPRT-Primern als loading control gezeigt. B) Western Blot Analyse. Links ein normal entwickelter Blot mit Membranproteinen aus WT- und KO-Retinae (2 Monate), darunter Rehybridisierung desselben Blots mit einem Antikörper gegen α -Tubulin als loading control. Rechts derselbe Blot nach deutlich längerer Belichtung des Films (25 min statt 2 min). Das theoretische Molekulargewicht von CNGA1 liegt bei 68kDa, im Western Blot wird das Protein jedoch stets bei 63kDa detektiert (Molday und Molday, 1998). Die Bande bei ca. 60kDa ist eine öfter auftauchende Nebenbande. C) Immunhistochemischer Nachweis von CNGA1. Links eine Wildtyp-Retina (8 Wochen). Eine Kontrolle ohne Primärantikörper zeigt auch bei dreifacher Laserintensität kein Signal (rechts daneben). In der KO-Retina sind bei normaler Anregung nur einzelne Stäbchen schwach angefärbt (weißer Pfeil), bei dreifacher Laserintensität ist ein Restsignal zu erkennen (ganz rechts). D) CNGA1-Detektion in den Retinae 9 Tage alter und E) 10 Monate alter Mäuse WT- und KO-Mäuse.

Während eine RT-PCR mit CNGA1-spezifischen Primern eine unveränderte Transkription von CNGA1 in der Retina von KO-Mäusen zeigte (Abbildung 37A), war dagegen das Protein in einer Western Blot Analyse nicht detektierbar (Abbildung 37B, links). Erst bei längerer Belichtung wurde in mehrfach reproduzierten Versuchen die sehr schwache 63kDa-Bande des CNGA1-Proteins sichtbar (Abbildung 37B, rechts). Immunhistochemische Untersuchungen an

den Retinae 8 Wochen alter Mäuse führten zu demselben Ergebnis (Abbildung 37C): Während im WT ein starkes Signal in den Außensegmenten detektiert wird, ist im KO bis auf ein schwaches Signal in einzelnen Stäbchen keine CNGA1-Immunreaktivität mehr zu sehen. Bei Anregung mit 3facher Laserintensität wird ein schwaches Restsignal in den Innen- und Außensegmenten sichtbar. Dabei handelt es sich nicht um ein unspezifisches Signal, wie die ebenso belichteten, ohne Primärantikörper behandelten Kontrollschnitte zeigen.

Gefrierschnitte 9 Tage alter Mäuse, deren Augen noch geschlossen sind, zeigen im Wildtyp ein noch schwaches, aber deutliches CNGA1-Signal, während in gleichaltrigen KO-Mäusen noch kein CNGA1-Protein detektierbar ist (Abbildung 37D). Im Alter von 10 Monaten ist kein CNGA1-Protein in den KO-Retinae mehr nachweisbar (Abbildung 37E).

7.2 Andere CNG-Untereinheiten

In den Zapfen-Photorezeptoren ist der CNG-Kanal aus CNGA3 und CNGB3 zusammengesetzt. Um zu untersuchen, ob sich durch Deletion von CNGB1 die Expression der Zapfenkanal-Untereinheiten verändert, wurde zunächst eine RT-PCR mit spezifischen Primern für CNGA3 und CNGB3 durchgeführt (IV.1.5). Es konnte gezeigt werden, daß die Transkription von CNGA3 und CNGB3 in der Retina bei Fehlen des CNGB1-Proteins nicht beeinträchtigt ist (Abbildung 38).

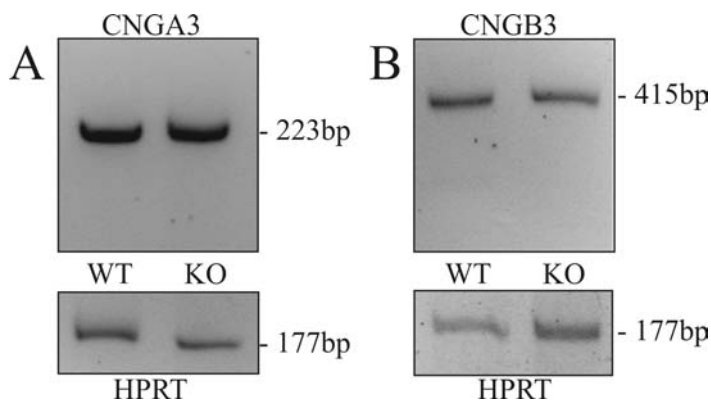


Abbildung 38: Transkription von CNGA3 und CNGB3

RT-PCR von cDNA aus WT- und KO-Retinae. A) CNGA3-spezifisches Primerpaar, unten eine HPRT-PCR als loading control. B) CNGB3-spezifisches Primerpaar, unten die entsprechende HPRT-PCR.

Desweiteren wurde die Expression und Lokalisation von CNGA3 immunhistochemisch untersucht. Wie Abbildung 39 zeigt, ist das Protein in der Retina der CNGB1^{-/-}-Mäuse unverändert nachweisbar. Die Überlagerung mit dem PNA-Signal zeigt, daß die Zapfenkanal-Untereinheit auch in den KO-Tieren nur in den Zapfen, nicht in den Stäbchen, exprimiert wird. Somit kann ausgeschlossen werden, daß der fehlende Kanal aus CNGA1 und CNGB1a in den Stäbchen durch Expression von CNGA3/CNGB3 kompensiert wird.

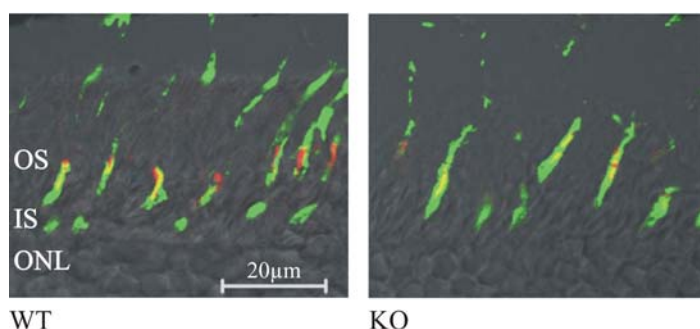


Abbildung 39: Expression von CNGA3 in der WT- und KO-Retina

CNGA3 wurde mit einem roten Sekundärantikörper detektiert, die Zapfen mit FITC-PNA angefärbt (grün). Die Überlagerung beider Signale erscheint gelb.

Auch eine Transkription der Untereinheiten CNGA2 und CNGA4, die im olfaktorischen CNG-Kanal vorkommen, konnte in der CNGB1^{-/-}-Retina nicht festgestellt werden (Abbildung 40). Immunhistochemisch kann kein CNGA2-Signal in der KO-Retina detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

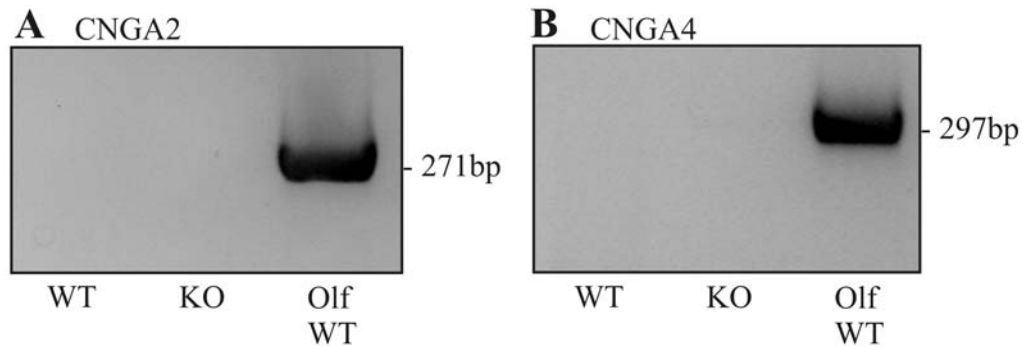


Abbildung 40: RT-PCR mit spezifischen Primern für CNGA2 (A) und CNGA4 (B)

Weder in der WT- noch in der KO-Retina sind Transkripte nachweisbar.

7.3 Proteine der Phototransduktionskaskade in Stäbchen

Um zu untersuchen, wie sich der Verlust des CNG-Kanals auf die Signaltransduktion in den Stäbchen-Photorezeptoren auswirkt, wurden wichtige Proteine der Sehkaskade untersucht. Auf die Degeneration der Photorezeptoren, die bei der Visualisierung der Stäbchenproteine sichtbar wird, wird erst unter V.7.4 eingegangen.

7.3.1 Rhodopsin

Rhodopsin ist das Photopigment der Stäbchen-Photorezeptoren. Ein menschliches Stäbchen enthält etwa 4×10^7 Moleküle Rhodopsin, was einem Anteil von rund 80% des Gesamtproteingehalts der Außensegmente entspricht (Nathans, 1992).

Rhodopsin wurde zunächst in der Retina gerade adulter Mäuse immunhistochemisch nachgewiesen (Abbildung 41). Das Protein wird in der CNGB1-defizienten Retina exprimiert und ist wie im Wildtyp in den Außensegmenten der Photorezeptoren lokalisiert. Eine Akkumulation im Soma konnte nicht beobachtet werden. Das immunhistochemische Rhodopsin-Signal wurde mit zunehmendem Verlust der Stäbchen schwächer und konnte somit ausgewertet werden, um den Schweregrad der Degeneration der Stäbchen-Außensegmente zu verfolgen (V.7.4).

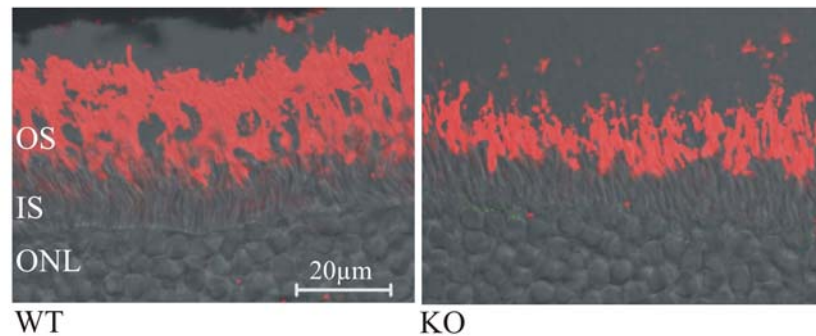


Abbildung 41: immunhistochemischer Nachweis von Rhodopsin

Links Rhodopsin in der WT-Retina (rot), rechts in der KO-Retina 8 Wochen alter Mäuse.

7.3.2 GARP

Der CNGB1-Lokus codiert nicht nur für die beiden Spleißvarianten des CNGB1-Kanals, sondern auch für zwei zytosolisch lokalisierte Proteine, GARP1 und GARP2. Ihre Funktion ist noch ungeklärt, doch konnten sie an den Disks der Stäbchen lokalisiert werden (Körschen et al., 1999).

Die Stäbchen wurden mit einem Antikörper gegen GARP visualisiert, der sowohl den N-Terminus von CNGB1 als auch die beiden separaten GARP-Proteine detektiert. Abbildung 42 zeigt, daß GARP in der CNGB1^{-/-}-Retina adulter Mäuse exprimiert werden und in den Außensegmenten der Stäbchen lokalisiert sind. Das GARP-Signal nahm mit zunehmendem Alter der Tiere lediglich in dem Maße ab, in dem die Außensegmente der Stäbchen verkürzt waren. Erst bei 10 Monate alten Tieren, die annähernd keine Stäbchen mehr besitzen, ist auch das GARP-Signal fast vollständig verschwunden (Abbildung 42). Es ist also davon auszugehen, daß weder die GARP-Transkription von dem modifizierten CNGB1-Locus noch die Expression und Funktionalität der Proteine gestört sind.

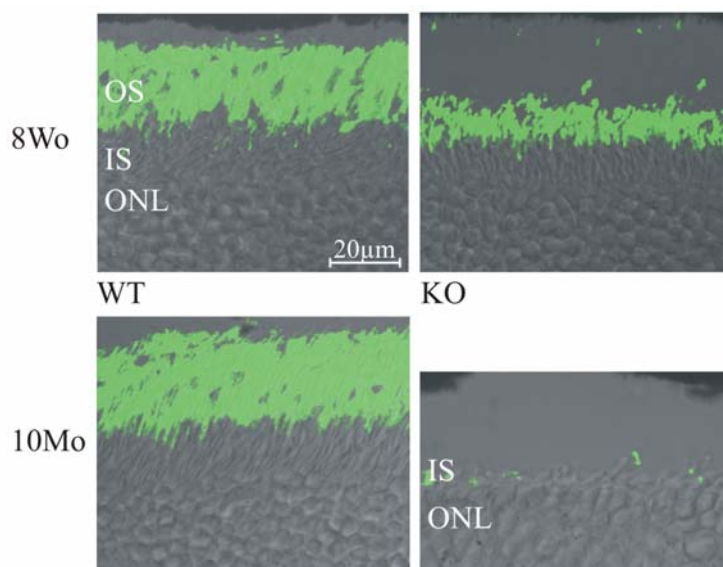


Abbildung 42: Detektion von GARP in WT- und KO-Retinae

Der Antikörper erkennt sowohl GARP1 und GARP2 als auch den N-Terminus von CNGB1. Oben: GARP-Signal in 8 Wochen alten WT- und KO-Retinae. Unten: GARP-Signal bei 10 Monate alten Mäusen.

7.3.3 Guanylatzyklase E

In der Retina kommen zwei membranständige Guanylatzyklasen vor, die durch permanente cGMP-Synthese die CNG-Kanäle im Dunkelzustand offenhalten, GC-E und GC-F. Die GC-E wird sowohl in den Stäbchen als auch in den Zapfen exprimiert (Yang und Garbers, 1997; Koch et al., 2002).

Der immunhistochemische Nachweis von GC-E zeigt, daß sie bei 9 und 15 Tage alten KO-Mäusen vergleichbar mit WT-Mäusen exprimiert wird (Abbildung 43). Ab der achten Woche zeigt sich auch in der GC-E-Immunreaktivität die beginnende Stäbchendegeneration, doch wird sie nicht schwächer. Auch im Alter von 10 Monaten ist noch ein Rest-Signal vorhanden (Abbildung 43). Überlagerung mit den Zapfen (visualisiert mit PNA) zeigt, daß ein Großteil des verbleibenden GC-E-Signals aus den noch überlebenden Zapfen stammt.

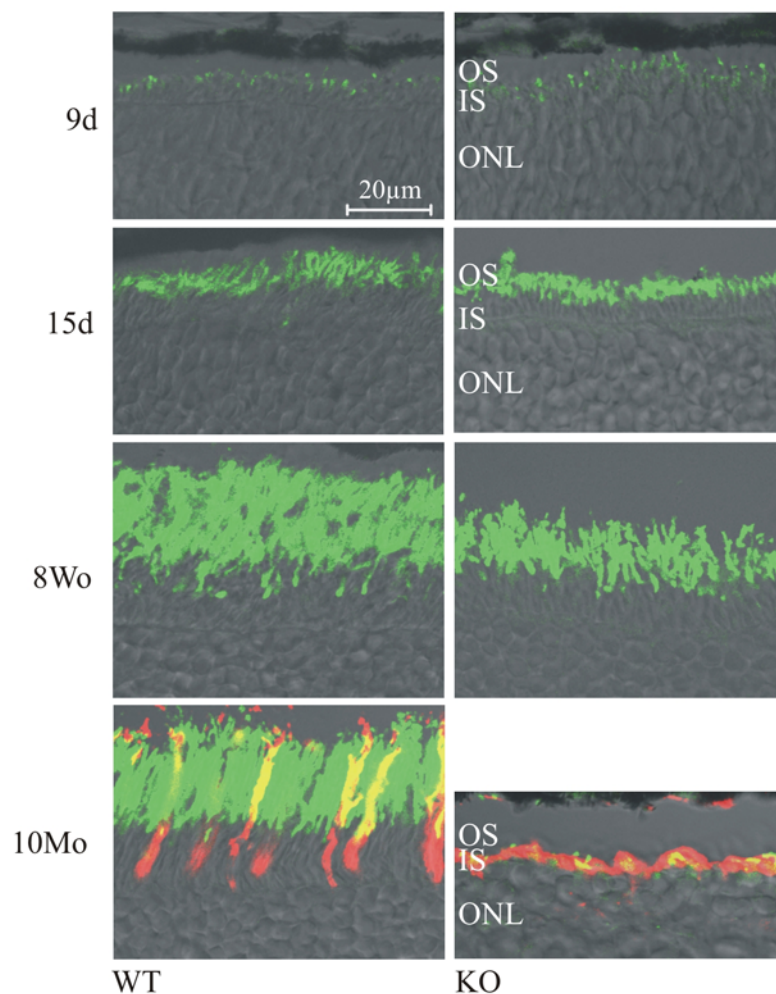


Abbildung 43: Guanylatzyklase E

Immunhistochemischer Nachweis der GC-E in Retinae 9 Tage, 15 Tage, 8 Wochen und 10 Monate alter WT- und KO-Mäuse (grün). Auf den 10 Monate alten Retinae wurden zusätzlich die Zapfen mit PNA (rot) angefärbt.

Es kann also festgehalten werden, daß andere wichtige Proteine in den Außensegmenten der Stäbchen in ihrer Expression und Lokalisation zunächst nicht beeinflusst werden. Erst mit zunehmender Abnahme der Zahl und Länge der Stäbchen, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird, sind auch die Stäbchenproteine in geringerem Ausmaß nachweisbar.

7.4 Degeneration der CNGB1-defizienten Retina

Wie bei den immunhistochemischen Untersuchungen von Rhodopsin und anderen Stäbchen-Proteinen schon zu sehen war, waren die Außensegmente der Stäbchen bei den KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen mit zunehmendem Alter verkürzt. Diese Beobachtung gab den Anlaß zu Untersuchungen der Retinae der KO-Mäuse im Hinblick auf degenerative Prozesse. Untersucht wurden der Verlauf der Degeneration der Außensegmente von Stäbchen und Zapfen sowie das Absterben der Photorezeptoren und der damit verbundene Verlust an Zellkernen in der ONL. Weiter wurde die Retina der KO-Tiere auf Anzeichen einer Gliose und apoptotischer Vorgänge im Rahmen der Retina-Degeneration untersucht.

7.4.1 Außensegmente der Photorezeptoren

Schon in Durchlichtaufnahmen fiel auf, daß die Außensegmente der Photorezeptoren bei den CNGB1-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp verkürzt sind und weniger dicht erscheinen. Im Alter von 10 Monaten waren bei KO-Mäusen keine intakten Strukturen von Außen- und Innensegmenten der Photorezeptoren mehr erkennbar (Abbildung 44).

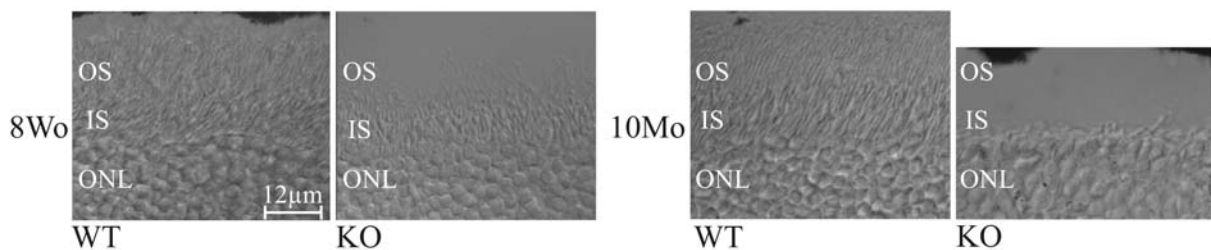


Abbildung 44: DIC-mikroskopische Aufnahmen der Retina

Retinae von 8 Wochen (links) und 10 Monate (rechts) alten WT- und KO-Mäusen im Vergleich.

Um die Feinstruktur der Außensegmente zu untersuchen, wurden Retinaschnitte elektronenmikroskopisch untersucht (Transmissions-Elektronenmikroskopie, TEM). Die Einbettung in Kunstharz wurde freundlicherweise von Frau Heidi Geiger durchgeführt, die Aufnahmen wurden im Arbeitskreis von Frau Dr. Silke Haverkamp (Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt) gemacht. Zu erkennen ist eine Verkürzung und Verdickung der Außensegmente sowie eine Abnahme ihrer Anzahl, die Photorezeptorschicht erscheint deutlich „lichter“ als in der WT-Retina (Abbildung 45A,B). Auch sind in den KO-Retinae einzelne Außensegmente zu sehen, die gerade zu degenerieren scheinen (weiße Pfeile in Abbildung 45B). Bei einem Großteil der Photorezeptoren ist jedoch die Morphologie, speziell die Struktur der Disks und ihre Verankerung mit der Zellwand, dem Wildtyp vergleichbar (Abbildung 45C).

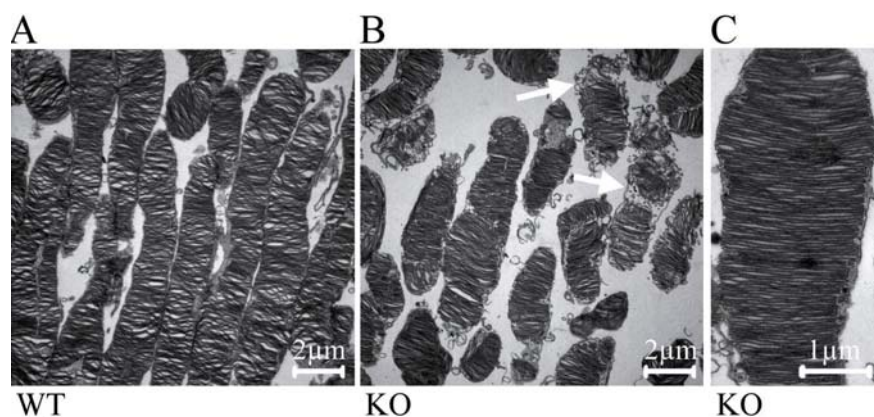


Abbildung 45: elektronenmikroskopische Aufnahmen von Photorezeptor-Außensegmenten

Retinae 6 Wochen alter WT- und KO-Mäuse im Vergleich (A + B). Außensegmente, bei denen ein Degenerationsprozeß zu erkennen ist, sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet (B). In C eine vergrößerte Aufnahme eines Stäbchen-Außensegments einer 6 Wochen alten KO-Maus.

In Gefrierschnitten wurden die Stäbchen-Außensegmente mit einem Rhodopsin-Antikörper angefärbt, die Zapfen mit PNA (Abbildung 46). Bei 9 Tage alten Mäusen, deren Augen noch geschlossen sind, ist noch kein Unterschied in den sich entwickelnden Photorezeptoren zu erkennen. Doch bereits an Tag 15 ist eine Verkürzung der Außensegmente zu beobachten, die mit steigendem Alter der Mäuse zunimmt (exemplarisch ist die Retina 4 Wochen alter Mäuse gezeigt). Auch die Außensegmente der Zapfen beginnen sich ab der vierten Lebenswoche langsam zu verkürzen. Im Alter von 10 Monaten sind nur noch winzige Reste von Stäbchen zu sehen, sowie einzelne Zapfen, die auf der äußeren Körnerschicht liegen.

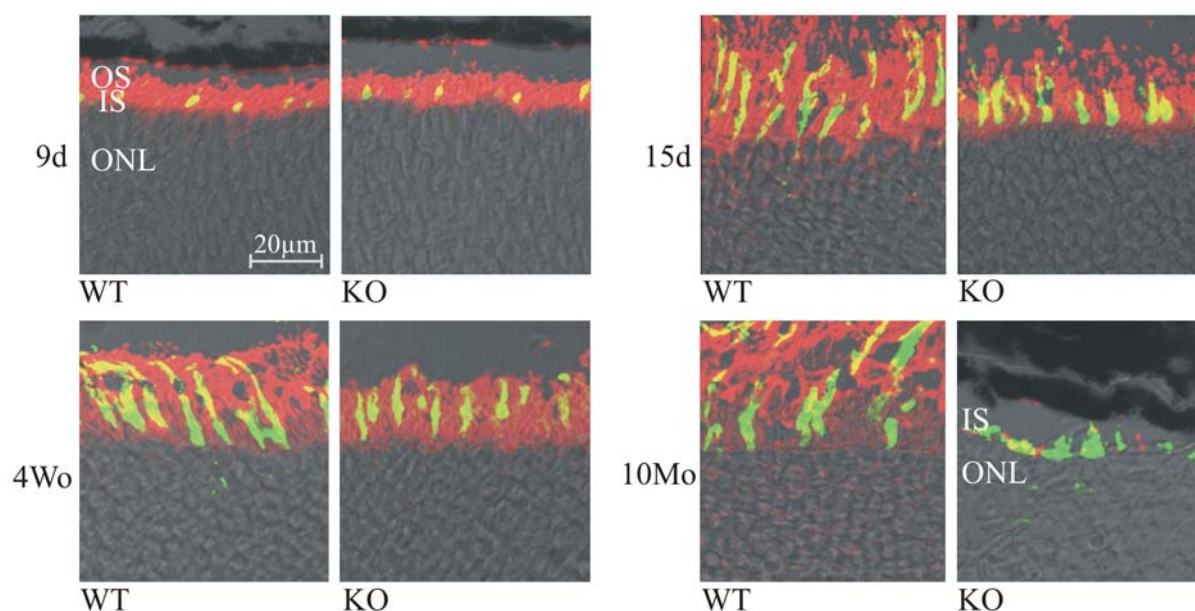


Abbildung 46: Visualisierung der Photorezeptor-Außensegmente

Die Stäbchen-Außensegmente wurden mit Rhodopsin-Antikörper gefärbt (rot), die Zapfen mit PNA (grün). Es wurden die Retinae 9 Tage, 15 Tage, 4 Wochen und 10 Monate alter Wildtyp- und Knockout-Mäuse verglichen.

Von Retina-Fragmenten 4 Monate alter Mäuse wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht (Abbildung 47). Auch hier zeigte sich die massive Verkürzung der Photorezeptor-Außensegmente.

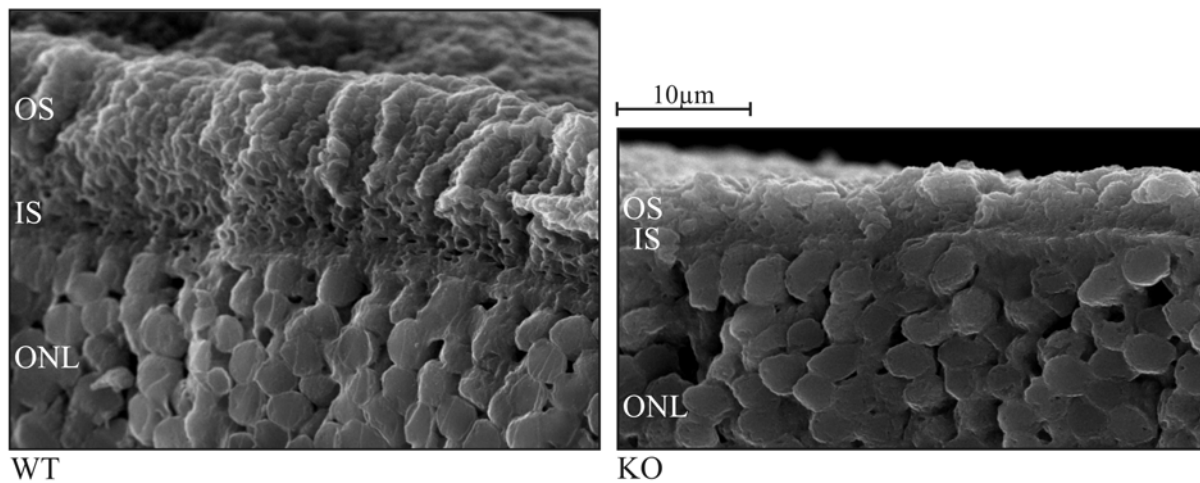


Abbildung 47: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von WT- und KO-Retinae

In der Retina 4 Monate alter KO-Mäuse ist eine Degeneration der Photorezeptor-Außensegmente zu sehen. Strukturen von Außensegmenten sind kaum noch zu erkennen, die noch funktionellen Zapfen scheinen zusammengefallen auf den Resten der Stäbchen zu liegen.

7.4.2 Schichtdicke der Körnerschichten

Die bisher vorgestellten Daten zeigten eine Verkürzung und Auslichtung der Außensegmente von Stäbchen. Um zu untersuchen, ob auch die Zahl der Photorezeptoren abnimmt, wurden die Zellkerne in der äußeren Körnerschicht untersucht. Durch Färbung der Zellkerne läßt sich die Schichtdicke der äußeren Körnerschicht und darüber die Anzahl der Photorezeptoren beurteilen. Bei jungen Mäusen ist kein Unterschied in der Schichtdicke von äußerer und innerer Körnerschicht zwischen WT- und KO-Mäusen zu erkennen (Abbildung 48, exemplarisch sind die Retinae 21 Tage alter Mäuse gezeigt). Ab einem Alter von 2 Monaten jedoch wird die äußere Körnerschicht der CNGB1-defizienten Tiere kontinuierlich dünner, bis im Alter von 10 Monaten nur noch eine einzige Zellkernreihe die äußere Körnerschicht bildet (Abbildung 48). Peripher ist auch diese teilweise unterbrochen (Daten nicht gezeigt). Die rundliche Form der Kerne läßt darauf schließen, daß es sich bei den verbleibenden Photorezeptoren um Zapfen handelt.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, daß es in der CNGB1^{-/-}-Retina ab Tag 15 zu einer Verkürzung der Außensegmente sowie etwa ab dem zweiten Lebensmonat zu einer Reduktion der Photorezeptor-Zellkerne in der äußeren Körnerschicht kommt. Auch bei den Zapfen ist, zeitlich versetzt, eine Verkürzung der Außensegmente zu beobachten. In den Retinae 10 Monate alter KO-Mäuse sind nur noch vereinzelte Reste zusammengefallener Photorezeptoren sowie eine einzige, diskontinuierliche Schicht von Zellkernen in der ONL vorhanden.

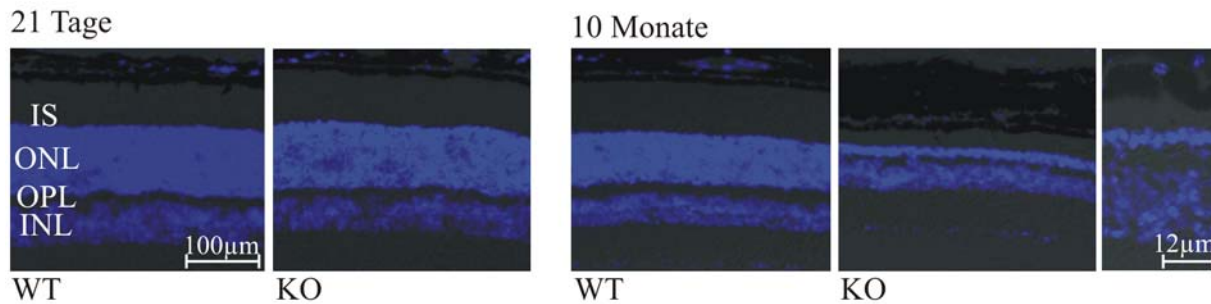


Abbildung 48: Schichtdicke der äußeren und inneren Körnerschicht

Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Die linken beiden Bilder zeigen konfokalmikroskopische Aufnahmen von 21 Tage alten WT- und KO-Retinae, die Bilder rechts daneben von 10 Monate alten Retinae. Ganz rechts ist eine vergrößerte Aufnahme zu sehen, in der erkennbar ist, daß nach 10 Monaten bei KO-Mäusen zentral nur noch eine einzelne Reihe Zellkerne verbleibt. Die Schichtdicke der inneren Körnerschicht dagegen verändert sich bei den KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp bis zu diesem Zeitpunkt nicht.

7.4.3 Funktionalität der verbleibenden Zapfen

Wie durch Visualisierung mit PNA gezeigt wurde, sind im Alter von 10 Monaten noch einzelne Zapfen in den KO-Retinae vorhanden, die zusammengefallen auf der äußeren Körnerschicht liegen. Da PNA nur an Strukturen auf der Zapfenoberfläche bindet, kann daraus noch keine Aussage über die Funktionalität der Zapfen gemacht werden.

Äquivalent zum Rhodopsin in den Stäbchen enthalten Zapfen als Photopigment entweder kurz- oder mittelwellensensitives Zapfenopsin (SWS bzw. MWS). Mit Antikörpern gegen die beiden Proteine wurde untersucht, ob diese funktionell wichtigen Proteine in den verbleibenden Zapfen noch exprimiert werden. Abbildung 49 zeigt die Entwicklung der MWS-Immunreaktivität, für SWS wurden die gleichen Beobachtungen gemacht (Daten nicht gezeigt). Im Alter von 8 Wochen waren die Außensegmente der Zapfen zwar schon verkürzt, die Zapfenopsine wurden jedoch unverändert exprimiert. Sie waren bis zum Alter von 6 Monaten nachweisbar. Trotz verbleibendem PNA-Signal konnte in den Retinae 11 Monate alter CNGB1-defizienter Mäuse dagegen keine SWS- oder MWS-Immunreaktivität mehr festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt ist also die Degeneration der Zapfen soweit fortgeschritten, daß sie nicht mehr funktionell sind.

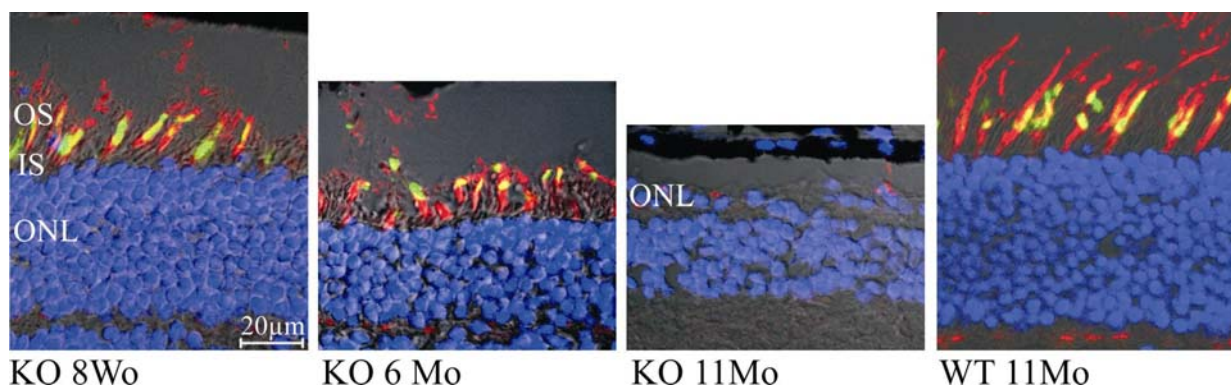


Abbildung 49: Nachweis von MWS in den Retinae von KO- und WT-Mäusen

MWS wurde mit grün markiertem Sekundärantikörper detektiert. Die Zapfen wurden mit PNA in rot angefärbt, die Kerne in blau mit Hoechst 33342.

7.4.4 Gliose

Die gesamte Retina ist durchzogen von Müller-Gliazellen, die sowohl Stütz- als auch Versorgungs- und Regulationsfunktionen haben (Newman und Reichenbach, 1996). Die Somata der Müller-Gliazellen sitzen in der inneren Körnerschicht, nach innen enden die Zellen in Endfüßchen, die die Retina zum Glaskörper hin abgrenzen, nach außen hin reichen ihre Fortsätze bis in die äußere Körnerschicht.

Kommt es zu einer Verletzung der Retina oder zu degenerativen Veränderungen, beginnt ein Aktivierungs-Prozess, der als reaktive Gliose bezeichnet wird. Ein Merkmal dieser Gliose ist eine schnelle, massive Hochregulierung von Intermediärfilamenten wie Vimentin oder saurem Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein, GFAP). Während GFAP in der intakten Retina nur in den Endfüßen der Müller-Gliazellen detektierbar ist, ziehen sich nun mit GFAP gefüllte Gliazellen durch die ganze Retina (de Raad et al., 1996).

Sowohl bei anderen Maus-Modellen für Retina-Degeneration als auch bei der humanen Retinitis pigmentosa wurde eine GFAP-Induktion beschrieben (Fariss et al., 2000).

Die *CNGB1*^{-/-}-Retinae wurden durch immunhistochemischen Nachweis von GFAP auf eine Aktivierung der Gliazellen untersucht (Abbildung 50).

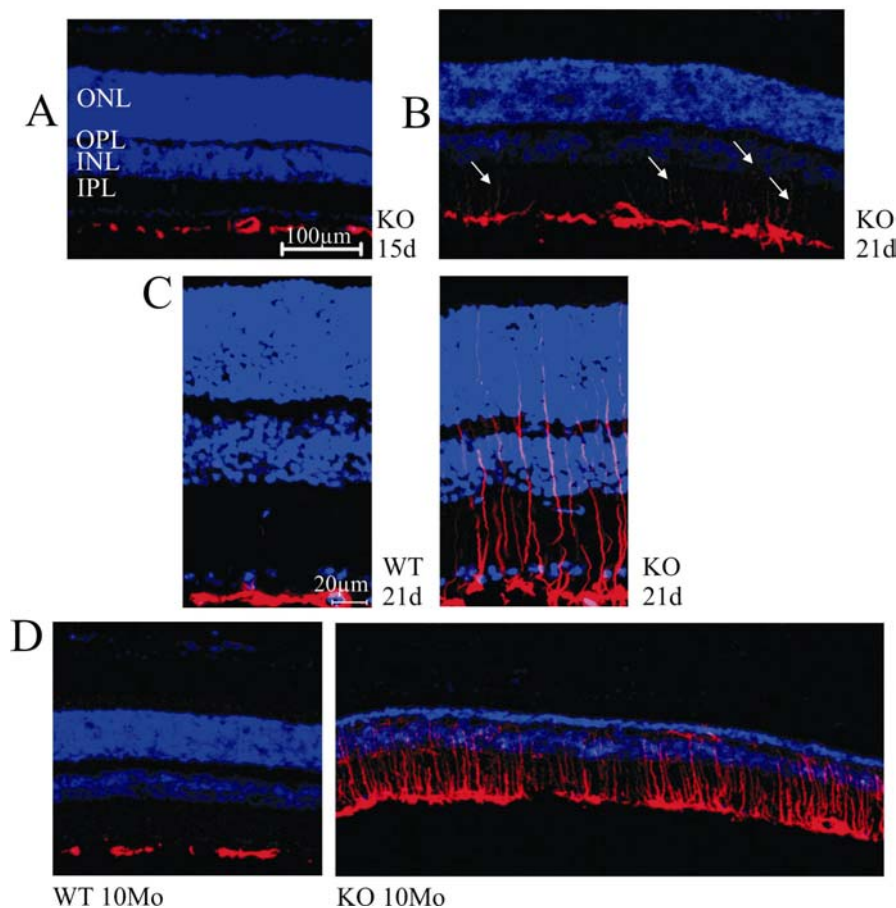


Abbildung 50: immunhistochemische Detektion des sauren Gliafaserproteins (GFAP)

GFAP ist rot, die Zellkerne sind mit Hoechst 33342 blau visualisiert. A) Bei 15 Tage alten KO-Mäusen ist keine Aktivierung der Müller-Gliazellen erkennbar. B) Im Alter von 21 Tagen sind erste dünne GFAP-positive Gliafasern in den KO-Retinae zu sehen (weiße Pfeile), C) vergrößerte Darstellung der WT- und KO-Retina an Tag 21. D) Nach 10 Monaten ist eine massive GFAP-Induktion zu beobachten.

Im Alter von 15 Tagen zeigten sich noch keine Veränderungen, GFAP wurde wie im Wildtyp in den Endfüßchen der Müller-Gliazellen nachgewiesen (Abbildung 50A). Bei drei Wochen alten Mäusen zeigten sich erste feine GFAP-positive Fasern, die sich von den Endfüßchen aus in die Retina hineinzogen (Abbildung 50B,C). Die GFAP-positiven Gliafasern wurden mit zunehmendem Alter der Mäuse dicker und länger, in den Retinae 10 Monate alter *CNGB1*^{-/-}-Mäuse war eine massive GFAP-Hochregulation zu sehen (Abbildung 50D).

7.4.5 Apoptose

Zelluntergang in Geweben kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen, Nekrose oder Apoptose. Die Nekrose ist ein mit einer Entzündungsreaktion verbundener Untergang ganzer Zellverbände, während die Apoptose, der sogenannte „programmierte Zelltod“, das kontrollierte Absterben und die darauffolgende Phagozytose einzelner Zellen ist.

Um zu untersuchen, ob der Verlust an Photorezeptoren in den Retinae der *CNGB1*-defizienten Mäuse apoptotisch oder nekrotisch verläuft, wurden immunhistochemische Untersuchungen mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3 durchgeführt. Caspasen sind die zentralen Mediatoren der Apoptose. Es handelt sich um Cystein-Proteasen, die Proteine C-terminal von spezifischen Aspartatresten spalten. Caspase 3 gehört zu den sogenannten Effektor-Caspasen, die von den Initiator-Caspasen aktiviert werden und durch Spaltung einer Vielzahl zellulärer Proteine den Zelltod vermitteln. Die Caspasen liegen in der Zelle als Procaspasen vor, die noch keine enzymatische Aktivität besitzen. Wenn es in der Zelle zur Aktivierung der Apoptose-Kaskade kommt, wird eine Prodomäne abgespalten sowie das verbleibende Protein in eine 20kDa- und eine 10kDa-Untereinheit gespalten. Heterotetramere aus zwei 10kDa- und zwei 20kDa-Untereinheiten stellen das aktive Enzym dar (Chan und Mattson, 1999).

Der verwendete Antikörper erkennt spezifisch die gesplattene, also aktivierte Form von Caspase 3, detektiert also Zellen innerhalb eines Zellverbands, in denen Apoptose abläuft.

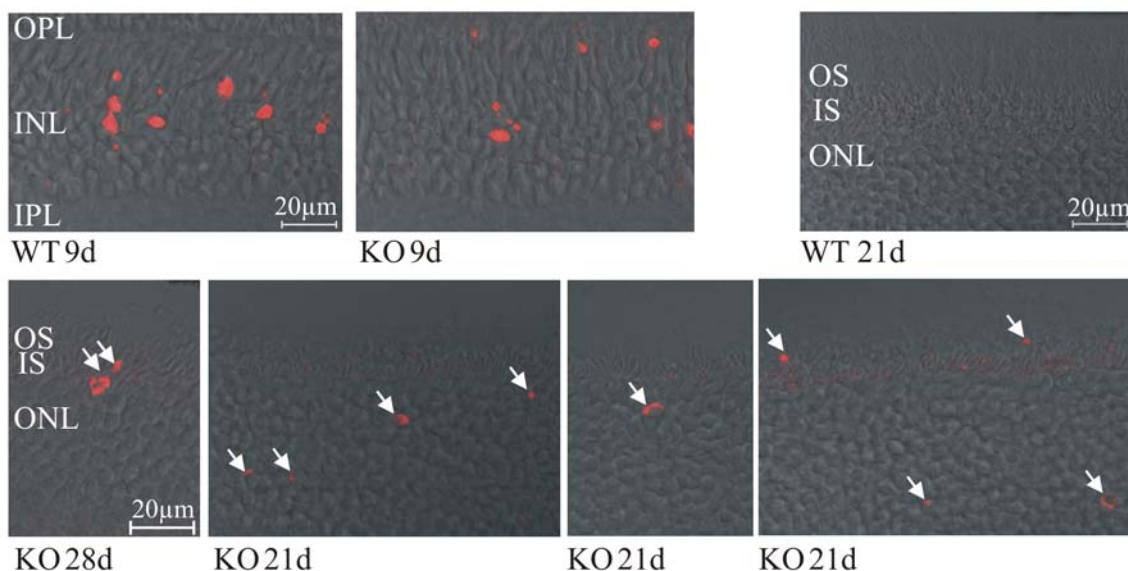


Abbildung 51: Nachweis von Caspase 3-Aktivierung in WT- und KO-Retinae

Die Detektion apoptotischer Zellen erfolgte mit einem Antikörper gegen aktive Caspase 3 (rot). Im Alter von 9 Tagen (oben, links) sind sowohl bei WT- als auch bei KO-Mäusen apoptotische Zellen in der inneren Retina zu finden. Später ist im WT keine Aktivierung von Caspase 3 mehr zu sehen (oben, rechts), während bei den KO-Mäusen zahlreiche apoptotische Zellen nachgewiesen werden können (untere Reihe). Gezeigt sind Beispiele von 28 und 21 Tage alten KO-Mäusen, bei denen die höchste Dichte positiver Zellen zu finden war.

Es wurden Mäuse im Alter von 9 Tagen, 15 Tagen, 21 Tagen, 28 Tagen, 2 Monaten und 10 Monaten untersucht. An Tag 9 sind aufgrund der entwicklungsbedingten Apoptose (Young, 1984) sowohl bei WT- als auch bei KO-Mäusen zahlreiche apoptotische Zellen vor allem in der inneren Retina zu sehen (Abbildung 51). Ab Tag 15 waren in den Schnitten von WT-Retinae keine apoptotischen Zellen mehr detektierbar. In den KO-Retinae dagegen waren bei heranwachsenden Tieren Zellen, in denen die Aktivierung von Caspase 3 nachgewiesen wurde, vor allem in der äußeren Retina zu finden. Der Antikörper markierte Strukturen in den Außen- und Innensegmenten der Photorezeptoren, aber auch Kerne von Photorezeptoren (Abbildung 51). Die höchste Dichte an apoptotischen Zellen war im Alter von 21 und 28 Tagen zu beobachten, danach nahm die Zahl kontinuierlich ab.

7.5 Innere Retina der CNGB1^{-/-}-Mäuse

Die innere Retina der CNGB1-defizienten Mäuse wurde mit Markern für die einzelnen Zelltypen untersucht (Übersicht über Marker für Zelltypen der Retina: Haverkamp et al. (2000), Haverkamp et al. (2003)). Die Versuche wurden an 6 bis 11 Monate alten Mäusen durchgeführt, da im Alter verstärkt mit Veränderungen in der inneren Retina zu rechnen ist. Die Färbung der Kerne mit Hoechst 33342 zeigte keine gravierenden Veränderungen in der inneren Retina (Abbildung 48).

7.5.1 Verlust von Zellfortsätzen in Stäbchen-Bipolar- und Horizontalzellen

Die Stäbchen-Bipolarzellen wurden mit einem Antikörper gegen die zytosolische Proteinkinase C (PKC α) visualisiert. Er färbt die gesamte Struktur der Zellen. Zur Darstellung der Horizontalzellen wurden Retina-Gefrierschnitte mit einem Antikörper gegen das calciumbindende Protein Calbindin inkubiert. Auch Calbindin wird zytosolisch exprimiert, also visualisiert der Antikörper die gesamte Zellstruktur der Horizontalzellen.

Sowohl bei den Stäbchen-Bipolarzellen als auch bei den Horizontalzellen konnte ein Verlust der Dendriten bzw. Neuriten in der äußeren Synapsenschicht beobachtet werden, also am Ort der Verschaltung mit den Stäbchen (Abbildung 52).

Visualisierung von Stäbchen-Bipolarzellen, ON-Zapfen-Bipolarzellen und OFF-Zapfen-Bipolarzellen mit Antikörpern gegen G α , einem membranständigen G-Protein sowie CaB5, einem zytosolischen calciumbindenden Protein, bestätigten den hier beobachteten Verlust beziehungsweise die Rückbildung der Dendriten (Abbildung 56).

Da der Rückzug von Dendriten bzw. Neuriten auf den Verlust von funktionierenden Synapsen schließen läßt, wurden die synaptischen Vesikel mit einem Synaptophysin-Antikörper visualisiert. Wie zu erwarten war, ist das Synaptophysin-Signal in der äußeren plexiformen Schicht deutlich reduziert (Abbildung 53).

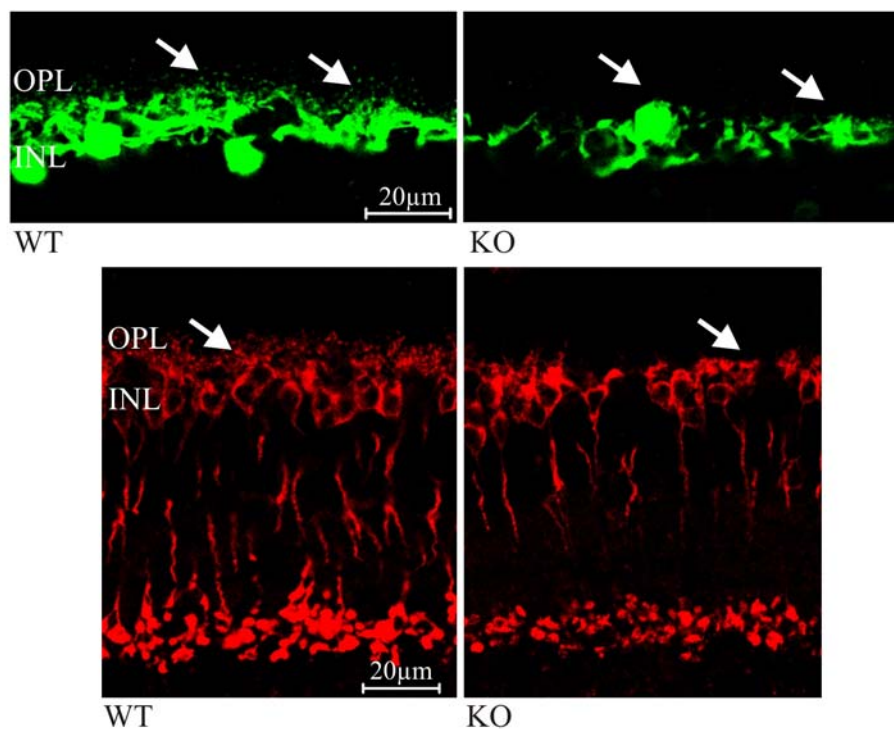


Abbildung 52: Verlust von Dendriten der Stäbchen-Bipolarzellen und Neuriten der Horizontalzellen

Oben: Visualisierung der Horizontalzellen mit Calbindin-Antikörper (grün). Das Netz feiner Neuriten, über das die Horizontalzellen Kontakt zu den Photorezeptoren haben, fehlt in den KO-Retinae (weiße Pfeile). Unten: Anfärbung der Stäbchen-Bipolarzellen mit PKC α -Antikörper (rot). Den Zellen fehlen in den KO-Retinae die Dendriten in der inneren plexiformen Schicht (weiße Pfeile). Untersucht wurden 11 Monate alte Mäuse.

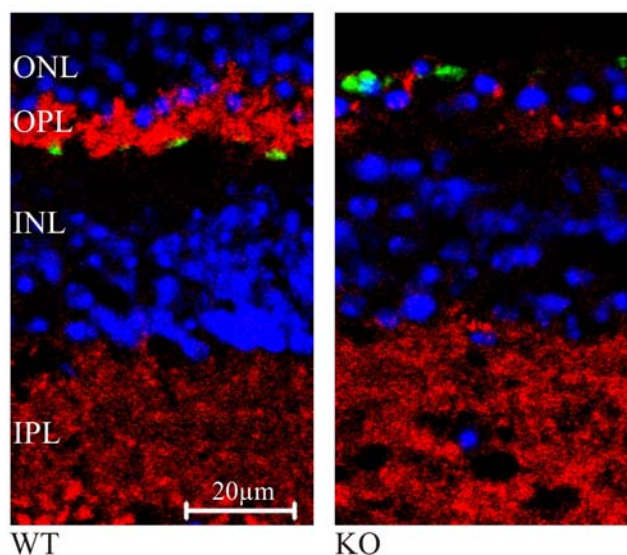


Abbildung 53: immunhistochemische Färbung synaptischer Vesikel

Retinaquerschnitte 11 Monate alter CNGB1^{+/+}- und CNGB1^{-/-}-Mäuse. Synaptische Vesikel wurden mit einem Synaptophysin-Antikörper detektiert (rot), die Zellkerne zur Darstellung der äußeren und inneren Körnerschicht mit Hoechst 33342 gefärbt (blau). Mit PNA visualisierte Zapfen und Zapfensynapsen sind in grün dargestellt. Dabei stellen die großen grünen Punkte in der KO-Retina keine Zapfensynapsen dar, sondern die Reste von Zapfen, die auf der verbleibenden Reihe der äußeren Körnerschicht (ONL) liegen.

7.5.2 Neuronal sprouting

Bei anderen retinalen Degenerationsprozessen wurde beschrieben, daß Neuronen, deren Dendriten zurückgezogen sind, einzelne lange Zellfortsätze bilden, um die verloren gegangenen Kontakte zu anderen Zellen wieder herzustellen (neuronal sprouting). Mit PKC α - und Calbindin-Antikörpern angefärbte Retinaschnitte der CNGB1-defizienten Mäuse wurden auf Anzeichen von neuronal sprouting hin untersucht. Über die ganze Retina verteilt fanden sich sowohl Stäbchen-Bipolarzellen als auch Horizontalzellen, die Ausläufer in die äußere Körnerschicht bildeten. In Abbildung 54 ist exemplarisch ein Bild von 6 Monate alten WT- und KO-Retinae gezeigt.

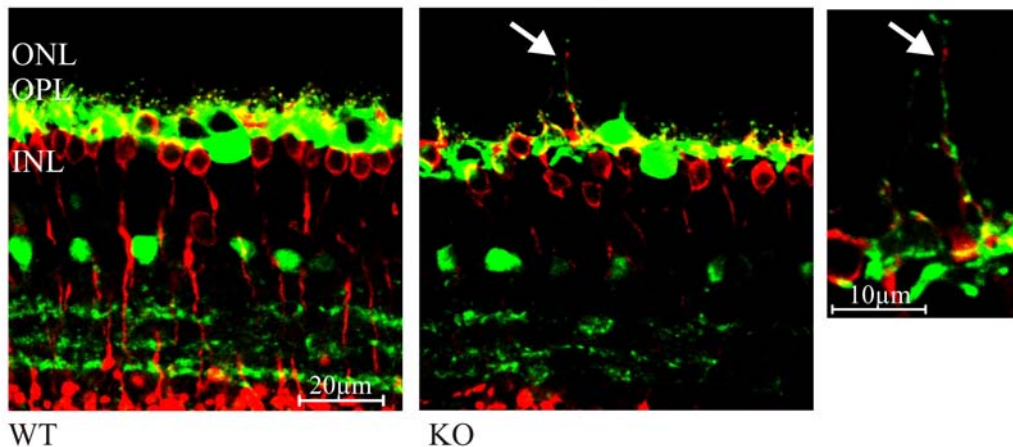


Abbildung 54: Sprouting von Bipolar- und Horizontalzellen

Sowohl Horizontal- als auch Stäbchen-Bipolarzellen in der KO-Retina zeigten neuronal sprouting (weißer Pfeil). Die Horizontalzellen wurden mit Calbindin-Antikörper (grün), die Bipolarzellen mit PKC α -Antikörper (rot) visualisiert. Ganz rechts die Ausläufer der beiden Zelltypen in einer vergrößerten Darstellung.

7.5.3 Delokalisation von Stäbchen-Bipolarzellen und Horizontalzellen

Ein weiteres Phänomen das beobachtet werden konnte, war die Delokalisation von Horizontalzellen und Stäbchen-Bipolarzellen in die äußere plexiforme Schicht, sogar an den unteren Rand der äußeren Körnerschicht. Abbildung 55 zeigt exemplarisch zwei Bilder von Retinae 11 Monate alter KO-Mäuse.

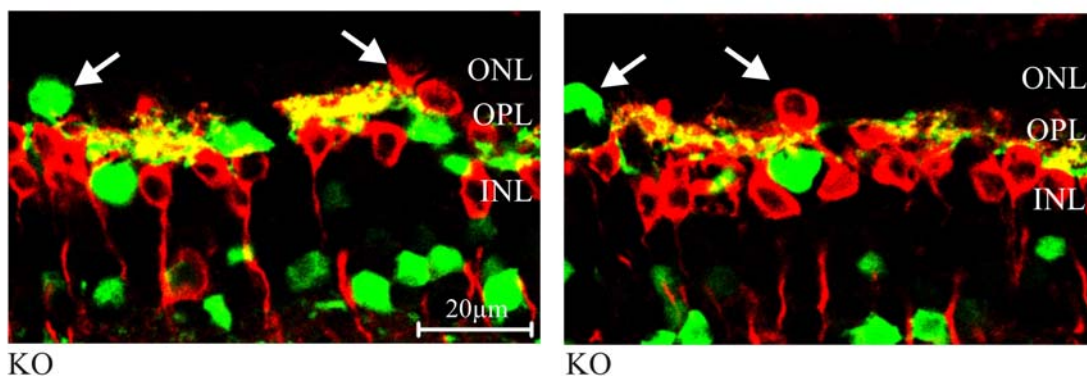


Abbildung 55: Delokalisation von Stäbchen-Bipolarzellen und Horizontalzellen

Stäbchen-Bipolarzellen sind in rot dargestellt (PKC α -Antikörper), Horizontalzellen in grün (Calbindin-Antikörper). Weiße Pfeile markieren Zellen, die nicht mehr in der inneren Körnerschicht, sondern mitten in der äußeren plexiformen Schicht, vereinzelt fast in die äußere Körnerschicht gewandert sind.

Bestätigt wurden die bis jetzt beschriebenen Beobachtungen an Bipolarzellen durch Detektion mit weiteren Markern. So wurden Retinaschnitte 11 Monate alter Mäuse mit Antikörpern gegen das membranständige G-Protein $Go\alpha$ sowie das zytosolische calciumbindende Protein CaB5 inkubiert, die sowohl Stäbchen-Bipolarzellen als auch ON- und OFF-Zapfen-Bipolarzellen markieren (Abbildung 56).

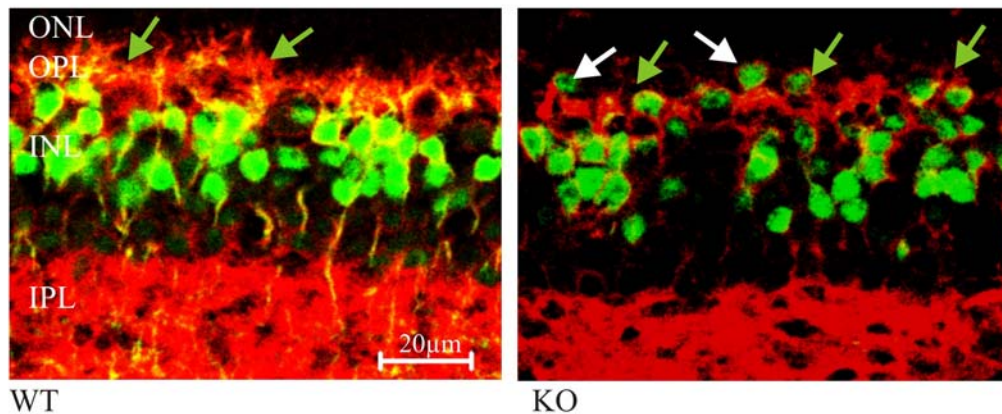


Abbildung 56: Visualisierung von Bipolarzellen (Stäbchen-, ON-Zapfen-, OFF-Zapfen-Bipolarzellen) mit Antikörpern gegen $Go\alpha$ und CaB5 in der Retina 11 Monate alter Mäuse

$Go\alpha$ (membranständig) ist in rot dargestellt, CaB5 (zytosolisch) in grün. Beide Antikörper markieren Bipolarzellen von Stäbchen und Zapfen. Bei den CNGB1-defizienten Mäusen ist ein Verlust an Dendriten in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) zu erkennen (grüne Pfeile) sowie vereinzelt delokalisierte Bipolarzellsomata, die in der OPL liegen (weiße Pfeile).

7.6 Untersuchung der Sehfunktion: Elektretinogramm

Die Sehfunktion der Mäuse wurde im Arbeitskreis von PD Dr. Mathias Seeliger (Universitäts-Augenklinik Tübingen) getestet. Durch Ganzfeld-ERGs wurde die elektrische Antwort von Stäbchen und Zapfen der gesamten Retina auf Lichtreize verschiedener Intensitäten gemessen. 4 Wochen und 6 Monate alte Mäuse wurden sowohl einem dunkeladaptierten als auch einem helladaptierten Blitz-ERG unterzogen.

In Abbildung 57 sind exemplarisch die Einzelspuren einer 4 Wochen alten WT-Maus sowie einer 4 Wochen und einer 6 Monate alten KO-Maus für dunkeladaptiertes (A) und helladaptiertes (B) ERG gezeigt.

Charakteristische Größen des Elektretinogramms sind die a- und die b-Welle. Bei Dunkeladaptation erkennt man bei niedriger Blitzintensität nur die positive b-Welle im elektrischen Signal (eingezeichnet in Abbildung 58A). Sie spiegelt die Aktivität der Bipolarzellen wieder. Die a-Welle ist ein lang andauernder negativer Ausschlag. Sie liegt bei niedrigen Blitzintensitäten unter der b-Welle und erscheint erst bei höheren Blitzintensitäten vor der b-Welle (Abbildung 58). Sie wird unmittelbar der Signaltransduktionskaskade in den Stäbchen zugeschrieben.

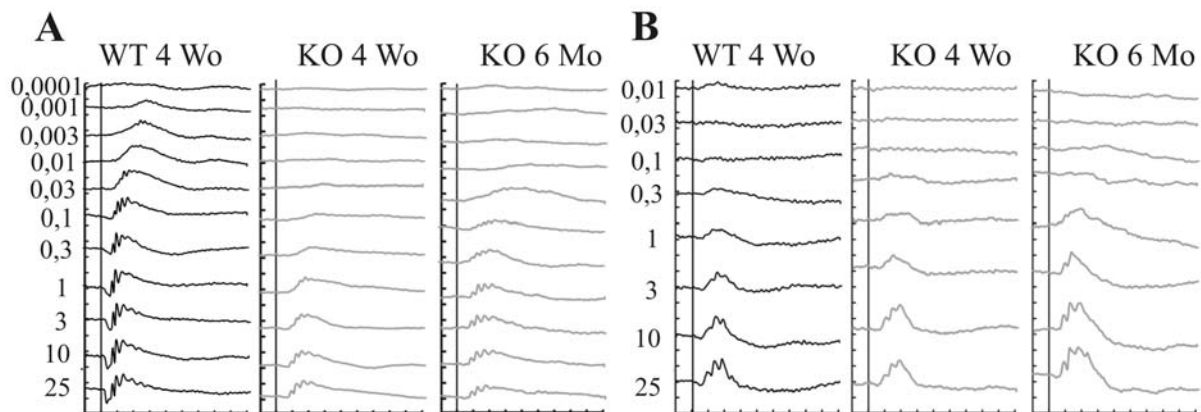


Abbildung 57: Ganzfeld-Elektroretinogramm von WT- und KO-Mäusen

A) Beispielhaftes Blitz-ERG nach Dunkeladaptation und B) Blitz-ERG nach Helladaptation. Die Blitzintensitäten in cds/m^2 sind links neben den WT-Spuren angegeben. Es wurden jeweils 10 Antworten desselben Auges auf eine Stimulusintensität gemittelt. Gezeigt sind die Daten einer 4 Wochen alten WT-Maus sowie einer 4 Wochen und einer 6 Monate alten KO-Maus. Die senkrechte Linie zeigt den Zeitpunkt des Lichtblitzes an.

Unter Dunkeladaptation war bei Wildtyp-Mäusen die erste Antwort bereits bei einer Stimulusintensität von $0,001\text{cds/m}^2$ zu erkennen. Bei KO-Mäusen dagegen führten erst Lichtblitze von etwa $0,03\text{cds/m}^2$ zu einer elektrischen Antwort (Abbildung 57). In Abbildung 58A (oben) sind repräsentative Kurven von 4 Wochen alten WT- und KO-Mäusen bei $0,01\text{cds/m}^2$ übereinandergelegt. Die WT-Antwort zeigt bereits eine ausgeprägte b-Welle, die KO-Antwort zeigt noch keine elektrische Aktivität.

Höhere Stimulusintensitäten nach Dunkeladaptation provozieren eine Mischantwort von Stäbchen- und Zapfensystem. Wie der unmittelbare Vergleich von WT- und KO-Antwort bei 10cds/m^2 zeigt (Abbildung 58A, unten) fehlt dem KO-Signal jedoch die a-Welle. Die b-Welle der KO-Mäuse nimmt bei hohen Lichtintensitäten zwar einen ähnlich hohen positiven Wert an wie bei WT-Mäusen, doch wird sie ausgehend von der negativen Amplitude der a-Welle gemessen, da sie diese ja kompensiert. So ist der rechnerische Wert der b-Amplitude bei KO-Mäusen deutlich kleiner als bei WT-Mäusen. In Abbildung 58B sind alle Daten 4 Wochen alter KO-Mäuse zusammengefaßt und die b-Wellenamplitude als Funktion der logarithmierten Blitzintensität aufgetragen. Die schwarzen Linien repräsentieren den Bereich, in dem 90% aller gemessenen Wildtypantworten liegen. Die KO-Mäuse zeigen über den gesamten Helligkeitsbereich eine signifikant erniedrigte b-Welle. Eine elektrische Antwort ist in der KO-Retina überhaupt erst ab einem Schwellenwert von etwa $0,03\text{cds/m}^2$ meßbar, bei dem die Aktivität der Zapfen beginnt. Die Stäbchen sind also nicht mehr in der Lage, auf einen Lichtstimulus zu antworten.

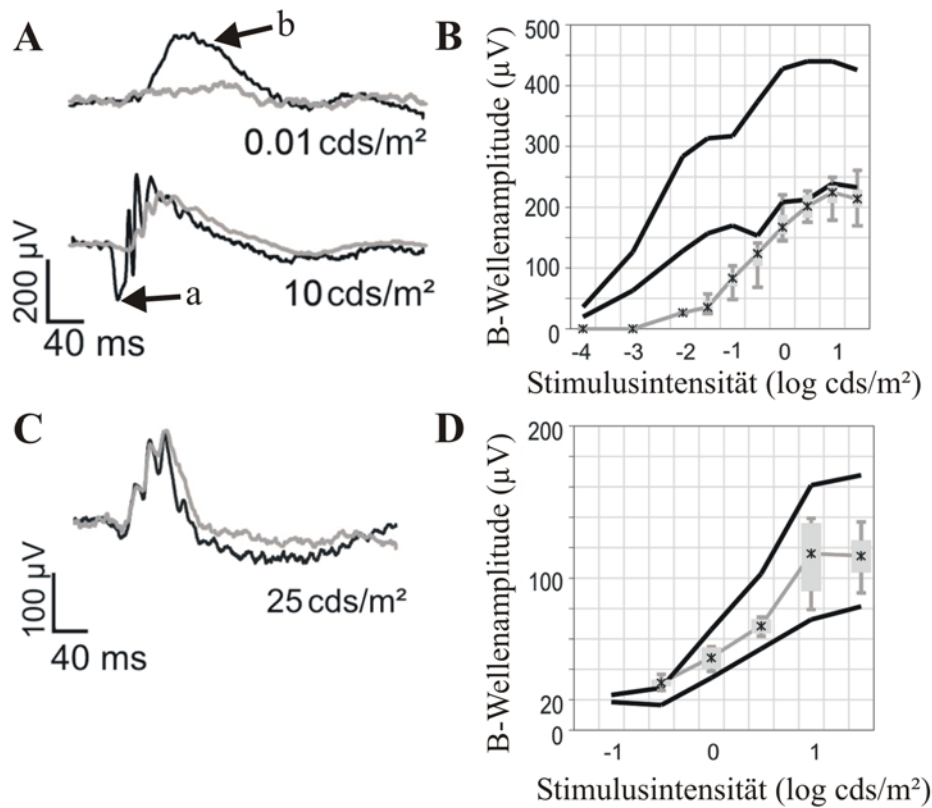


Abbildung 58: ERG-Kurven nach Hell- und Dunkeladaptation

Wildtyp-Antworten sind jeweils in schwarz dargestellt, KO-Antworten in hellgrau. Die Pfeile in A) markieren die a- und b-Welle. A) Vergleich repräsentativer Antworten 4 Wochen alter WT- und KO-Retinae nach Dunkeladaptation auf einen Stimulus von 0.01cds/m² (oben) und 10cds/m² (unten). B) Graphische Darstellung der b-Wellenamplituden von 4 Wochen alten KO-Retinae bei Dunkeladaptation als Funktion der logarithmierten Blitzintensität (grau). Die schwarzen Linien repräsentieren den Normalbereich, in dem sich WT-Antworten bewegen (5-95%). C) Vergleich repräsentativer Antworten nach Helladaptation auf einen Stimulus von 25cds/m², ebenfalls von 4 Wochen alten Tieren. D) Graphische Darstellung der b-Wellenamplituden von WT- und KO-Mäusen nach Helladaptation.

Zur Kontrolle der Zapfenfunktion wurde auch nach Helladaptation ein Blitz-ERG abgeleitet. Unter diesen Bedingungen ist das Stäbchen-System völlig gesättigt, die elektrische Antwort wird alleine von den Zapfen generiert. Wie Abbildung 57B zeigt, beginnen KO-Retinae wie WT-Retinae ab einer Lichtintensität von 0,03cds/m² zu antworten, die Überlagerung der Kurven in Abbildung 58C zeigt bei 4 Wochen alten Tieren keine massiven Veränderungen, die b-Wellenamplitude liegt im Bereich gesunder Tiere (Abbildung 58D). Auch 6 Monate alte Tiere zeigten noch ein normales photopisches ERG (Abbildung 57B). Die Zapfen funktionieren also bei CNGB1-defizienten Mäusen bis zu einem Alter von 6 Monaten normal.

8 Untersuchung heterozygoter Mäuse

Der in der vorliegenden Arbeit gewählte Ansatz zur Generation einer CNGB1-KO-Maus führt nach Deletion von Exon 26 zu einem durch Verschiebung des Leserahmens induzierten Stopcodon im ersten Triplet von Exon 27. Es kann somit kein funktionsfähiges Kanalprotein entstehen. Bei einer partiellen Deletion von Genen sollte man jedoch nicht außer acht lassen, daß auch trunkierte Proteine in Einzelfällen exprimiert werden und den Phänotyp der Mauslinie beeinflussen können. Um dies bei der CNGB1-KO-Maus auszuschließen, wurden auch heterozygote Tiere (HZ) untersucht. Sie sind in der Lage, ein funktionelles CNGB1-Protein zu exprimieren, tragen jedoch auf einem Allel bereits den modifizierten Locus, aus dem ein trunkiertes Protein entstehen könnte. An heterozygoten Tieren müßte demnach eine Beeinflussung des Phänotyps durch ein trunkiertes CNGB1-Protein bereits erkennbar sein.

Im Gegensatz zu KO-Mäusen waren heterozygote Tiere nicht kleiner als Wildtyp-Mäuse. Auch im Gewicht unterschieden sie sich nicht von ihren WT-Geschwistern. Im Alter von 30 Tagen wogen sie $16,0 \pm 0,4\text{g}$ ($n=33$), die entsprechenden WT-Mäuse $16,2 \pm 0,2\text{g}$ ($n=17$). Abbildung 59 stellt das Gewicht heterozygoter Tiere und WT-Tiere in den ersten zwei Lebensmonaten gegenüber.

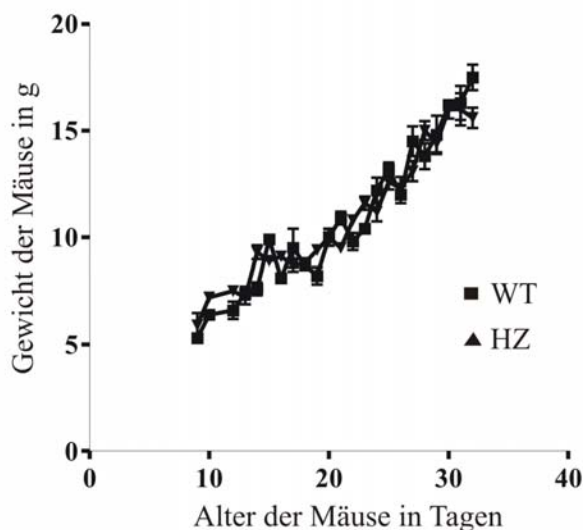


Abbildung 59: Gewichtsvergleich zwischen WT- und HZ-Mäusen

Die Entwicklung des Gewichts in g ist gegen das Alter der Mäuse in Tagen aufgetragen. Quadrate symbolisieren die Gewichte der WT-Mäuse, Dreiecke die Gewichte der HZ-Mäuse. WT: $n = 3 - 17$, HZ: $n = 4 - 63$ (je nach Tag).

An den KO-Mäusen wurde vor allem die Auswirkung der CNGB1-Defizienz auf die Retina untersucht. Daher wurden auch HZ-Mäuse auf einen retinalen Phänotyp getestet.

8.1 Klonierung des trunkierten CNGB1a-Proteins

CNGB1a erscheint in der Western Blot Analyse, obwohl seine tatsächliche Molekülgröße bei etwa 150kDa liegt, als ein 240kDa Protein (Körschen et al., 1995). Dieses ungewöhnliche Laufverhalten ist seinem langen N-Terminus, der das GARP-Protein (glutamic acid rich protein) enthält zuzuschreiben. Da auch ein trunkiertes CNGB1a-Protein aus den Exons 1-25 aminoterminal GARP tragen würde, kann aus seinem theoretischen Molekulargewicht nicht abgeschätzt werden, auf welcher Höhe es im Western Blot zu sehen wäre. Daher wurde zunächst dieser trunkierte CNGB1a-Locus (CNGB1_{trunk}) kloniert, um das Protein in HEK293-Zellen exprimieren zu können (Abbildung 60).

Der CNG4.1 Expressionsvektor wurde mit KpnI und BsrGI geschnitten und das 2,3kb große C-terminale Ende des Kanals bis BsrGI 2310 isoliert. Über das Ende von Exon 25 wurde Primer PSH59RXbaI (VIII.1) gelegt, der anstelle des Stop-Codons, das der konstitutive KO-Locus unmittelbar zu Beginn von Exon 27 trägt, eine XbaI-Schnittstelle einführt. Das PCR-Produkt des Primerpaars rCNG204F – PSH59RXbaI wurde mit BsrGI und XbaI geschnitten und in einer Zweifragmentligation die beiden Teile von CNGB1_{trunk} in einen mit KpnI und XbaI aufgeschnittenen pcDNA3.1/myc-His (Version A) ligiert.

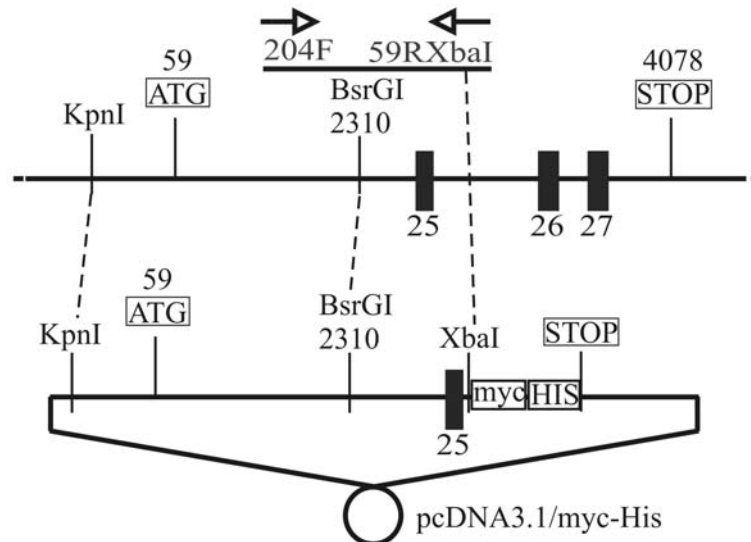


Abbildung 60: Klonierung von CNGB1_{trunk}

Aus dem rCNG4.1-Expressionsvektor (oben) wurde Fragment KpnI - BsrGI 2310 isoliert sowie das PCR-Produkt rCNG204F - PSH59RXbaI amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit BsrGI und XbaI geschnitten und beide Teile des trunkierten Proteins über die Schnittstellen für KpnI und XbaI in pcDNA3.1/myc-His ligiert (unten).

Mit dem CNGB1_{trunk} Expressionsvektor wurden HEK293-Zellen transfiziert und die Membranproteine isoliert. Das Protein kann sowohl N-terminal über einen Antikörper gegen GARP nachgewiesen werden (PPc6N) als auch C-terminal mit einem myc- oder HIS-Antikörper.

Analog wurde auch CNGB1_{b_trunk} kloniert (nicht gezeigt).

8.2 Nachweis von CNGB1a in der HZ-Retina mittels Western Blot Analyse und Immunhistochemie

Die Membranproteinfraktion aus isolierten Retinae von CNGB1^{+/+}, CNGB1^{+/-} und CNGB1^{-/-}-Mäusen wurde isoliert und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Zur Detektion wurde ein Antikörper gegen den N-Terminus von CNGB1 verwendet (PPc6N), der gleichzeitig lösliche Formen von GARP erkennt, die jedoch deutlich kleiner sind. Zur Größenkontrolle wurden Membranproteinpräparationen von HEK293-Zellen verwendet, in denen das native rCNGB1a-Protein oder das aus Translation der Exons 1 bis 25 resultierende rCNGB1a_{trunk}-Protein (V.8.1) überexprimiert wurde.

Wie aus Abbildung 61 ersichtlich, wird in der CNGB1^{+/-}-Retina CNGB1a normal exprimiert, während weder bei heterozygoten Tieren noch bei Knockout-Tieren eine Bande auf der Höhe des trunkierten Proteins zu sehen ist. Damit ist der Nachweis erbracht, daß ein trunkiertes CNGB1a-Protein nicht oder nur in geringfügigen Mengen in der Retina exprimiert wird.

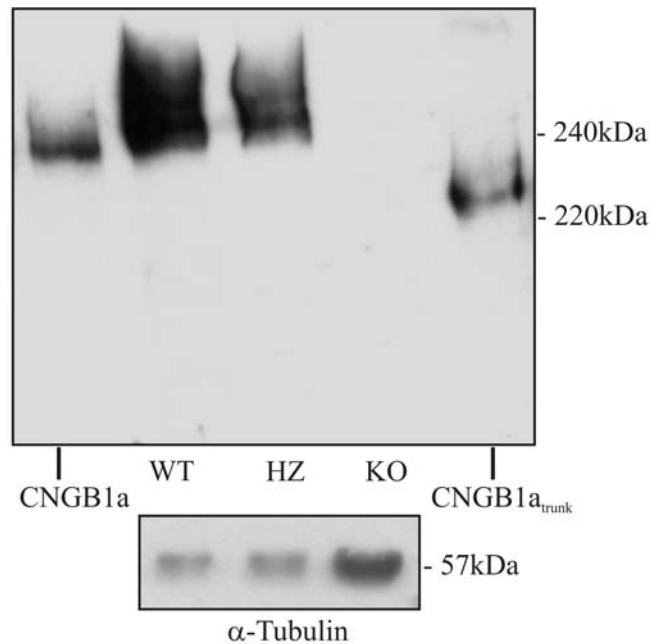


Abbildung 61: Western Blot Analyse von WT- HZ- und KO-Mäusen mit einem GARP-Antikörper

Zur Größenkontrolle wurden links Membranpräparationen aus HEK293-Zellen mit CNGB1a, rechts mit CNGB1a_{trunk} aufgetragen. In den WT- und HZ-Retinae ist der native Kanal detektierbar, die trunkierte Form wird weder in KO- noch in HZ-Retinae exprimiert.

In einem nächsten Schritt wurden Gefrierschnitte der Retinae von 2 und 10 Monate alten heterozygoten Tieren angefertigt und CNGB1a mit einem Antikörper gegen den C-Terminus des Proteins immunhistochemisch nachgewiesen. Wie in Abbildung 62 zu sehen ist, wird CNGB1a wie in WT-Mäusen in den Außensegmenten der Stäbchen exprimiert.

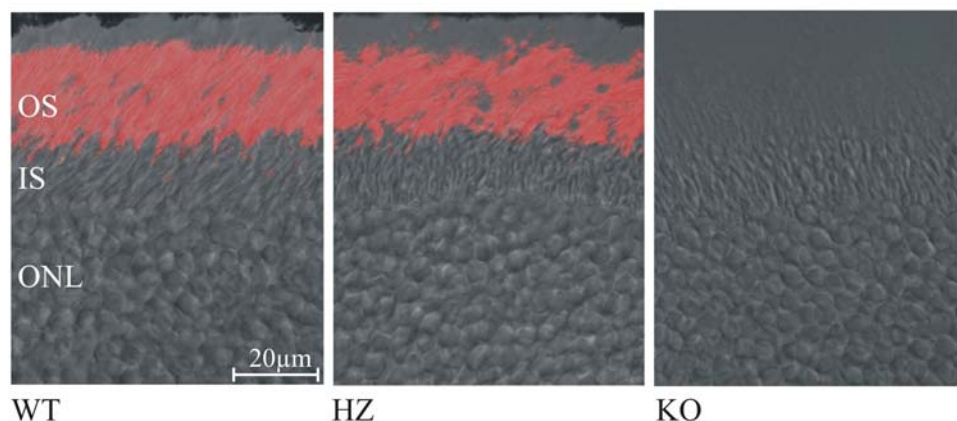


Abbildung 62: Nachweis von CNGB1 in der Retina 2 Monate alter WT-, HZ- und KO-Mäuse

8.3 CNGA1-Expression in der heterozygoten Retina

In der KO-Retina ist fast kein CNGA1-Signal mehr detektierbar. Die immunhistochemische Untersuchung der HZ-Retina dagegen zeigte, daß hier CNGA1 normal exprimiert wird und in den Stäbchen-Außensegmenten sitzt (Abbildung 63). Es kann also ausgeschlossen werden, daß ein trunkierte CNGB1-Protein in den Stäbchen der KO-Retina den Transport von CNGA1 in die Membran der Außensegmente verhindert.

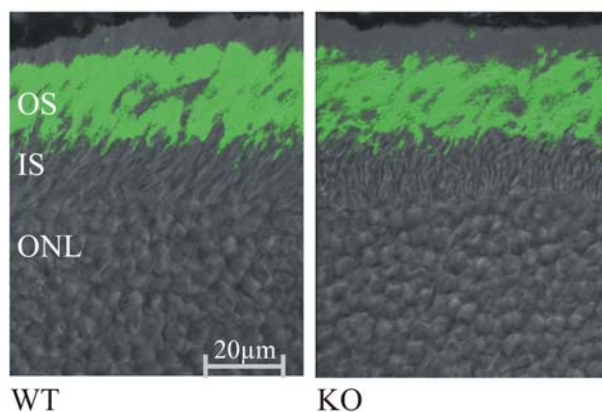


Abbildung 63: CNGA1 in der Retina von WT- und HZ-Mäusen

Immunhistochemischer Nachweis von CNGA1 (grün) in der Retina 2 Monate alter Mäuse. CNGA1 wird in der Retina von Heterozygoten in normalem Ausmaß exprimiert und sitzt in den Außensegmenten der Stäbchen-Photorezeptoren.

8.4 Untersuchung der HZ-Retina auf degenerative Prozesse

Da der Phänotyp der CNGB1-defizienten Mäuse von einer massiven Retinadegeneration gekennzeichnet ist, wurden auch Retina-Gefrierschnitte von 10 Monate alten heterozygoten Mäusen angefertigt und auf degenerative Prozesse hin untersucht.

Erhalt der Photorezeptoren

In 10 Monate alten KO-Tieren war die Retina bereits stark degeneriert, Stäbchen konnten kaum noch, vereinzelt Zapfen nur liegend und deformiert visualisiert werden (Abbildung 64, rechts). In gleichaltrigen heterozygoten Tieren dagegen waren Stäbchen und Zapfen morphologisch nicht von einer WT-Retina zu unterscheiden (Abbildung 64, links und mitte).

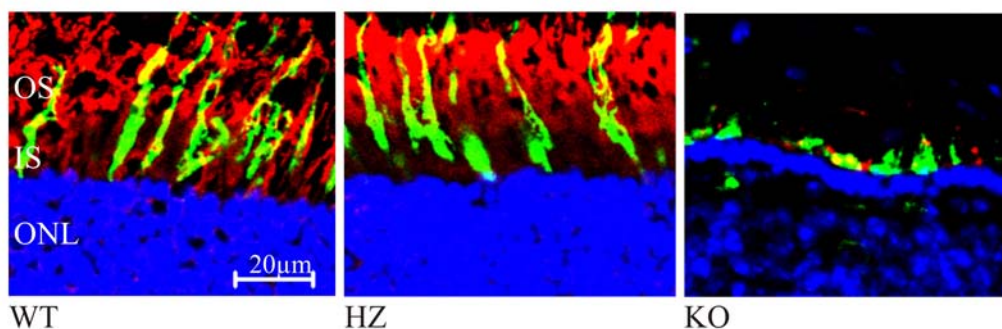


Abbildung 64: Photorezeptoren 10 Monate alter WT, HZ und KO Mäusen

Die Stäbchen wurden mit Rodopsin-Antikörper visualisiert (rot), die Zapfen mit PNA (grün) und die Zellkerne mit Hoechst 33342 gegengefärbt (blau).

Schichtdicke der äußeren Körnersicht

Zur Visualisierung der Zellkerne in der inneren und äußeren Körnerschicht wurden Gefrierschnitte mit Hoechst 33342 gefärbt. Bei den KO-Retinae zeigte sich eine progressive Erniedrigung der Kernreihenzahlen, bis bei 10 Monate alten Tieren nur noch eine einzige diskontinuierliche Schicht von Photorezeptorkernen zu sehen war. HZ-Retinae dagegen zeigten im Vergleich zu WT-Retinae keine Veränderung der Schichtdicke der äußeren Körnerschicht bis zu einem Alter von 10 Monaten (Abbildung 65).

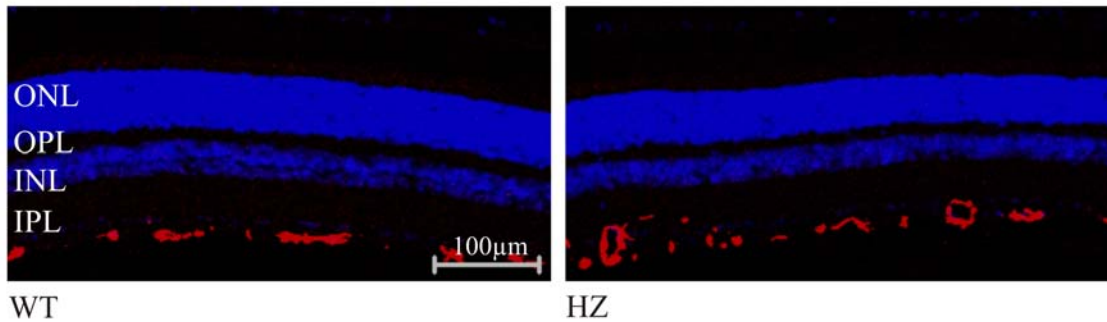


Abbildung 65: Schichtdicke der Körnerschichten (blau) und GFAP-Expression in Müller-Gliazellen (rot) von 10 Monate alten WT-Mäusen und HZ-Mäusen im Vergleich

Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) visualisiert, die Müller-Gliazellen mit einem Antikörper gegen GFAP (rot).

Müller Gliazellen

Mit einem Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) konnte gezeigt werden, daß bei 10 Monate alten heterozygoten Mäusen keine reaktive Gliose auftritt (Abbildung 65).

8.5 Elektoretinogramm

Auf molekularer Ebene waren bei heterozygoten Mäusen keine Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen feststellbar. Um auszuschließen, daß heterozygote Tiere dennoch eine beeinträchtigte Sehfunktion haben, wurde an 6 Monate alten Tieren ERG gemessen. Die Einzelantworten sowohl nach Dunkeladaptation als auch nach Helladaptation entsprachen denen des Wildtyps (Einzeldaten nicht gezeigt). Abbildung 66 faßt die Ergebnisse als Darstellung der b-Wellenamplitude in Abhängigkeit der logarithmierten Stimulusintensität zusammen. Die b-Wellen der 6 Monate alten heterozygoten Tiere bewegen sich im Normalbereich der Wildtypen.

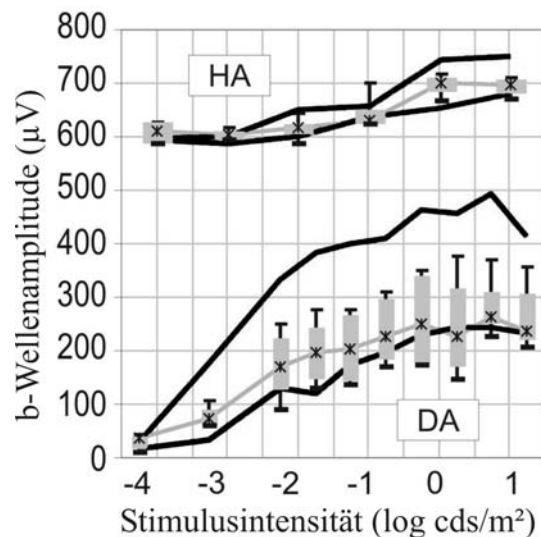


Abbildung 66: ERG-Messungen an heterozygoten Tieren: b-Wellenamplitude

Graphische Darstellung der b-Wellenamplituden von 6 Monate alten HZ-Retinae bei Dunkeladaptation (unten, DA) und Helladaptation (oben, HA) als Funktion der logarithmierten Blitzintensität (grau). Die schwarzen Linien repräsentieren den Normalbereich, in dem sich WT-Antworten bewegen (5-95%).

9 Auswirkungen der CNGB1-Defizienz im olfaktorischen Epithel

Der olfaktorische CNG-Kanal enthält als B-Untereinheit CNGB1b, dem der lange Aminoterminus fehlt. Er wird aus insgesamt drei CNG-Untereinheiten gebildet, CNGA2, CNGA4 und CNGB1b.

In Anlehnung an die Ergebnisse des Stäbchenkanals wurde zunächst die Auswirkung des Fehlens von CNGB1 auf CNGA2 untersucht (Abbildung 67). RT-PCR mit CNGA2-spezifischen Primern zeigte eine unveränderte Transkription in den olfaktorischen Rezeptorneuronen der CNGB1-defizienten Mäuse. Der immunhistochemische Nachweis dagegen zeigt, daß die Untereinheit bei KO-Mäusen nicht wie im Wildtyp in den Zilien der olfaktorischen Rezeptorneuronen lokalisiert ist. Das starke Signal in den Zilien ist verschwunden, dafür ist das Signal im Bereich der Somata der Neuronen stärker.

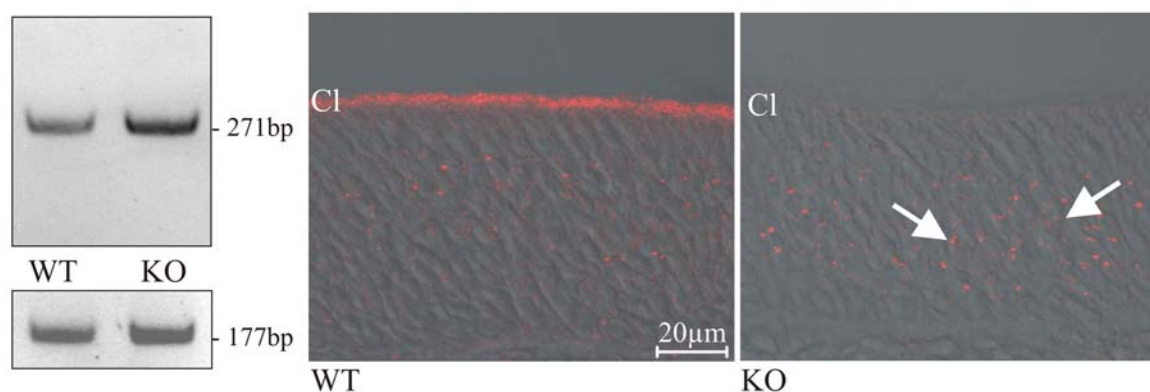


Abbildung 67: CNGA2 im olfaktorischen Epithel

Links: RT-PCR mit CNGA2-spezifischen Primern (oben) und HPRT-Primern (unten) als loading control. Rechts: immunhistochemischer Nachweis von CNGA2 im olfaktorischen Epithel 9 Wochen alter Mäuse (rot). Im Wildtyp ist das Signal in den Zilien lokalisiert (Cl), im Knockout dagegen ist in den Zilien kein Signal erkennbar, jedoch eine leichte Intensivierung des Signals im Bereich der Somata der ORN (weiße Pfeile).

Weiter wurde die dritte Untereinheit des olfaktorischen CNG-Kanals, CNGA4, untersucht. Eine RT-PCR-Analyse aus dem olfaktorischen Epithel zeigte keine Veränderung auf Transkript-Ebene (Abbildung 68). Immunhistochemisch gelang leider kein Nachweis des CNGA4-Proteins. Im Western Blot läuft der in HEK293-Zellen exprimierte Kanal etwas niedriger als die erwartete Größe (66kDa), die Banden auf gleicher Höhe aus Wildtyp- und Knockout-Epithel lassen keine quantitativen Veränderung der Expression erkennen.

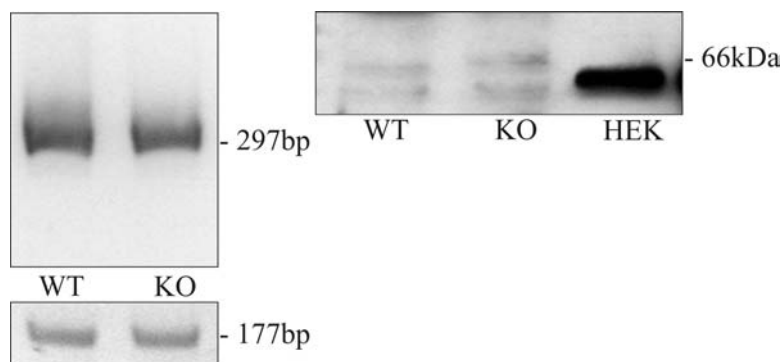


Abbildung 68: CNGA4 im olfaktorischen Epithel

Links: RT-PCR-Produkte, oben mit CNGA4-spezifischen Primern, unten mit HPRT-Primern. Rechts: Western Blot Analyse des olfaktorischen Epithels von WT- und KO-Mäusen. Zum Größenvergleich wurde eine Membranpräparation aus mit rCNGA4-Expressionsvektor transfizierten HEK293-Zellen aufgetragen.

VI. Diskussion

1 Generierung einer CNGB1-defizienten Mauslinie

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung einer CNGB1-defizienten Mauslinie. Die CNGB1-KO-Maus ist die erste Maus, bei der eine B-Untereinheit von zyklonukleotid-aktivierten Kanälen deletiert wurde. Die Bedeutung von B-Untereinheiten für CNG-Kanäle wurde bis jetzt nur durch heterologe Expression in Zellkultursystemen (HEK293-Zellen oder *Xenopus*-Oozyten) untersucht. Die hier vorgestellte Mauslinie stellt das erste *in vivo* Modell zur Untersuchung der B-Untereinheiten dar.

Die Untersuchung von KO-Mäusen liefert wertvolle Informationen über die Funktion und Relevanz des deletierten Gens im Organismus. Klassische Targetingvektoren führen eine Resistenzkassette in das Zielgen ein und inaktivieren dadurch den Locus. Bei dieser Strategie besteht jedoch die Gefahr, daß das in der Maus verbleibende Resistenzgen den Phänotyp der Maus beeinflusst (Rajewsky et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde das Cre/loxP-Rekombinationssystem zur Deletion benutzt. Dabei werden durch den Targetingvektor sowohl der zu deletierende Genbereich als auch die eingeführte Resistenzkassette „gefloxt“, also von zwei loxP-Seiten flankiert. Einerseits können mit diesem Ansatz Mäuse erzeugt werden, bei denen das Gen lediglich gefloxt ist (konditionaler KO). Durch Verkreuzung mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Mauslinien kann das Gen in definierten Geweben oder zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung ausgeschaltet werden. Andererseits kann eine konstitutive KO-Linie generiert werden, bei der die Resistenzkassette durch Cre-vermittelte Exzision wieder entfernt wird. So ist gesichert, daß der Phänotyp allein durch die Mutation des Genorts bestimmt wird. Dies bestätigten auch Untersuchungen heterozygoter Mäuse (V.8).

In der hier vorgestellten Mauslinie wurde mittels Gene Targeting Exon 26 des CNGB1-Locus erfolgreich deletiert (V.3, V.4, V.5, V.6). Durch die Deletion entsteht infolge einer Leserahmenverschiebung ein Stopcodon am Beginn des Exons 27. Sollte von den Exons 1 bis 25 ein trunkiertes Protein exprimiert werden, so kann davon ausgegangen werden, daß es nicht funktionell ist, da Exon 26 für die Pore und das Transmembransegment 6 des Kanals codiert. RT-PCR-Analysen mit Primern, die ein PCR-Produkt aus den Exons 20 und 21 amplifizieren, zeigten, daß der modifizierte Locus transkribiert wird (V.6.3). In einer Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen den N-Terminus des Proteins konnte jedoch gezeigt werden, daß das trunkierte Protein in der Retina nicht in detektierbaren Mengen vorliegt (V.8.2). Also findet entweder keine Translation der vorhandenen mRNA statt oder das entstehende Protein wird unverzüglich wieder abgebaut. Somit wurde sichergestellt, daß der Phänotyp der Mäuse allein durch das Fehlen des intakten CNGB1-Kanals verursacht wird und nicht Folge der Expression eines nicht physiologischen Restproteins ist.

Ein weiterer Aspekt, der mit der hier vorgestellten Mauslinie aufgeklärt werden kann, ist die Funktion von CNG-Kanälen allgemein. CNGB1 ist die B-Untereinheit des CNG-Kanals in Stäbchen und in olfaktorischen Rezeptorneuronen. Die physiologische Bedeutung der CNG-Kanäle innerhalb der Signaltransduktion ist in diesen Zelltypen bereits bekannt (III.1, III.2). Doch gibt es eine große Zahl anderer Gewebe, in denen CNG-Kanäle nachgewiesen wurden, von denen es aber keine Daten zur Relevanz und möglichen Funktion der Kanäle gibt. Transkripte von CNGB1 wurden im Hoden (Biel et al., 1996), in der Epiphyse (Sautter et al., 1997) und im Innenohr (Drescher et al., 2002) nachgewiesen. Die Expression des Proteins konnte in den Spermien (Wiesner et al., 1998) gezeigt werden. Die CNGB1-KO-Maus eröffnet

also die Möglichkeit, die Expression und Relevanz der CNG-Kanäle in diesen Organen zu untersuchen.

2 Bedeutung von CNGB1 für den Stäbchenkanal

Die Untersuchung der Retina der CNGB1-KO-Tiere führte zu ersten überraschenden Ergebnissen im Bezug auf die Funktion von CNGB1 innerhalb des CNG-Kanals der Stäbchen (CNGA1/CNGB1a).

Die Bedeutung von CNGB1 für den Stäbchenkanal ist bis jetzt nur in Zellkultursystemen untersucht worden. Hier entstehen bei heterologer Expression von CNGA1 alleine bereits funktionelle Kanäle, doch stimmen die elektrophysiologischen Eigenschaften der homomeren Kanäle nicht mit den Nativströmen aus Stäbchen überein. Erst bei Coexpression mit CNGB1 ähnelt der Strom durch den jetzt heteromeren Kanal dem Strom in den Außensegmenten der Stäbchen (Kaupp et al., 1988; Dhallan et al., 1992).

Die Untersuchung der Retina von CNGB1-defizienten Mäusen zeigte, daß bei Abwesenheit von CNGB1 auch CNGA1 nicht mehr in den Außensegmenten der Stäbchen lokalisiert ist. Somit ist die A-Untereinheit nicht in der Lage als homomerer Kanal ins Außensegment der Photorezeptoren zu gelangen (V.7.1). Im physiologischen Umfeld des Kanals, den Stäbchen, führt also die Abwesenheit der B-Untereinheit zur vollständigen Abwesenheit des CNG-Kanals in der Zellmembran.

Es kann ausgeschlossen werden, daß bereits die Transkription der A-Untereinheit verhindert wird, da die mRNA von CNGA1 in der Retina nachgewiesen werden konnte. Auch ist die Funktionalität der homomeren Kanäle nicht gestört. Elektrophysiologische Messungen zeigten in einzelnen Stäbchen einen durch zyklische Nukleotide aktivierbaren Strom (Daten aus der Arbeitsgruppe von K.W. Yau, hier nicht gezeigt). Diese Subpopulation von Stäbchen ist vermutlich für das schwache Restsignal bei immunhistochemischer Detektion des Proteins verantwortlich und repräsentiert Zellen, bei denen die CNGA1-Untereinheit zufällig in die Membran integriert wurde. Es ist keine Akkumulation von CNGA1 in den Innensegmenten oder im Soma der Photorezeptoren zu beobachten. Falls das Protein synthetisiert wird, läßt dies auf einen raschen Abbau des Proteins schließen.

Es muß einen einzigartigen Mechanismus in den Photorezeptoren, vielleicht auch in Neuronen allgemein geben, der die Synthese oder den Transport von A-Untereinheiten der CNG-Kanäle in Abwesenheit der entsprechenden B-Untereinheiten verhindert. Dieser Mechanismus ist in Zelllinien wie HEK293-Zellen oder Xenopus-Oozyten nicht vorhanden.

Ob die Synthese des CNGA1-Proteins gestört ist, geht aus den vorliegenden Ergebnissen nicht hervor, doch ist es eher unwahrscheinlich, da A- und B-Untereinheiten getrennt voneinander synthetisiert werden. Denkbar wäre, daß CNGB1 bereits bei der Proteinfaltung von CNGA1 benötigt wird. Von anderen heteromeren Kanälen wurde beschrieben, daß sie das endoplasmatische Retikulum erst verlassen, wenn sich der komplette Kanal aus allen Untereinheiten gebildet hat. Die Ursache sind verschiedene ER-Retentionsmotive, die die einzelnen Untereinheiten im ER zurückhalten. Die Anlagerung einer zweiten Untereinheit maskiert das Retentionsmotiv und der Komplex kann das ER verlassen (Nufer und Hauri, 2003). Bekannte ER-Retentionsmotive sind KKXX am C-Terminus eines Proteins (Teasdale und Jackson, 1996) oder RR beziehungsweise RXR in einem zytosolischen Teil des Proteins (Nufer und Hauri, 2003). X steht hier für eine beliebige Aminosäure. Die murine CNGA1-

Untereinheit trägt beispielsweise ein RR-Motiv im intrazellulären Loop zwischen den Transmembransegmenten S2 und S3, das in der humanen Sequenz sowie in CNGA2 konserviert ist. Gegen eine Retention durch dieses oder andere Retentionsmotive spricht, daß sie theoretisch auch in HEK293-Zellen verhindern müßten, daß das CNGA1-Protein das ER verläßt. Vielleicht werden die Retentionsmotive jedoch in dieser und anderen Zelllinien durch bis jetzt unbekannte Faktoren maskiert, so daß die A-Untereinheit vom ER entlassen wird und membranständige homomere Kanäle bilden kann.

In diesem Zusammenhang zu erwähnen ist eine zu Retinitis pigmentosa führende Mutation in CNGA1 (R654D-Stop, Dryja et al. (1995)). Trudeau et al. (2002) haben die Interaktionen zwischen der mutierten CNGA1-Untereinheit und CNGB1 eingehend untersucht. Sie finden eine Interaktion zwischen dem C-Terminus von CNGA1 und einer Region im N-Terminus von CNGB1, die sie auf 10 Aminosäuren unmittelbar vor Transmembransegment S1 einschränken können. Fehlt CNGA1 der C-Terminus, wie bei RP-Patienten der Fall, so findet die Interaktion nicht statt und die freiliegende Domäne von CNGB1 führt zu einer Retention des Kanals im Zellinneren. Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu den Arbeiten von Dryja et al. (1995), die das trunkierte CNGA1-Protein nicht membranständig exprimieren konnten, und von Mallouk et al. (2002), nach denen das Protein durch Entstehung eines ER-Retentionsmotivs infolge der Trunkierung (KXXXXstop) im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird, also völlig unabhängig von Interaktionen mit CNGB1 nicht in die Membran gelangen kann. Da in der hier vorgestellten Mauslinie keine B-Untereinheit vorhanden ist, kann die von Trudeau et al. postulierte Interaktion nicht der Grund für das gestörte Targeting von CNGA1 in der CNGB1-defizienten Maus sein.

Es sind jedoch auch weitere Prozesse denkbar, die durch das Fehlen von CNGB1 gestört sein könnten. So ist die Bedeutung der B-Untereinheit für den Transport des Kanals durch das dünne Zilium ins Außensegment oder für das Membrantargeting in den Photorezeptoren noch nicht bekannt. Weitere Untersuchungen der CNGB1-KO-Mäuse werden diese Frage klären. In jedem Fall muß festgehalten werden, daß sich Daten aus Zellkultur-Systemen zu Expression und Membrantargeting von CNG-Kanälen, vielleicht auch von Ionenkanälen oder Membranproteinen allgemein, nicht automatisch auf die physiologischen Gegebenheiten übertragen lassen.

Während der Arbeiten an der CNGB1-defizienten Mauslinie wurde eine Mutation im CNGB1-Gen beschrieben, die zu Retinitis pigmentosa führt. Es wäre in diesem Zusammenhang interessant, zu untersuchen, ob das in einer Aminosäure, die über Untereinheiten und Spezies konserviert ist, mutierte Protein (G993V) exprimiert wird oder nicht. Falls die mutierte CNGB1-Untereinheit exprimiert wird, sollte untersucht werden, welchen Einfluß sie auf die Expression und Lokalisation von CNGA1 hat.

3 Die CNGB1-defiziente Retina: Ein Mausmodell zur Untersuchung des Zapfen-vermittelten Sehens

Im Elektretinogramm der CNGB1-defizienten Mäuse ist keinerlei Stäbchenantwort mehr meßbar. Bei Dunkeladaptation konnte erst ab einer Blitzintensität von 0,3cds/m² eine elektrische Antwort der Retina gemessen werden (V.8.5). Dies entspricht dem Schwellenwert, ab dem die Zapfen auf Lichtreize antworten (Jaissle et al., 2001). Die ERG-Antworten der Zapfen waren im Alter von 6 Monaten noch erhalten. Auch in immunhistochemischen Untersuchungen waren bei 6 Monate alten KO-Tieren noch mit Opsinen ausgestattete Zapfen zu sehen (V.7.4.3).

Durch den vollständigen Verlust der Stäbchenaktivität ist die Retina der CNGB1-KO-Maus ein Modell, an dem selektiv die Funktion der Zapfen und ihrer nachgeschalteten Neuronen untersucht werden kann. Auch eine Rhodopsin-KO-Maus wurde bereits als Modell für die Zapfenfunktion vorgestellt (Jaissle et al., 2001). Das Zeitfenster nach vollständiger Entwicklung der Retina bis zur beginnenden Degeneration der Zapfen ist bei diesen Tieren jedoch sehr klein, es liegt nur zwischen der 4. und 7. Lebenswoche. Die CNGB1-defizienten Mäusen dagegen zeigen ein deutlich größeres Zeitfenster, in dem die Zapfenfunktion untersucht werden kann, da die Funktionalität der Zapfen bis zum Alter von 6 Monaten erhalten bleibt.

4 Degeneration der CNGB1-defizienten Retina: ein Mausmodell für Retinitis pigmentosa

Der Verlust des CNG-Kanals löst in den Retinae der CNGB1-defizienten Mäuse eine massive Degeneration aus. Ab dem 15. Lebenstag der Mäuse war eine progressive Verkürzung der Stäbchen-Außensegmente zu beobachten (V.7.4.1). Die Dicke der äußeren Körnerschicht blieb bis zum Alter von 2 Monaten normal. Danach nahm sie als Folge des Absterbens der Photorezeptoren kontinuierlich ab, bis im Alter von 10 Monaten nur noch eine einzige diskontinuierliche Reihe von Photorezeptorkernen verblieb (V.8.4). Zu diesem Zeitpunkt waren nur noch vereinzelte Reste Rhodopsin-positiver Strukturen zu erkennen, die auf der äußeren Körnerschicht lagen. Auch die Zapfen starben, jedoch erst ab einem Alter von 6 Monaten. Der Beginn der degenerativen Vorgänge wurde durch den Nachweis einer Aktivierung der Müller Glia-Zellen bestimmt. Sie zeigen ab Tag 21 eine vermehrte Expression des sauren Gliafaserproteins (GFAP) in feinen Intermediärfilamenten, die die ganze Retina durchziehen (V.7.4.4). Die innere Retina nahm zwar in ihrer Schichtdicke nicht ab, so daß ein Großteil der Neuronen erhalten bleiben dürfte, doch waren auch hier Veränderungen zu beobachten. So zeigten Horizontal- und Stäbchen-Bipolarzellen einen massiven Verlust an Dendriten bzw. Neuriten. Damit verbunden war ein Rückgang von synaptischen Vesikeln im Bereich der äußeren Synapsenschicht (V.7.5.1). Andererseits bildeten sowohl Horizontal- als auch Bipolarzellen nach dem Verlust der Kontakte zu den Stäbchen lange neuronale Zellfortsätze bis in die äußere Körnerschicht hinein (neuronal sprouting, V.7.5.2).

Die an den CNGB1-defizienten Mäusen beobachtete Retinadegeneration ist dem Verlauf der humanen Retinitis pigmentosa vergleichbar (für eine Übersicht: van Soest et al. (1999), Phelan et al. (2000)). Retinitis pigmentosa (RP) bezeichnet eine Familie erblicher degenerativer Erkrankungen der Netzhaut. Die Inzidenz von Retinitis pigmentosa liegt weltweit bei circa 1:3500. Da im Anfangsstadium primär die Stäbchen betroffen sind, beginnt die Krankheit mit Nachtblindheit und einer Einschränkung des Sichtfelds. Später, bei einsetzender Zapfendegeneration, ist auch die zentrale Sehschärfe sowie das Sehen bei Tageslicht

beeinträchtigt. Im Finalstadium führt RP in vielen Fällen zur völligen Blindheit. Die Klassifizierung der einzelnen Formen von Retinitis pigmentosa kann zum einen nach den klinischen Symptomen oder nach den ERG-Daten, zum anderen nach dem genetischen Hintergrund der Krankheit vorgenommen werden. Bisher sind Mutationen in 39 Genen bekannt, die zu Retinitis pigmentosa führen (RetNet: www.sph.uth.tmc.edu/RetNet). Bereits 1995 wurden in Patienten verschiedene Mutationen im CNGA1-Gen, der A-Untereinheit des Stäbchen-CNG-Kanals gefunden, die zu autosomal rezessiv vererbter Retinitis pigmentosa führten (Dryja et al., 1995). Während der Arbeiten an der CNGB1-KO-Maus wurde auch eine Mutation in der humanen B-Untereinheit (CNGB1) publiziert, die bei Retinitis pigmentosa-Patienten gefunden wurde (Bareil et al., 2001). Auch hier ist der Erbgang rezessiv.

Histologisch sind in der Retina von RP-Patienten Pigment-Ablagerungen erkennbar („bone spicule formations“). Auch ist eine fortschreitende Degeneration der Photorezeptoren zu sehen. Wie bei den CNGB1-defizienten Mäusen wurde bei RP-Patienten eine Verkürzung der Photorezeptor-Außensegmente festgestellt (Milam et al., 1998). Einzelne Arbeiten über RP-Patienten mit Mutationen im Rhodopsin-Locus berichten auch über eine Fehllokalisation von Rhodopsin in den Somata der Photorezeptoren (Fariss et al., 2000), doch kann hier davon ausgegangen werden, daß die Ursache für den fehlenden Transport ins Außensegment in der Rhodopsin-Mutation zu suchen ist. Auch die zum Stäbchenverlust zeitlich versetzt auftretende Zapfendegeneration, von Wong (1997) als „Romeo und Julia-Effekt“ bezeichnet, ist ein typisches, wenn auch in seiner Ursache noch ungeklärtes, Merkmal der Retinitis pigmentosa. Wie bei den CNGB1^{-/-}-Mäusen verliert die äußere Körnerschicht der RP-Patienten infolge des Photorezeptor-Untergangs an Dicke, bis sie im Endstadium auf eine einzige Reihe von Zellkernen reduziert ist, von denen vermutet wird, daß es sich um Zapfenkerne handelt (Milam et al., 1998). Die degenerativen Prozesse im Rahmen der Retinitis pigmentosa verursachen ebenfalls eine Aktivierung der Müller Gliazellen (Milam et al., 1998; Fariss et al., 2000). Auch die innere Retina der RP-Patienten ist entgegen früherer Annahmen betroffen. So wurde ein neuronal sprouting von Stäbchen, Amakrinzellen und Horizontalzellen beobachtet (Li et al., 1995; Fariss et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden die Stäbchen der Mäuse nicht auf neuronal sprouting hin untersucht, da kein Antikörper verwendet wurde, der die axonalen Fortsätze der Zellen anfärbt. Milam et al. (1998) jedoch beschreiben, daß dieses Phänomen bei keinem Nager-Modell für RP auftritt und vermuten, daß der Verlauf der Degeneration im Vergleich zur humanen RP bei den kurzlebigen Nagern zu schnell ist. Weiter wurde bei RP-Patienten wie in der CNGB1-KO-Maus eine erniedrigte Synaptophysin-Immunreaktivität in der äußeren plexiformen Schicht gefunden (Fariss et al., 2000) sowie insgesamt ein 90%iger Erhalt von Neuronen der inneren Körnerschicht (Santos et al., 1997), was mit der Beobachtung der unveränderten Schichtdicke der INL in der CNGB1-KO-Maus übereinstimmt.

Im Elektroretinogramm (ERG) von RP-Patienten sind zunächst nur Veränderungen im skotopischen ERG zu sehen, erst bei fortgeschrittener Krankheit ist auch ein Verlust der Zapfenantwort zu beobachten. Auch bei CNGB1-defizienten Mäusen war im Alter von 4 Wochen keine Stäbchenantwort meßbar (V.7.6). Die wenigen Stäbchen-Außensegmente in den KO-Retinae, die noch eine schwache CNGA1-Immunreaktivität zeigen (V.7.1), reichen vermutlich nicht aus, um im ERG eine elektrische Antwort auf Lichtreize zu generieren. Die Zapfenfunktion der Mäuse dagegen erschien im ERG bis zu einem Alter von 6 Monaten normal.

Die in dieser Arbeit vorgestellte CNGB1-defiziente Mauslinie stellt also ein geeignetes Mausmodell für humane Retinitis pigmentosa dar. Tiermodelle geben die Möglichkeit, die Pathomechanismen der Retinadegeneration aufzuklären sowie Therapien in Form von Retinatransplantaten, Pharmakotherapien oder Gentherapien zu etablieren (für eine Übersicht siehe Chader (2002)). Ein interessanter Aspekt wäre, den Zusammenhang zwischen Stäbchen-

und Zapfendegeneration näher zu untersuchen, da erst der Verlust der Zapfen und damit ein reduziertes Sehvermögen und eine verminderte Sehschärfe bei Tageslicht die Lebensqualität von RP-Patienten massiv einschränken. Vor kurzem wurde ein von den Stäbchen produzierter Faktor identifiziert, der für das Überleben von Zapfen notwendig ist (RdCVF, rod-derived cone viability factor, Leveillard et al. (2004)). Die Relevanz dieses Faktors kann an Mäusen mit Stäbchen-Degeneration wie der CNGB1-KO-Maus geprüft werden. Solche Faktoren stellen interessante Angriffspunkte für eine RP-Therapie dar.

Es gibt mittlerweile mehrere Mausmodelle für degenerative Retinaerkrankungen. Einen Überblick über die wichtigsten natürlichen Mutanten und transgenen Mauslinien, deren Phänotyp ebenfalls mit einer Retinadegeneration einhergeht, geben Chang et al. (2002). Ein seit Jahrzehnten etabliertes Mausmodell für Retinitis pigmentosa ist die *rd* Maus (retinal degeneration, rd1), eine natürliche Mutante, die einen Defekt in der β -Untereinheit der cGMP-Phosphodiesterase trägt (Bowes et al., 1990). Die Stäbchen der *rd* Maus beginnen bereits am Tag 8 zu degenerieren, nach der vierten Lebenswoche sind keine Stäbchen mehr vorhanden. Die Zapfen sind im Alter von 6 Monaten bis auf Reste verschwunden (Ogilvie et al., 1997). Auch in dieser Maus wurde GFAP-Induktion in den Müller Gliazellen (Sarthy und Fu, 1989), ein Verlust der Dendriten von Stäbchen und Bipolarzellen bereits im Alter von 2 bis 3 Monaten (Strettoi und Pignatelli, 2000) sowie ein sprouting der Horizontalzellen ab Tag 15 (Strettoi et al., 2002) beobachtet. Ein weiteres autosomal semidominantes Mausmodell ist die *Rds* Maus (retinal degeneration slow, Rd2), bei der durch eine Insertion der Peripherin-Locus inaktiviert ist (Ma et al., 1995). Diese Maus wurde als Modell für eine langsame Retinadegeneration beschrieben. Doch werden bei homozygoten Mäusen gar keine Außensegmente ausgebildet und die Schichtdicke der äußeren Körnerschicht nimmt bereits nach 21 Tagen ab. Im Alter von 2 bis 3 Monaten ist die Zahl der Zellkerne in der ONL bereits auf 50% reduziert, erst danach verläuft die Degeneration langsamer bis zu einem völligen Verlust an Photorezeptoren im Alter von 9 Monaten (Sanyal et al., 1980; Chang et al., 2002).

Die CNGB1-defiziente Mauslinie zeigt im Vergleich zu anderen Mäusen eine deutlich langsamere Retinadegeneration. Die Stäbchen junger Mäuse sind zwar aufgrund des fehlenden CNG-Kanals nicht in der Lage, auf Lichtreize zu antworten, erscheinen jedoch bis ins Erwachsenenalter morphologisch intakt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Retina von 6 Wochen alten Mäusen (V.7.4.1) bestätigen diese Vermutung. Die Stäbchen erscheinen hier zwar verkürzt, auch sind einzelne absterbende Photorezeptoren zu erkennen, doch die Struktur der verbleibenden Stäbchen gleicht der von WT-Stäbchen. Auch die immunhistochemische Detektion wichtiger Stäbchenproteine zeigte das prinzipielle Vorhandensein der Proteine der Signalkaskade in den Stäbchen (V.7.3). Dies sind gute Voraussetzungen für Rescue-Versuche mit dem Ziel, die Funktion der Retina wiederherzustellen, beispielsweise mit viralen Vektoren. Im Bezug auf die Etablierung einer Therapie für Retinitis pigmentosa sollte auch der Zustand der inneren Retina beachtet werden. Eine intakte innere Retina ist die Voraussetzung für die funktionierende Weiterleitung der Photoantwort ins ZNS. Daher ist ihr Zustand zum Zeitpunkt einer Therapie, sei es durch Ersatz des jeweiligen mutierten RP-Gens mittels Gentransfer, sei es konventionell durch Transplantate, von Bedeutung. Es wäre also interessant zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt die an 6 Monate alten Tieren beobachteten Veränderungen einsetzen und ob es wieder zu einer Normalisierung der inneren Retina kommt, wenn die sekundären Neuronen erneut Kontakt zu funktionellen Photorezeptoren erhalten.

Über den Nachweis der Aktivierung von Caspase 3 wurde gezeigt, daß die Stäbchen der CNGB1-defizienten Mäuse durch die Auslösung der Apoptose-Kaskade absterben. Auch in den degenerierenden Retinae von *rd*-Mäusen, *Rds*-Mäusen und Rhodopsin-KO-Mäusen wurden apoptotische Vorgänge nachgewiesen (Chang et al., 1993). Dies läßt vermuten, daß all

die unterschiedlichen RP-Gene über verschiedene Signalwege letztlich eine Apoptose der Photorezeptoren auslösen und so zum einheitlichen Phänotyp der Retinitis pigmentosa führen. Wie die CNGB1-Deletion zur Apoptose und damit zum Untergang der Stäbchen führt, ist noch zu klären. G. Travis (1998) postuliert für die von Dryja et al. (1995) beschriebene CNGA1-Mutation, daß durch den verminderten Ioneneinstrom nach Verlust des CNG-Kanals die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase sinkt. Der erniedrigte ATP-Verbrauch der ATPase würde zu einem geringeren O_2 -Verbrauch der Mitochondrien führen, so daß der O_2 -Partialdruck im Zellinneren auf toxische Konzentrationen ansteigen könnte. Das Fehlen des CNG-Kanals entspräche in seiner Wirkung einem Dauer-Lichtreiz für den Photorezeptor (Fain und Lisman, 1993). Auf dieselbe Art könnte auch die CNGB1-Deletion Apoptose in den Photorezeptoren auslösen, da CNGA1, wie unter V.7.1 gezeigt, alleine nicht in der Lage ist, in die Membran der Außensegmente zu gelangen und Kanäle zu bilden.

Für die Auslösung von apoptotischen Vorgängen könnte auch von Bedeutung sein, daß der lange N-Terminus der CNGB1-Untereinheit über Interaktionen mit Peripherin-2 oder anderen Disk-ständigen Proteinen an der Verankerung der Disks mit der Plasmamembran der Außensegmente beteiligt zu sein scheint (Körschen et al., 1999; Poetsch et al., 2001). Dies würde bedeuten, daß bei Verlust von CNGB1 nicht nur ein Glied der Signaltransduktionskaskade, sondern auch ein strukturelles Element der Außensegmente fehlt. Das Fehlen von CNGB1 könnte dann die Struktur der Außensegmente destabilisieren und dadurch Apoptose auslösen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen jedoch wohlgeordnete Stapel von Disks in den Außensegmenten der KO-Stäbchen. Die Bedeutung der CNGB1-Untereinheit für die Struktur der Außensegmente, vor allem der Verankerung von Disks und Plasmamembran, scheint also eher gering zu sein.

Ein dritter Faktor, der Apoptose auslösen könnte, ist die durch den Verlust des Dunkelstroms stark erniedrigte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Mao et al. (1999) beschreiben die Auslösung von Apoptose in Neuronen, bei denen die calciumabhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors MEF2 nicht stattfindet. Dies könnte auch auf Photorezeptoren übertragbar sein.

5 CNGB1-Defizienz im olfaktorischen Epithel

Die CNGB1-defizienten Mäuse fallen äußerlich durch ihre im Vergleich zum Wildtyp geringere Größe und ihr geringeres Gewicht auf (V.5.2.2). Außerdem zeigen sie eine erhöhte postnatale Sterblichkeit (V.5.2.1). Bei beiden Beobachtungen liegt ein olfaktorischer Defekt als Ursache nahe. Die Fähigkeit neugeborener Mäuse, die Zitzen der Mutter zu finden, ist an die Riechfähigkeit geknüpft (Risser und Slotnick, 1987). Die Muttermilch im Magen der Jungen ist in den ersten Lebenstagen durch die Bauchdecke zu sehen („Milchflecken“). Die Tatsache, daß bei den neugeborenen KO-Tieren weniger bis gar keine Milchflecken zu sehen sind, läßt vermuten, daß die CNGB1-defizienten Tiere aufgrund eines olfaktorischen Defekts weniger Muttermilch trinken. Die verminderte Nahrungsaufnahme kann eine Erklärung sowohl für die Gewichtsunterschiede als auch für die erhöhte Sterblichkeit der KO-Mäuse in den ersten Wochen sein. Auch bei CNGA2-defizienten Mäusen, die völlig anosmisch sind, tritt eine hohe postnatale Sterblichkeit auf (Brunet et al., 1996). Von CNGA4-KO-Mäusen wurden dagegen weder eine erhöhte Sterblichkeit noch Gewichtsunterschiede berichtet (Kelliher et al., 2003).

RP-Patienten mit CNGB1-Mutationen zeigen keine Störungen des Geruchsinns (Bareil et al., 2001), was einer olfaktorischen Defizienz der KO-Mäuse natürlich widerspricht. Doch muß bedacht werden, daß der Geruchssinn bei Mäusen eine viel wichtigere Rolle spielt als beim Menschen. So sind beispielsweise bei der Maus alle der etwa 1000 Duftrezeptoren aktiv, beim Menschen jedoch nur rund 350, der Rest wurde im Laufe der Evolution stillgelegt. Es ist

möglich, daß beim Menschen die Defekte im Riechsystem zu subtil sind, um in einer Studie, in der es primär um die Untersuchung der Sehkraft der Patienten ging, wahrgenommen zu werden.

Der olfaktorische CNG-Kanal unterscheidet sich wesentlich vom Stäbchen-Kanal, da er aus drei Untereinheiten zusammengesetzt ist: den „klassischen“ A- bzw. B-Untereinheiten CNGA2 und CNGB1 und dem eine Sonderstellung einnehmenden CNGA4. CNGA4 wurde aufgrund seiner hohen Homologie den A-Untereinheiten zugeordnet, es ist aber bis jetzt nicht gelungen, Ströme durch homomere CNGA4-Kanäle in Zellkultursystemen zu messen. Auch hier gilt, daß zwar in Zellkultursystemen homomere Kanäle aus CNGA2 sowie Heteromere aus CNGA2 / CNGA4 gemessen und charakterisiert wurden (Bönigk et al., 1999), aber noch keine *in vivo* Modelle existieren, die zeigen, daß die beiden A-Untereinheiten auch im physiologischen Umfeld funktionelle Kanäle ohne B-Untereinheit bilden können.

Ähnlich wie in der Retina zeigten immunhistochemische Untersuchungen, daß CNGA2 in Abwesenheit von CNGB1b in den olfaktorischen Neuronen nicht in den Zilien lokalisiert ist (V.9). Während die Transkription nicht vermindert war, konnte das Protein kaum detektiert werden, was einen raschen Abbau des Proteins vermuten läßt. Ein kleiner Rest des Kanals schien im Zellinneren der Neuronen zu verbleiben. Dies zeigt, daß hier analog zum Stäbchenkanal die B-Untereinheit benötigt wird, damit der CNG-Kanal-Komplex in die Zilienmembran gelangt. Somit ist der Grund hierfür nicht im langen GARP-haltigen Aminoterminus von CNGB1a zu suchen, sondern im Bereich des Kanals selbst. Auch ist der unter VI.2 postulierte Mechanismus nicht auf Photorezeptoren beschränkt, sondern existiert in einem weiteren Zelltyp. Es wäre interessant zu untersuchen, ob dies auf alle Neuronen übertragbar ist.

Der olfaktorische Phänotyp bedarf noch detaillierter Untersuchungen. Elektroolfaktogramme würden zeigen, in welchem Ausmaß die Mäuse noch riechen können. Durch geeignete Wahl der Duftstoffe sollten weitere Erkenntnisse über alternative Signalwege gewonnen werden können. Elektrophysiologische Messungen würden Aufschluß darüber geben, ob einzelne funktionelle Kanäle statt in den Zilien an anderer Stelle in den Zellmembranen der olfaktorischen Rezeptorneuronen sitzen. Durch weitere immunhistochemische Untersuchungen sollte geklärt werden, ob es in der beschriebenen Subpopulation von ORN mit cGMP-abhängiger Signaltransduktion, in denen der CNG-Kanal der Zapfen gefunden wurde, zu Veränderungen kommt.

Es wäre interessant zu wissen, ob analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit im Bezug auf den Stäbchenkanal auch im Zapfenkanal die B-Untereinheit CNGB3 nötig ist, damit der Kanal die Membran der Außensegmente erreicht. Dies würde erklären, warum Patienten mit Mutationen im CNGB3-Locus genauso an kompletter Achromatopsie leiden wie Patienten mit Mutationen im CNGA3-Locus (Kohl et al., 2000; Sundin et al., 2000). Damit wäre auch der endgültige Beweis erbracht, daß die sogenannten modulatorischen B-Untereinheiten der CNG-Kanäle nicht nur die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle beeinflussen sondern für das Membrantargeting der CNG-Kanäle verantwortlich sind.

VII. Zusammenfassung

CNG-Kanälen kommt eine Schlüsselfunktion im Seh- und Riechsystem zu. Die Familie besteht aus 6 Genen, die entsprechenden Proteine werden anhand ihrer Homologie in 4 A- und 2 B-Untereinheiten unterteilt. In nativen Geweben bilden diese Heterotetramere. So ist der CNG-Kanal der Stäbchen aus CNGA1 und CNGB1a und der olfaktorische CNG-Kanal aus CNGA2, CNGA4 und CNGB1b zusammengesetzt. Die elektrophysiologischen Eigenschaften bei gemeinsamer heterologer Expression von A- und B- Untereinheiten gleichen denen nativer Kanäle. A-Untereinheiten alleine können in Zellkultursystemen ebenfalls funktionelle Kanäle bilden, die sich jedoch in einigen Eigenschaften von nativen Kanälen unterscheiden. B-Untereinheiten können nicht isoliert untersucht werden, da sie bei heterologer Expression keine homomeren Kanäle bilden.

Um die physiologische Bedeutung von B-Untereinheiten und speziell von CNGB1 *in vivo* zu untersuchen, wurde eine CNGB1-defiziente Mauslinie (CNGB1-KO-Maus) erzeugt. Der murine Locus wurde zunächst sequenziert und eine Restriktionskarte erstellt. Es wurde ein Targetingvektor zur Deletion von Exon 26 konstruiert, der vor Exon 26 eine von zwei loxP-Seiten flankierte Resistenzkassette und nach Exon 26 eine weitere loxP-Seite einführt. Embryonale Stammzellen wurden mit dem Vektor elektroporiert und die antibiotika-resistenten Klone auf eine Integration des Targetingvektors im CNGB1-Locus gescreent. Positive Klone wurden mit einem Expressionsplasmid für Cre-Recombinase elektroporiert, um die Resistenzkassette und Exon 26 durch Exzision aus dem Genort zu entfernen. Die so modifizierten Stammzellen wurden in Blastozysten injiziert und von Leihmüttern ausgetragen. Es wurden chimäre Tiere geboren, deren F1-Generation heterozygot und deren F2-Generation homozygot für die Deletion war. Die Deletion von Exon 26 wurde auf DNA- und RNA-Ebene bestätigt. In den KO-Mäusen war kein CNGB1-Protein nachweisbar.

Die Retina der Mäuse wurde eingehend untersucht. Eine gravierende Folge der CNGB1-Defizienz ist, daß auch CNGA1 nicht mehr in den Außensegmenten der Stäbchen lokalisiert ist. Die B-Untereinheit spielt also eine wichtige, noch unbekannt Rolle beim Transport der heteromeren Kanäle. Analog war auch in CNGB1-defizienten olfaktorischen Rezeptorneuronen kein CNGA2 in den Zilien detektierbar.

Im Elektoretinogramm zeigte die Retina der KO-Mäuse keine elektrische Antwort auf Lichtreize, die nur das skotopische System aktivieren. Die Zapfenantworten dagegen entsprachen bis zu einem Alter von 6 Monaten denen von Wildtypmäusen. Die Mauslinie ist also ein Modell, an dem selektiv die Funktion der Zapfen untersucht werden kann.

Weiter wurde mit steigendem Alter der Mäuse eine massive Degeneration der Retina beobachtet. Die Außensegmente der Stäbchen verkürzten sich und ihre Anzahl nahm kontinuierlich ab. Zeitlich versetzt zu den Stäbchen waren auch verkürzte Außensegmente und Zellverlust bei den Zapfen zu beobachten. Der Beginn der degenerativen Prozesse im Alter von 21 Tagen wurde durch den Nachweis einer reaktiven Gliose sowie apoptotischer Vorgänge gezeigt. In der inneren Retina waren keine Dendriten bzw. Neuriten von Bipolar- und Horizontalzellen mehr zu sehen, dafür bildeten einzelne Zellen lange neuronale Fortsätze (neuronal sprouting) bis in die äußere Körnerschicht. Dieser Phänotyp entspricht dem Verlauf der Retinitis pigmentosa, einer Krankheit, die durch Mutationen in einem von 39 verschiedenen Genen, unter ihnen die A- und B-Untereinheit des Stäbchen-CNG-Kanals, ausgelöst werden kann. Im Gegensatz zu anderen RP-Mausmodellen verläuft die Degeneration in der CNGB1-defizienten Retina sehr langsam. Die CNGB1-KO-Maus ist somit ein Mausmodell für Retinitis pigmentosa, in dem die degenerativen Vorgänge in hoher zeitlicher Auflösung aufgeklärt werden können und das ein großes Zeitfenster besitzt, innerhalb dessen eine Therapie durch Transplantation oder Gentransfer erfolgversprechend ist.

VIII. Anhang

1 Verwendete Primer

RT-PCR				
Name	Gen	5'- Sequenz -3'	Produkt	Quelle
PSH33F	mCNGB1	CCAAGAAGGCCCCAGAACCAGA	358bp	diese Arbeit
PSH31R	mCNGB1	ATGATGTCCCCGCCTTTGACA		
PSH02F	mCNGB1	TCAGGACCACGGCCTACCTGCT	257bp	diese Arbeit
MAS2	mCNGB1	GTCCAATCATCACAGAGAAAGCA		
MAS1	mCNGB1	CGATGCTACTACTGGGCTGTGAA	260bp	diese Arbeit
PSH05R	mCNGB1	CCAGGTCTTGACACGGTTCTGCA		
CNG6ISHfor	mCNGB3	GCAGCAACAGCCAATCAGAACTAC	415 bp	Gerstner et al. (2000)
CNG280rev	mCNGB3	TCAGAGTAACCAGAACTTGAGCA		
QG-197	mHPRT	GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC	177bp	Michalakis (2003)
QG-198	mHPRT	CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA		
mCNG1ex8for	mCNGA1	CTCCAGTCTGATTACCTAGAATAC	222bp	Michalakis (2003)
mCNG1ex9rev	mCNGA1	CCACCCAAACTTGATGTACAGC		
mCNG2ex2/3for	mCNGA2	GTTGGCAGAGATGGATACTCC	271bp	Michalakis (2003)
mCNG2ex4rev	mCNGA2	ACGGTAATACCAGTCTCCAGC		
mCNG3st for	mCNGA3	GCTACAATCAGAGCACCTGAC	223bp	Michalakis (2003)
mCNG3ex9rev	mCNGA3	CACGCCAACTTTAAATAAGCC		
mCNG5-1for	mCNGA4	GTGGCTGCCAGTCTTAGACCCAT	297bp	Michalakis (2003)
mCNG5-1rev	mCNGA4	GGACGCCAGGTCCAACAGGAAGC		

Genotypisierung				
Name	Gen	5'- Sequenz -3'	Produkt	Quelle
PSHV8F	mCNGB1	CCTCATGCATGCGACCTGAAAT	415bp (KO)	diese Arbeit
PSHV6bR	mCNGB1	GCCCAGACTAGAACACAAGTC	480bp (WT)	
PSHV9R	mCNGB1	CACAGCCATTACACATAGCAGTG	593bp (flox)	

Geschlechtsbestimmung				
Name	Gen	5'- Sequenz -3'	Produkt	Quelle
SRYfor	mSRY	AGAGATCAGCAAGCAGCTGG	249bp	Lavrovsky et al. 1998
SRYrev	mSRY	TCTTGCCTGTATGTGATGGC		
TSHfor	mTSHB	AACGGAGAGTGGGTCATCAC	383bp	
TSHrev	mTSHB	CATTGGGTAAAGCACACAGG		

Primer zur Überprüfung des Targetingvektors		
Name	Lage	5'- Sequenz -3'
PSHV1F	Intron 2ag	GGCTGGCTTACAGGTTTCAGAG
PTkSHV2R	NeoTk-Kassette	GAGATCAGCAGCCTCTGTTCC
PNeoSHV3F	NeoTK-Kassette	CCCTACCCGGTAGAATTGACC
PSHV4R	Intron 2ag	GGAGTGGCACTATGCAAGTGG
PSHV6R	Intron 2ak	CTCAGGCCCAGACTAGAACAC

Exon-Primer zur Amplifikation der Introns und für Southern Blot-Sonden		
Name	Exon	5'- Sequenz -3'
rCNG253F	19	CATCATCAACGACCGGCTCCA
PSH33F	20	CCAAGAAGGCCCCAGAACCAGA
rCNG204F	20	ATGCTCTGCTGCAAG(A)TTT(C)AA
PSH34R	20	GGTCAGTGGGTCGATACTCTGG
PSH18F	21	CCTCATGTACATCTTGTGGCTGTT
PSH19R	21	GCACAGGGATCAGCCAGCAGTT
PSH31R	21	ATGATGTCCCCGCCTTTGACA
PSH21F	22	CAGACAAGAAGGAGATGCGTAA
PSH22R	22	ACTTCAGGTAGTTATTACGCATC
PSH23F	23	CTGCCTCCTGCCCTTGGACTTTC
PSH24R	23	AGGGTTGATGCCAAGTTTCAAGT
PSH01F	24	AATAACCGCCTGGAAGCCATCCT
PSH20R	24	GGCTTTGCTGAGGATGGCTTCCA
PSH02F	25	TCAGGACCACGGCCTACCTGCT
PSH03R	25	TGCCCAGTAGTAAAGGCAGGAGT
rCNG205f	25	TTCACTCACTGGGTTTAC(T)GAT(C)GG
MAS1	26	CGATGCTACTACTGGGCTGTGAA
MAS2	26	GTCCAATCATCACAGAGAAAGCA
PSH32F	26/27	ACAGATGAGAGATGTGGTGG
PSH04F	27	GGACAGCACAGTGAAGTACATGA
PSH05R	27	CCAGGTCTTGACACGGTTCTGCA
rCNG206r	27	GTGCCAGGTGTAC(T)TCA(G)TACCA
PSH06F	28	GAGTCAGAGCTGATGGTACAACCT
PSH07R	28	GACAATACTGTAGTTCACATCAATG
PSH08F	29	CAGATGATCTTCGACATGCTCAA
PSH09R	29	CATTGGGTAGGTAGACAACAGAA
rCNG207r	30	GCCTGGATGATA(G)TACATC(T)TC

Sequenzier-Primer auf Intron-Sequenzen		
Name	Intron	5'- Sequenz -3'
PiSH10F	2af	CCAGCTCACTGTCATTT
PiSH11R	2af	GAGAAACCCTGTCTCAAA
PiSH12F	2ag	CTTCCCACCTAAGCTA
PiSH13R	2ag	AACAACCTGACTGACTTC
PiSH14F	2ai	TCCAAATGAGTAAAGTG
PiSH15R	2ai	ACTAAAGCCACGTCCTCCA
PiSH17F	2ag	ATTCAGGTCAGGGGACA
PiSH25F	2ag	CTGTGCGATTGTTGCATC
PiSH26F	2ac	TGCATTGCATACCACTCA
PiSH27R	2ac	GGCTTATCACAGGCTCTT
PiSH28F	2ac	GTAGTGAACCCATGTCTT
PiSH29R	2ac	TCGCAGGTGCCACAGAA
PiSH30F	2ag	TACAGGTTACAGAGATGCA
PiSH35F	2ag	CAAACACACACTCACATAC
PiSH36R	2ac	CACACACACACTTAAT
PiSH37R	2ad	TGTGACAGGAACTACATA
PiSH38F	2ag	ACAGTAACAGCCCAGCCT
PiSH40R	2aa	ACCCAGATGTGTGTTTG
PiSH41F	2aa	TGAACTTGGCCTTCCA
PiSH42F	2ag	GTATAAATAACTGCAA
PiSH43R	2ac	GAGAAACCCTGTCTAAA
PiSH44F	2aa	CAAGCTGGTCTCGAACT
PiSH45F	2ab	GTCTGAAGTGAATTTCCA
PiSH46R	2ab	GAAATTTGAAAAAGAAAAACG
PiSH47F	2ak	CACTTTCTGTAACAAGC
PiSH48R	2ak	CATGGTCGATCTCTGCC
PiSH49F	2ag	TGAACCGGAGGCAGGA
PiSH50F	2aa	AACCAACATGTCCCCATG
PiSH51R	2ak	TCGTGATCTGGTGTCC
PiSH52F	2ak	CAGGTGGATTCAGCCTT
PiSH53R	2ak	CTGAACTCAAGGGATGTC
PiSH54F	2ak	GATCATGGGTAGTAGTAC
PiSH56F	2ak	TCCAGCCCCCTCATTTAAATTA
PiSH57R	2ak	CTGGCTCAGCAGTTTACTACCAG

Primer und Oligonukleotide für Klonierungen		
Name	5'- Sequenz -3'	Verwendung
LpBlueNheF	GATCCAACCGCTAGC	pUC18
LpBlueNheR	GATCGCTAGCGGTTG	Modifikation der MCS
LpUC18ClaNheXhoF	GATCCATCGATGCTAGCCTCGAGG	pBluescript® II KS (+/-)
LpUC18ClaNheXhoR	AATTCCTCGAGGCTAGCATCGATG	Modifikation der MCS

PSH58F	CACACATCCATCACCTGTAGTT	PCR-Fragment zur Einführung der einzelnen loxP-Seite nach Exon 26
PSH59RloxP	AACAGCCCGGGAATTCATAACTTC GTATAATGTATGCTATACGAAGTTA TTCGCAGCCTTGAAAAAGCC	
PSHA2-1F	ATCTTCCAGGACTGTGAGGCT	bCNGA2-Mutante mit murinem Antikörper-Epitop
PSHA2-2R	ATCTGACAAATAATCATCCTCATGG TTCTGTTTC	
PSHA2-3F	GATGATTATTTGTCAGATGGAATAA ACACTCCTGAGCCAG	
PSHA2-4R	ACCCAGGATTAGAGAGGCTTC	
PSHA2-5F	CCTTAACATTAAGGCAG	
PSH59RXbaI	GCCCTCTAGACCTGTTCCCCACGC CGTCAT	CNGB1-KO-Konstrukt
rCNG04F	ATGCTCTGCTGCAAG(A)TTT(C)AA	

2 PCR-Bedingungen

PCR	Primerpaar	Zyklenanzahl und Annealingtemperatur
CNGB1	PH31F PH33R	10x 68°C, 30 sec 30x 57°C, 30sec
CNGB1	PSH02F MAS2	10x 67°C, 30 sec 30x 57°C, 30 sec
CNGB1	MAS1 PSH05R	10x 68°C, 30 sec 20x 58°C, 30 sec
CNGA1	mCNG1ex8for mCNG1ex9rev	10x 70 °C, 30 sec 25x 60 °C, 30 sec
CNGA2	mCNG2ex2/3for mCNG2ex4rev	10x 68 °C, 30 sec 24x 58 °C, 30 sec
CNGA3	mCNG3st for mCNG3ex9rev	10x 67 °C, 30 sec 28x 57 °C, 30 sec
CNGA4	mCNG5-1for mCNG5-1rev	10x 69 °C, 30 sec 22x 59 °C, 30 sec
CNGB3	CNG6ISHfor CNG280rev	10x 68 °C, 30 sec 24x 58 °C, 30 sec
HPRT	QG-197/ QG-198	23x 57 °C, 30 sec
Genotypisierung	PSHV8F PSHV6bR PSHV9R	30x 59°C, 30sec
Geschlechtsbestimmung	SRYfor SRYrev TSHfor TSHrev	35x 60°C, 40 sec

2601 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCCATACACCCACCCTACCCCATAAATAAATGAATATAATAAAA
 2666 CGTTTTTCTTTTTCAAATTTAGAAAAGGAACCTAACAGTCATTATCCAATAGTGCCACCA
 2731 TGTCCCCTCCTCAGCAGACTCTGATGTTTTAGGGTCTATCAGGGACCTCCATGGCCACCTAGATG
 2796 CACTGATCCACCTGTCTGTCCATCTGTCTGTCTATCTTCTGAGTGATGAAATCCATACACAGTTG
 2861 CTGGGGGGGGGCACCTTTCTTGTGTCGCCCTTCAAGCCCATTCTGTCTCCCCTCCCCAG**ACCTCAT** **E21**
 2926 **GTACATCTTGTGGCTGTTCTTTGTGGTGTGGCCTGGAAGTGGAACTGCTGGCTGATCCCTGTGC**
 2991 **GCTGGGCCTTCCCGTACCAGCGGGCAGACAACATCCACTTCTGGCTCCTCATGGATTACTTGTGC**
 3056 **GACTTTCATCTACCTCCTGGACATCACCGTGTTCAGATGCGCCTGCAGTTTGTCAAAGGCGGGGA**
 3121 **CATCAT**GTGAGTCATGGGCAGGGGGAGGGGGAGGGAACCTGGGCAGACCCTACAGCCAGGGCCT
 3186 TCAGGAGACTGACCTCTGATGCTGTGAGCGGTGGACGAAATGAATGAACAAGATCCCGGGAGCCG **I2ac**
 3251 CTGTCAAGTGGTTTGTGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCTCACCCCTTGCATGTTGAAC
 3316 AACTATGTGCATTGCATACCACTCAAAGATGAAGTGGTCCAGACAATCTGAGTTATAGAAGT
 3381 GGTCCAGAGAATGGCATCTGGGGCAGGTGTACCTGCTTCAAAGTCTAGCTGCATCCCCATCTGAG
 3446 CTTCAAGCATCCTCGTCTATGAATGGGGTGGTAGCAGCTCCCAAAGTGATACAGGTATTGCTGTGA
 3511 GAAGTGAAGATGCAGGGAGCTCGGGGAGCTGAGTGCCTGCAAAGGACACGGAGACGATCTG
 3576 CTATGTGAGCCAGCCCTGTGCCCTGTGAGGAAACCACAGCCCTAACTGTGACCCTGGTGGTCATAT
 3641 ACCTGTAATCCTAGCACTCGGGAGGCTGAGGCAGGTAGAGCTGAGTTGAGGTTAGACCAAGCTGA
 3706 GTAGTGAACCCATGTCTTTAAAATGTAGGGGTGGGGGTGGGAGAGGTGTAGGAGAAAAGAAAG
 3771 AGAAAAGAGAACCAGGCACCCCACTTCCCATGCTGTGAGCAAGTCACTTTCCACAGTTCACACT
 3836 GAGGCCTGGATGTGTAGCCAGTGTGTAGAGCTCTTGCCCAACTCCCTGGGTGAGTCTACTGCAA
 3901 GTTTTTTGGGTTTTGGTTTTTTGGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTXXXXXXXXXXXX
 3966 XXXTAATATTTTTTTGTTTTTTAGACAGGG
 4031 TTTCTCTGTATAGCTCTGGCTGTCTGAAGTCACTCTGTAGGCCAGGCTGGCCTCGAACTCAGAA
 4096 ATCTGTCTGCCTCTGCCTCCAAGTGTGAGATTACAGGAGTGTGCCACCACTGCCCTGCTGTTT
 4161 TTCTGGGTTCTTTTTGTTTTTTTTTAAATCCACTCTATAGTAAAAGTGGGGGCTCTCCTCTAAAACA
 4226 GCTTCTAAGTGGCCTTTTTCTTTTGGATTAGAGTTTTTTTTTGAAGGGGACATTGCCTTCTGTTGT
 4291 GTTCATGGAACAAGTCAAGGCAGTTTAAACATATTAAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
 4356 TG
 4421 TCTTTTAAAGAAAGATTTAATTATTTATTTATATGTAAGCACACTGTAGCTGTCTTCAGATACCCCA
 4486 GAGGAGGCATCAGATCTCATTACTGATGGTTATGAGCCCCCATGTGGCCTTCTGGGAATTGAATT
 4551 CAAGACCTTTGGAAGAGCAGTCAAGTGTCTTAAACCCTGAGCCATCTCTCCAGCCCAAGAAAGAT
 4616 TTTTACCACCTTCAATATACTGATTAAAGACTTAAAGAGGGAGCCGGGCATAGTAGCACACCTTTTAA
 4681 TCCCGCACTCAGGAGGCAGAGGCAGGGAGGATCTTTGTAATTTGAAGCCAGCCTGGTCTACATA
 4746 GAGACATGGGCTACCTGTCTCAAACAAAACAAAACAAAACGGGTCAAGGGCTCTGGGGGGATG
 4811 GCTCAGCAGTTATGAACACTTCCCTGCTCTTCTAGAGGATGCAAGTTCAGTTCCCTAGCACCCACAT
 4876 CGGGTGCCTCCAGGGGATCCAATGCCCTCTTCTGGCTTCTGTGGGCACCTGCGACACATAGGCAC
 4941 ATATACGCATGCACATGAAGAAAATAAATAAATCTTTTAGCAAAAAGAATCAAACATTAAAGAA
 5006 AAAAAAGTAAATAGTGTTTTTGAAGCTAATTATTAAGCTGCGTGAAGTAGAACTAATCCACGGTTG
 5071 AGATTTTTGAGATTTTTGCCCACTCAAAAATGGGCAAAAATAAAATTTAACATTCTAGAAGTTCAG
 5136 ATTTTGGACATTGTATCTTGTGTGTTGGATGCCATAGCAATTAATGCTCTGCCAACAGCTGCTTC
 5201 ACAGGCTGCAAAATGTTATTTGTGCATAACAGGTACCATGAATTAAGTGAAGTCTTAAATGCTTAAAG
 5266 AGCCTGTGATAAGCCAGACAGCATATGCCAGAAAGGGAAGCCTTGGGCCAGCCTCCCCCTGGCC
 5331 TCATCAGAGCAGTTGCCAGCCCCACAAAGTGGCTAGCAGTCTGGGAGGAGCTGAGAACTGAG
 5396 AGAATAGACTCCAAGCTCTTCCATTCCTCCATCCAGGAGCTCAGAGTCTGGCTGGTACTCCAGC
 5461 AAGGCTCATTCCTATGGCTGGTCATCCCCAGCCCCCTCCCACCCGAAACCACAAGTTCTTCTCTT
 5526 TGGGGCAGCTGCATGTGTCTGTGAGGTCACCCACCTCTCTGGTTCAGAGCTTGATCTAACATCAT
 5591 TGTGCTTCTCTTTTCAG**ACAGACAAGAAGGAGATGCGTAATAACTACCTGAAGTCTCGCCGGTTT** **E22**
 5656 **AAG**GTGTGTGTGTGTGGGGGGGTGGGGGGTGTGAGCCGTTTGAAGTGGGACTGTTGGGGACCTG
 5721 TGTATGTAGTTCTGTGCATTAAGGGAGGCTGGTCCTATCTCCGGTGGGAGTGCCCACTAGGC **I2ad**
 5786 CACAAGTCTTCCGAGACAGCCAGACTGGGTGGCTTTACAGAACACCTTTCCATGCCTGTGCCT
 5851 CTGCTTCCAATTAGGTGGCACAGAGTCCCTTGTGTTGGTGGGGACAGTGTGCTGGAGGTGGGCA

5916 ATGTGGATTATGAAGCCACACAGAGTGGGTTTCGTGGGACGTCTTGTGCCCTCTCTTCTGACACTG
5981 CCCTGACTATTCTGACTGAGCTCTCTAGTAGATAGAGCCATGCCCCCTTAGCCCTCCTACCCATG
6046 AGTTCTGTGTCTTATCCCTGCGATGCCTGTTGGGATTTTAGATGGACCTGCTCTGCCTCCTGCC E23
6111 CTTGGACTTTCTCTACTTGAAACTTGGCATCAACCCTCTCCTTCGCCTGCCCCGCTGCCTGAAGG
6176 TAAGATGGCAGTCCCCAAAGACTTCGGTTCCCTCTGTGCTTGACCTGAACGCTGCCAGCTGGGG I2ae
6241 AAGGGAGAGTGTCCCAAGAGGAGACCCTGGGGAGGTGGGTGTTCTGCAAGCATGCCTTACTAAG
6306 AAGTCCATTATAATTACTGGTAATTTGGGGACATTTCTCATTAGACTCTGATCCAGAGACTACT
6371 GATGTTAGTTCTTCGACTCCATGACATGAATGCTGTTCTTACCATCTTAAAAATGAGGAAAGTGG
6436 CATAGAGAGGCTAAGGAACCTGCCAGTGACACACAGCTAGGCAGGAGCAGAGTCTAGATTTGGA
6501 TGTAGGCAATCTAGCTCCAACCTCCATCCGCTCAGCACATCTCAAGGAAGGGGCTTCTGCTTTATA
6566 ATAGACTCCATTTCAGAAGATGGGGAAGTGGTCCCTTGAATGGCCTGGTGACTCCCCCAAGGTAAC
6631 AGGAGTAAAGCTGTGCCCAAGGCTGTTTTGGATGCATGGTGCCTATTCTAACAGTGGTTCCAG
6696 TTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTCTGCCACTCACTGGCTGGACCCAGGGTCTTAGGAG
6761 GATCTGCTGGATTCAGAGTGGAGATCCGACAAGTGCCTTGAATGTGATCAGGGCAGATGGCCAC
6826 TCAGAACATTCAGGATCTCCTAGATTCTATCCAACCAATTAAACTTACTATTCCCCTTACATGAT
6891 ACTAGTGCTCTTTTGCAAAGACAGTAAATGGGGGAAATTACCAACAGGGGTAACCATGATCACAC
6956 TGGTTACCTGGAGAAAGAGGGCAGAGAAGATCGGTAATCATCAGATAGGGTAGAAGACAAGGGCT
7021 GTGCAGCCATGTCTCCAGCAGGCCAGAGCTGGCCTAAGTCTTCTTCTCTCTAGTACATGGCCT E24
7086 TCTTTGAGTTTAATAACCGCCTGGAAGCCATCCTCAGCAAAGCCTACGTTTACAGGTAAGAGTTC
7151 CCATGCACACACGTGCACATATGCACATACTGCACACACAGAAGCACACACACAAACACACACAC I2af
7216 ATCATATACCCTAGCCTCTTCCTTTCTGCTGCCCCCATCCCCATCTCCCATGGCCTTCAGAATC
7281 CATGCCACTTCCTGGCCAGCTTCTTCTCTGAAAGGATATTTAGTTGGTTGGTTGGTTTTATGTA
7346 GAATCAGGAATGTCTTATTTAAACCCCATTTGTGACAAGGAAACTCACACACACTCGGTGACAA
7411 GGCAGCATTTCCGTGTCAGTATAAGGAATTTGAAGCTCCCATCCTAGCTCTAACTGAAGGACCATT
7476 TGTAAGAACACATTTGGTAGAAAACAGATGTTAAAGGTGGAGCCCAGGACTAACTCAGCTATACTT
7541 GGGGAGCAAGGCTCCTTGTTCCTAAAGGAGTGCCAGCTCACTGTCATTTCTCTACAGACACCAA
7606 ATCCTCTCTGCTCTTCTCTCGGGCCTTATTTCCCTTTGGCCCTCATCTTATAGATTTCTCTGA
7671 CACAGCTGGGATGATTCAGCCCTGCATTTTGACAAGCCTCCAAATCAAACGCCAGGTTTCTTT
7736 TCTCTCTTTCTCTCTCTCTTCCCT
7801 CTCTCTCTCTCTCTCTCTCCCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCCCTTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCC
7866 CTCCCTCCTTTCCCTTCCTTTTCTTACTTTCTTTTCTTTTGGACAGGGTTTCTCTGTGTAGC
7931 CCTGGCTGTCTGGAACCTCACTCTGTAGACCAGGCTGGCCTCAAACCTCAGAAATTCACCTGCCTC
7996 TGCTCCGGAGTGCTGGGATTAAGGCATGAGCCACCCTGCCAGGGTTTCAATTCTGAGCCCC
8061 CACTCCCACCCCTGAACCCCTTCCACTGATTGGGTGGCTGAGACCTGTTAACCACTGATTGG
8126 GTGGCTGAGACTGGTTATCCACTGATTGGATAACTGGCTGGCCAGGGTTATATGGCTCCAACAGA
8191 GGGAAACCTCTGAGGTGGGCTTTGGGGGAGCTGAGATCTAGTTCCCTCCCAACGCCCCAGCCCC
8256 TGGGGCAGGTATCACCTCCATGGCTGTACTCTCTCTCCCTCTGCAGAGTCATCAGGACCACG E25
8321 GCCTACCTGCTGTACAGCCTGCACCTCAACTCCTGCCTTTACTACTGGGCATCAGCCTTCCAGGG
8386 CATCGGCTCCACTCACTGGGTTTACGACGGAGTGGGGAACAGGTGAGTAGGCTTCCCCAGGACAT
8451 CACAGGGTAATATTTTTGTCCTTTACAGTTACAACAGAAAGACACCTAGAAAGGTGTCCTATGG I2ag
8516 CTATTGCGTTGCCAAAACAACCTTGCTCTGGAGGAGTCATTCCCTCGTAAAATTTCTAAAGCCAAG
8581 TTCTCCTTCCCACCTAAGCTAAGGTCTCCTGGGAATTGCTAGTGTGAGGAGGGTCTGGGCA
8646 CCAGACCTGCTAGAACAGTGAGTGGTTCTCAACTTTCTTAATGTTGCGGCCCTTTAATACAGTTC
8711 CTCACATTTAGTGCCCCCGCCATAACATTACTTTGTGTGCTACTTTATAACTGTAATTTTGCTA
8776 CTGTTATGAATCATAATATAAATATCTGCTATGCATAGTCTCTGATGTGTGACCCTCCCAAAGGG
8841 GTCACGACCACAGGTTGAAAATGCTGTGCTAGAAATAGAAAGATCTTCTCACATACTAAGT
8906 CCAGTAGGGTTGCCAAATATACCACACAGCCTTTAGTGTGTGGAAACATTCAGGTGAGGGGACAA
8971 GGACTGTGGATAAAGGTATTTCCCATAATGTCATTTGTGTCATATAGAAAAAATGGAATGCCCCCC
9036 AGGGCCAGTGAAGAAGCTTTCTGGTGGAGCGACAAAGTTTCAGAGCATCTATGAGCTATTGTA
9101 CCTCCCTGTGGGCAACCTACTTTTTTTCAGATTTTAACTTCTAGATTTGAGGTATACGGAAAATC
9166 CACATGTACGTTTAAACATGATATTTATTTTTGTACAAAAGCTGAATTTGTGTTGAGGATACTGC

9231 TCAGTGGGAGGACAGCTGTCACCTTAGCATGTACACGGATGGCTCTGGTACAGTCTCCAATATGTG
 9296 GGTGTGCGTGCACACAAAGGCAGAATTGACTCCGTGGTATGCTGTGCGATTGTTGCATCTTAGAA
 9361 CTGATGAAATATAACAGGAGAACGTTTCCCTGCTTTTTCTCTTCAAGTCAGCAAAGAATTGCACGT
 9426 GCATTGAGCATATGTATATATCCAGCATAGTGGACAGCAAACGGAAAGCCCTGGCTGGATCCCCA
 9491 CTGCCAAAGCAAGGCTGCACAGGAGCAGCATGAGGTGCCCTCATGCATGCGACCTGAAATGCTTT
 9556 AACAGCCATATCAAAGACACAAAAGGAAGCCGCATCAACGTTAGTAATTGTCTTAGTGTTTTACT
 9621 GCTGTGAACAGACACCATGACCAAGGCAACTCTTATAAAGGACAACATTGAATTGGGGCTGGCTT
 9686 ACAGGTTTACAGAGATGCAGTCTATTATCATCAAGGCAGGAACATGGCATGCATCCAGGCAGGTATG
 9751 GTGCAGGAGGAGCTGAGAGTTCTACACCTTCAACTGAAGGCTGCTAGCAGAATACTGACTCCGAG
 9816 GCAGCTAGGGTGGGGTCTTAAAACCCACACCCACAGTGACACACCTACTCCAATAGGGCCACCC
 9881 ACTTGCATAGTGCCACTCCCTGGGCCGAGCATATACAAACCATCACAGTAATATATTTGGTTAAT
 9946 CCCAGTGACAGAGTAATCACTGCTATGTGTAATGGCTGTGTTAAGTATGAGTTCACTAGACAGTG
 10011 GAGAACTTCTCTTACACCTTTCAAATCGTGTGTGTATTACACACACACTCACACACAGACACAC
 10076 ACACACACACACACACACAAACACACACTCACATACACACAGAGATATACACACACAGAGGGCAC
 10141 ATCATTATACATGAATCTCAGGCCCTCTGGTTTTATTGCTTCTTTATGATCTATAACATAAGCTCTG
 10206 GGGACAAAACCCAGGGCCTTCTGTGTGGTTAATTAAGCATTTTAAAGACAGTCTCTCTAAGTTGC
 10271 CCAGGCTGGCCCTGAATTCACTCTGTAGCTCAAGTCGCCGTTGGGCTTTCTATCCTGACTAGCTT
 10336 CCTGAGTGCTAGGAAGCAGCTACTAAGGACTCTTGTGAGGATGAACGGTAACAAACCAATGAGTG
 10401 AGCGTCTGGCTGGTGGCATGCCCTGGCCAGTGCCCTGCCCCAGCCGTGAAAGCCGCCACGCCGGGA
 10466 AGAAGTTCAGAACCTGGCCTCTGGAAACAGTAACAGCCAGCCTAGAAACATAAGCTAAATTCTG
 10531 AGACTATGCAAGCTGCTCTAGGTTGTTTTTCTGGCTTTCTTTCAAGTCTCAAAGGAGTCTATGC
 10596 CTGTAATCTAAGAACCCCTTCTCACTGGGCAGTGGTGGCACACGCCTTTGATCCCAACACTTGG
 10661 GAGGCAGAAGCAGGCGGGTTTTCTGAGTTCGAAGCCAGAAAAAAAAAAAAAGGAAAAGGACCAAAAA
 10726 TTTTTCAAGAAGTTCAAAAGTATAAATAACTGCAAATTTATAACCTATAAAATGTTATAACTATAT
 10791 AAAATAAAACTGTAAAATATAAAAAATCACAACATAAAAATATTGTAGTATTTTATAGTTTATAA
 10856 ATTAATTATACTATAAATTACAAATAACCAAAAAATGCAAATAACTATAAATAAACTAAAAATTA
 10921 GCCGCCACCTCCGGGGGAGGATCTGCTGTGTGCTGGAGCAAGAAGCCTTGGAAAACCGGTTCTCT
 10986 GCCTAACGCAGTCCATTGTGTTCTGTCTCAGCCTGTAGCACTGAGCGGGGTGGGGCGGCGCCCC
 11051 ACTCCAGGAGGACCCAATAAGTGCCTTGTGAGATTACGCCAACTAGAAACATTTAGGGGAAAGCT
 11116 AGGACTTTGAGGACACCCCTCTTCCCTCCCTCTGTGNGGTTCACTGCCAGCTGCGCGAACACTCA
 11181 GCTCCCTCCACAGTTTGATTGCTTAGATGGGCTGAACCGGAGGCAGGAGGGGCTGCTTAGATCTA
 11246 CCTATGGTCGATCCACGCGCCCCCTGGTGACCAGTACTGGTATAGTAGGAAATGTCAGGGCAGA
 11311 CTGGTCTGTTGTGGCAAGCAGCCTTGTCTAAGATACCCAGCTTGTCTGAGGCCTGCATGGGCAT
 11376 TAGCATGAGCTGGCAGGTGCAGTCCCTGTGTGAGTCTTGATGACTGATATAAGGATCTGGTCACT
 11441 CTTCCAGCTCACTCATCTCACAGTTGCCCTGGGAAGAATGTTCCCTGCTGTGTCCATTTTAGAG
 11506 AGGAGGAAGACGACTGGAGATGGTCCATGCTAGGGCCTGTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 11571 TTTTTTTTTTGGTTTTTTCGAGACAGGGTTTTCTCTCTGTCTCTCTGTAGCTCTGGCTATCCTGGAA
 11636 CTCATTTTCGTAGGCCAAGCTGGCCTCAAACCTCAAGAAATCCTCCTGCCTCTGCCTCCCAGTGTCT
 11701 GGGATTAAAGGCGTGTGCCACCACGCCCGGCTGGGCCTGTGCTTTTGGTGGTGCCTGCATAGGT
 11766 GGAAGGCCAGGGAAGTCAGTCAGGTTGTTTGACCCTGCTGGCCTCCCTTTGCTGATATCCAGA
 11831 AGGACTCAGCCTGGAGCTGTGGCTAGGTGCCCTCCTGGGACCTCAGTTCATATCTATGTCCCAGG
 11896 ATGGCATGTTCTACAAGGCTGGGGCAGAGCCTCAGCCACCCACGTAACACTTGAGAGGAGGGG
 11961 GCATCTTCTTGCATCTGTATGGGATCCCTATGGGTGTCTGAACCAGGATCACAAGATCAGCCCGG
 12026 CCGTTCATGTAGTGACCAAGGTCCTTTTTCCACCTCTTACTAGTTATATTCGATGCTACTACTG **E26**
 12091 GGCTGTGAAAACCCCTCATCACCATCGGAGGACTGCCCGACCCCGAGACGCTCTTTGAGATTGTCT
 12156 TCCAGCTGCTGAACTATTTTACCGGGTCTTTGCTTTCTCTGTGATGATTGGACAGGTAGGTGAC
 12221 TGCAGCCACATCACACATCCATCACCTGTAGTTCTCCACCCCGCTGGAAGCTTCTCTGTGCGT **I2ah**
 12286 TGTGGCTTTGGGGACTGAGCTCAGGGAAGACTTGGGACCAGAAGATGTCTGTGTCCAGGACTGC
 12351 CCGAGGCCTTCTGTTTGAATGGTAGTCCCTTTGGGGAGCACAGGAAGCCAGGTGGCTACCTGGC
 12416 TTTTTCAAAGGCTGCGAACCCGGGCTGTTCCCTGTAAGCAAACCCCTTCGGGGTCTCTGATGTGA
 12481 TGTGTGACTTGTGTTCTAGTCTGGGCCTGAGGCAATAGCTGAGAGTTCTCAAAGCAAACCTTGAA

12546 GGGGATTCTGAGAAGCAGTATTCAGGGGGGGCCAGAGTCCACCCTGGAGGAGAGCGGCTATAC
12611 ACAGAATCAGCTTATCACAGTGAGACATCCAACCCCAACATGGTGCCAGGAACCCGAGATGGCCA
12676 GAGAGGTCTGCAGCCATGCATCAGCTTCTAGTGGCTTTGCTTTATGTTTGCCATCTGTGTTTCT
12741 GTCTCTGGCTTACCTACAAGCATAGGTCCCTGACTTCTGTACTGCTACATATCCAACCAGTGTCC
12806 TGCCCTGGCTTAGGCCAGCCACTTCTCTGACCTCCCCTCGCTGTTGTCTCGTTCCAGATGAGAGAT **E27**
12871 GTGGTGGGGGCCGCCACAGCGGGGCAGACCTACTACCGCAGCTGCATGGACAGCACAGTGAAGTA
12936 CATGAACTTCTACAAGATCCCCAGGTCTGTGCAGAACCCTGTCAAGACCTGGTATGAGTACACCT
13001 GGCATTCGCAAGGCATGCTGGTAAGACTGGCCAAGCCCCTAACCTCTACATCCCCCAGCCAGC
13066 CTTACCTGATTCTCAGATTGACCAGTTCCTCCCTTGTCTGTGTGTCCTGAGGATTCTCTGGTG **I2ai**
13131 GTTGTACCCTGAGCCATTGATATTAGAGAAACCTCTCAAGGCCAGTGAAGACTCTGGAAAACCTA
13196 AGGGGCATGTCCTCTGGACAGCCACTCTCCTCTTGCTCCATCTACCTTGAGACGCAGCTCCATCC
13261 AAGGTGTAGGCACCTCCAACCAAGTAAACAGCCGGGTGTGGCAGCCCAGGCCTAGGATCCCAGCA
13326 TTTAGGAGGGCTGCTTTAAGTTTTACCCAAGGCTGAACCACACAGCTAGACCATGTCTCCAAATG
13391 AGTAAAGTGGTGGGTGGGCCAGTGAGATGGCTCAGTCAGTGGAGGGGCTTGCTGCTAAGCCTGAT
13456 TGATGACTCAAGCTCAATTCCTAGGATCTAAATGGTAGGAGAGAAGTACCCCTGTAAATTGTCC
13521 TCTGACCTCTCCACGTGTACCATGGTACAGTGCCTTTATGCGCACATGTTTTTGTGTTTTGATTTT
13586 TAAAACAAAGTAGGGTTGACAGTGTACAAGAGCTACAAGTAGAGATTATTACACAGAAGCTG
13651 GGTAGGGACACCCAAGGACAGGCTTCCCTGGAGGACGTGGCTTTAGTCCTTAGTTTTGAAGGTTG
13716 AGTAGGAGTTTGGTTTTGGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTCTTTGTTTTGGTTTTGGTTTTTC
13781 GAGACAGGGTTTTCTCTGTGTAGTCTGGCTGTCTGGAACCTACTCTGTAGACTAGGCTGGCCTC
13846 GAACTCAGAAATTCGCCTGCCTCTGCCTCCCGAGTGTGGGATTAAGGCATGCGCCACCACGCT
13911 CACTCAGAGTTTGGAAAGGAGGTGATGGTGTTCCTGACAAGGGAACCTCATAGATTCTGAAGTAGC
13976 CCCCTCTGGCGGGGAGAAGCTGAGCTGGCTAAGCCAGTGCAGGGCCTCACATGGTTGTGTGCGGGT
14041 GTGTGAGGGGCCAGGTCTGAACTCTGACCCCTGCTGGGTCTCTTTTCCAGATGAGTCAGAGCTG **E28**
14106 ATGGTACAACCTCCGGACAAGATGCGACTGGACCTGGCCATTGATGTGAACTACAGTATTGTCTAG
14171 CAAAGTGGCCCTCTTTCTAGTACCCCCACAGGTGCCCTCCCCCTGGGGGGAGGGTCTGGGACAAA **I2aj**
14236 GCCCCCTGCCTTCCCTCTGACAGACTCCTCCCCCTCCATCTGGGCAGGGCTGTGACCCGCAGATGA **E29**
14301 TCTTCGACATGCTCAAGCGGCTTCGTTCTGTTGTCTACCTACCCAATGACTATGTGTGCAAGAAG
14366 GTGAGCTGTGTGGGCTGTGTGCCACAGGGTTGGGAGAAGGTCTGCTCACCCCTGCACAGCAGCCA
14431 TGATGCAGATGAGCCCTGGGTGCCGCTGCCAAAAGCTTCCAAAGCTCCCATCACACAGAGGAGCC **I2ak**
14496 AGCCTTGCAGAAAAGGGTGGTGGGGGCTTCTAAGCCACAAACCTGCTGCCAGGGTCTCATTCTT
14561 GCCATCAGGAAAGTGGGTGAAGGAATAGGCCAAATTAACAGCTGCAACTGGAGACCCGTGGGTGG
14626 TTTATAGCCCTGAAGTGTGTTTTGTGAATTTCTTTAAGTGAATTAATCCCTGACATTTAAAAGTTG
14691 GAAGATTTACATCAAAATCCAAACATCTGGATGAACTGAGCATTGACCAGCTCTGGGTCCCAC
14756 TTTCTGTAAACAAGCAAGAGTCGGCATTGGGAGGAGTAGGGGTTAACACTAAAAGGGACAGGTGGT
14821 GCCCTCCCTGTAGGACACCACAGGTCCCACCTCTCTGTTCCACCCACACCAGGTTCCCTTCATT
14886 GCTTTGAGCCACACAGGAAACATGTATGTTAGAATCTGACTCTTGACAGTGTGAAAGCCCTTTG
14951 TGCTCCTTGTAAAGGGTCCAAGGTGGCTGCAAGGTACCAGGGGCAGGGGTAGGCAAATTTTA
15016 AGTCTTTTGTATGGAGGTATTAATAAGTCTGGGTGAGTGTATGGGGTGAAAACGTTGTAAGACTT
15081 GGAAGCCTCTAACCCCTGTCAGGTGGATTACGCTTTTTTAAAAATTAGTACTATTTATTTATTTT
15146 GAGACAGGATCTCTTTATATAGCCGGGGCTATCCTGGAACCTACTATGTAGACCAGGCTAGCCTT
15211 GAACTCACAGAAACCTGCCTGTCTTTATCTCCTGAGGGCTGAGATTAAGGTGTGTGCCACCATG
15276 CCTGGCTTTAAATATATATTTTCTGCTCTGAAATAGTATTAAGTGTCTTCTACTACTGAGCTTT
15341 CTCTCTAGCCCTTCATTTGTTTTTTTTTAAAGATTGATTGATTGATTTGTTTTGTGATTTATTTAT
15406 TTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATATGAGTACACTGTGCTGTCTTCAAACGC
15471 ACCAGAAGAGGGCATCAGATCCCATACAGATGGTTGTGAGCCACCATGTGGTTGCTGGGAATTG
15536 AACTCAGGACCTCTGGAAGAGCTATCAGTGTCTTAAACCATGAGCCATCTCTCCAGCCTCCATC
15601 CAGCCCCCTCATTTTAAATTACTTATTTGCTATAGGGAGTTGAGGGGGTGGGTTGTGCAACCACA
15666 ACCAGGTCAAAGTAGGAGGACAACCTGAAGGATTTGGTTCTCCATCCCCTTTGTGGGTTCTGGGG
15731 ACCAAACTCTGCTCCTCGGGATCGCCAGCAGATGCCTCTACCTGCGAAGACATCCCTTGAGTTCA
15796 GTTTACAGGTTTGTGTTGGGCCAACCCATAGCTATCCCTAGCCAAATGTGGCTCAGAGAGCCG

15861 CAGATTGGGTATGTCTGTTGGGCAGTATGCTAGGTAGCAATGAAGTTTCTGGTAGTAAACTGCTG
 15926 AGCCAGGAGAGGAGAGGAGAATTCAGAAGGCTGAGCATTAAAGCTGCTGCCTTGGGAGGCTGGG
 15991 AGAAGTTTGGGAGCATTAGAGCACTTTATACAGTCAGTGTAGAGCCACTTCCTTGGTTGGGTAG
 16056 GTGGCTTCCCTCTCTGAGTCCCATCTCTTGTGGATAAAAAGTGTAGGTGCAGTGCCTCCCTC
 16121 ATAGGGTGAACAATTGCTGTCACTGTTTTCTGTGTGTTGGCATGGAGTTTGCATCAGGCGACTA
 16186 AGGTGTTGGGGAGCATGTGTGAGCAGCACCCCTGCTGTTGATTCCCTCCGAGACTCTCTGAGACA
 16251 CTGGGACTTTGACCCAGATGTCAGAACAGAGAAGGGAACACCAGATCACGAGTGTGTGTGATGT
 16316 ACTGGGATCCTGTAGAGGAAGTCAAGGTGTGACTGGGTTACCTGTCACCCATTTAATCATGACA
 16381 GGTGTGATTGACAGGTGGCCGTCAAGACAGGGTGAGGCTTGAAGGTGTGTGGAAGGTATATGGC
 16446 AGGTTCCCGTTTCTGATCGAATCCAGAGCAAGCCATACATTCCATTCCCACAGTCACTCATT
 16511 CATTTGTCCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTTGCTCCTTTGCTTTTTAACTTGGGA
 16576 TTTGAACCACTGTGTGACAGGGCTGGCAGACCAACTGGCCATTTCTTCAAGGAACAAGATAGGC
 16641 ATCTTCTCTCTGGCTCTCTTCCACCTATAGATGTTTTCTGTAAGAGTGCAAGTTGGCTAGGATTA
 16706 GGGCCAATCTACTCAAGTAGGTCATCTGCCAAGTGGGTCATATTAGGGGGTCTGGGGATTTAG
 16771 GGTCTCACCAGACAGAGCCTAGGTTTGGGGCAGAGATCGACCATGGCAACCATGCACCCTGAAG
 16836 TCAAGCTGTCTGACCCGAAATCCCAGTCTGGTTTACTTTGCATTATGGTCTTGGTAGAGCATA
 16901 ATCTTACCATAGCAGGTTACCCGTGGGAAGCACGCCACCGACAGCAGCCCAGAAAATGCCCTG
 16966 GGGCCTGTGGCCTCCTGACAGTTACCATCATTCTCGTCTCAGCAAACACTAGCCAAGCTCCTGA
 17031 GGTGAGAGCATAGATTCTCACTCGGTGTGGATCATGGGTAGTAGTACAAGGGAGAGCTACAGAGT
 17096 AGCATCATACCCAACATTCAGAAGAGAAGATGGAGGCCAAGAGGAAATTGACCCAATCACACCAC
 17161 ACGATCTGGTAGGGCAGGGCTGGAGCAGCCTCAGTGGCCACAGGGTGTGGGACTCAGCCTTCTTC
 17226 TGTTCACGGGGAGATTGGCCGAGAG

E30

4 Sonden für Southern Blot Analyse

Sonde	Lokalisation	Primer bzw. Restriktion	Größe
ES-Zell-Screening			
W	mCNGB1, Intron 2ak	PiSH56F – PiSH57R	337bp
K	mCNGB1, Intron 2ac	XbaI – NheI (aus PCR-Fragment PSH18F-PSH22R)	241bp
18	mCNGB1, Exon 27	PSH32F – PSH05R	129bp
Neo	pBlueskriptNeoTkmod, NeoTk-Kassette	HindIII - AgeI	148bp
CNGB1-Mapping			
19	mCNGB1 Exon 20	PSH33F – PSH34R	150bp
17	mCNGB1 Exon 21	PSH18F – PSH31R	206bp
16 / 20	mCNGB1 Exon 23	PSH21F – PSH24R	109bp
N	mCNGB1 Exon 22 + 23 mit Intron 2ad	PSH21F- PSH24R	537bp
15	mCNGB1 Exon 24 + 25	PSH01F – PSH03R	110bp
14	mCNGB1 Exon 26	MAS1 – MAS2	133bp
18	mCNGB1 Exon 27	PSH32F – PSH05R	129bp
21	mCNGB1 Exon 28 + 29	PSH06F – PSH09R	162bp

5 Verwendete Antikörper

5.1 Primärantikörper

Antigen	Antikörper	aus Spezies	eingesetzte Verdünnung	Quelle
Adenylatzyklase III	A cyclase III (C20)	Kaninchen	IHC 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Kat.Nr. sc-588
aktivierte Caspase 3	Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Kaninchen	IHC 1:100	Cell Signalling, Kat. Nr. 9661S
α -Tubulin	Tubulin Ab-4 (Clones DM1A + DM1B)	Maus	Western Blot 1:400	dianova, Kat.Nr. MS-719-P1
β -Aktin	anti- β -Actin Clone AC-15	Maus	Western Blot 1:5000	Sigma, Kat.Nr. A 441
CaB5	anti-CaB5	Kaninchen	IHC 1:500	Haeseleer et al. (2000)
Calbindin	anti-Calbindin	Kaninchen	IHC 1:2000	Swant, Kat.Nr. CB38
CNGA1	Pmc1D1	Maus	IHC 1:50 Western Blot 1:50	Cook et al.(1989)
CNGA2	anti-CNGA2	Kaninchen	IHC 1:200	alomone labs, Kat.Nr. APC-045
CNGA3	anti-CNGA3	Kaninchen	IHC 1:100-1:200 DY-547-gelabelt: 1:2000 Western-Blot: 1:500	Biel et al. (1999)
CNGA4	7B11	Maus	Western Blot 1:500	Developmental Hybridoma Bank (K.Zinn)
CNGB1	anti-CNGB1	Kaninchen	IHC 1:500 Western Blot 1:1000	diese Arbeit
CNGB3	anti-CNGB3	Kaninchen	IHC 1:100	Gerstner et al., unpublizierte Daten
GARP	PPc6N	Kaninchen	IHC 1:2000 Western Blot 1:4000	Colville et al. (1996)
GC-E	K286	Kaninchen	IHC 1:200	Yang et al. (1997)
GFAP	anti-GFAP clone G-A-5 Cy3 Conjugate	Maus	IHC 1:1000	Sigma, Kat.Nr. C9205
Go α	anti-Go α	Maus	IHC 1:1000	Chemicon, Kat.Nr. MAB3073
MWS-Opsin	anti-Opsin (Red/Green)	Kaninchen	IHC 1:500	Chemicon
PKC α	anti-PKC-Biotin	Maus	IHC 1:50	Leinco Technologies, Kat.Nr. P108
Rhodopsin Biotin-labelled Mouse-Mab	Rhodopsin Ab-1 (Clone RET-P1)	Maus	IHC 1:100	Dunn Labortechnik, Kat.Nr. MS-1233-P0

SWS-Opsin	anti-Opsin (Blue)	Kaninchen	IHC 1:500	Chemicon
Synaptophysin	anti-Synaptophysin Clone SVP38	Maus	IHC 1:200	Sigma, Kat.Nr. S5768

5.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Anti Spezies	Aus Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Quelle
Alexa 546 anti-rabbit IgG (H+L), highly cross-adsorbed	Kaninchen	Ziege	IHC 1:600 – 1:800	MoBiTec, Kat.Nr. A-11035
Alexa 594 anti-mouse IgG (H+L), highly cross-adsorbed	Maus	Ziege	IHC 1:400	MoBiTec, Kat.Nr. A-11032
FITC donkey anti-rabbit IgG (H+L), AffiniPure	Kaninchen	Esel	IHC:200	Dianova, Kat.Nr. 711-095-152
anti-rabbit IgG, biotinylated antibody	Kaninchen	Ziege	IHC 1:200	Vektor, aus Vectastain®-Kit Kat.Nr. PK4001
POD anti-rabbit	Kaninchen	Esel	Western Blot 1:2000	Amersham Pharmacia, Kat.Nr. NA 934
POD-anti-mouse	Maus	Esel	Western Blot 1:2000	Amersham Pharmacia, Kat.Nr. NA NA 931

IX. Literaturverzeichnis

1 Zitierte Veröffentlichungen

- Ardell, M. D., Bedsole, D. L., Schoborg, R. V. und Pittler, S. J. (2000). "Genomic organization of the human rod photoreceptor cGMP-gated cation channel beta-subunit gene." *Gene* 245(2): 311-8.
- Bareil, C., Hamel, C. P., Delague, V., Arnaud, B., Demaille, J. und Claustres, M. (2001). "Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the beta-subunit of the rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa." *Hum Genet* 108(4): 328-34.
- Biel, M., Altenhofen, W., Hullin, R., Ludwig, J., Freichel, M., Flockerzi, V., Dascal, N., Kaupp, U. B. und Hofmann, F. (1993). "Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-gated channel from rabbit aorta." *FEBS Lett* 329(1-2): 134-8.
- Biel, M., Seeliger, M., Pfeifer, A., Kohler, K., Gerstner, A., Ludwig, A., Jaissle, G., Fauser, S., Zrenner, E. und Hofmann, F. (1999). "Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13): 7553-7.
- Biel, M., Zong, X., Distler, M., Bosse, E., Klugbauer, N., Murakami, M., Flockerzi, V. und Hofmann, F. (1994). "Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 3505-9.
- Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A. und Hofmann, F. (1996). "Molecular cloning and expression of the Modulatory subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel." *J Biol Chem* 271(11): 6349-55.
- Blanks, J. C. und Johnson, L. V. (1984). "Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25(5): 546-57.
- Bönigk, W., Bradley, J., Müller, F., Sesti, F., Boekhoff, I., Ronnett, G. V., Kaupp, U. B. und Frings, S. (1999). "The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits." *J Neurosci* 19(13): 5332-47.
- Bowes, C., Li, T., Danciger, M., Baxter, L. C., Applebury, M. L. und Farber, D. B. (1990). "Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase." *Nature* 347(6294): 677-80.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Bradley, J., Bönigk, W., Yau, K. W. und Frings, S. (2004). "Calmodulin permanently associates with rat olfactory CNG channels under native conditions." *Nat Neurosci* 7(7): 705-10.
- Bradley, J., Frings, S., Yau, K. W. und Reed, R. (2001). "Nomenclature for ion channel subunits." *Science* 294(5549): 2095-6.
- Bradley, J., Li, J., Davidson, N., Lester, H. A. und Zinn, K. (1994). "Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: a subunit that confers increased sensitivity to cAMP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(19): 8890-4.
- Bradley, J., Reuter, D. und Frings, S. (2001). "Facilitation of calmodulin-mediated odor adaptation by cAMP-gated channel subunits." *Science* 294(5549): 2176-8.
- Bradley, J., Zhang, Y., Bakin, R., Lester, H. A., Ronnett, G. V. und Zinn, K. (1997). "Functional expression of the heteromeric "olfactory" cyclic nucleotide-gated channel in the hippocampus: a potential effector of synaptic plasticity in brain neurons." *J Neurosci* 17(6): 1993-2005.

- Brunet, L. J., Gold, G. H. und Ngai, J. (1996). "General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel." *Neuron* 17(4): 681-93.
- Buck, L. und Axel, R. (1991). "A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition." *Cell* 65(1): 175-87.
- Chader, G. J. (2002). "Animal models in research on retinal degenerations: past progress and future hope." *Vision Res* 42(4): 393-9.
- Chan, S. L. und Mattson, M. P. (1999). "Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death." *J Neurosci Res* 58(1): 167-90.
- Chang, B., Hawes, N. L., Hurd, R. E., Davisson, M. T., Nusinowitz, S. und Heckenlively, J. R. (2002). "Retinal degeneration mutants in the mouse." *Vision Res* 42(4): 517-25.
- Chang, G. Q., Hao, Y. und Wong, F. (1993). "Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice." *Neuron* 11(4): 595-605.
- Cheah, S. S. und Behringer, R. R. (2000). "Gene-targeting strategies." *Methods Mol Biol* 136: 455-63.
- Chen, T. Y., Peng, Y. W., Dhallan, R. S., Ahamed, B., Reed, R. R. und Yau, K. W. (1993). "A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods." *Nature* 362(6422): 764-7.
- Claes, E., Seeliger, M., Michalakakis, S., Biel, M., Humphries, P. und Haverkamp, S. (2004). "Morphological characterization of the retina of the CNGA3(-/-)Rho(-/-) mutant mouse lacking functional cones and rods." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(6): 2039-48.
- Colville, C. A. und Molday, R. S. (1996). "Primary structure and expression of the human beta-subunit and related proteins of the rod photoreceptor cGMP-gated channel." *J Biol Chem* 271(51): 32968-74.
- Cook, N. J., Molday, L. L., Reid, D., Kaupp, U. B. und Molday, R. S. (1989). "The cGMP-gated channel of bovine rod photoreceptors is localized exclusively in the plasma membrane." *J Biol Chem* 264(12): 6996-9.
- de Raad, S., Szczeny, P. J., Munz, K. und Reme, C. E. (1996). "Light damage in the rat retina: glial fibrillary acidic protein accumulates in Müller cells in correlation with photoreceptor damage." *Ophthalmic Res* 28(2): 99-107.
- Dhallan, R. S., Macke, J. P., Eddy, R. L., Shows, T. B., Reed, R. R., Yau, K. W. und Nathans, J. (1992). "Human rod photoreceptor cGMP-gated channel: amino acid sequence, gene structure, and functional expression." *J Neurosci* 12(8): 3248-56.
- Dhallan, R. S., Yau, K. W., Schrader, K. A. und Reed, R. R. (1990). "Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons." *Nature* 347(6289): 184-7.
- Drescher, M. J., Barretto, R. L., Chaturvedi, D., Beisel, K. W., Hatfield, J. S., Khan, K. M. und Drescher, D. G. (2002). "Expression of subunits for the cAMP-sensitive 'olfactory' cyclic nucleotide-gated ion channel in the cochlea: implications for signal transduction." *Brain Res Mol Brain Res* 98(1-2): 1-14.
- Dryja, T. P., Finn, J. T., Peng, Y. W., McGee, T. L., Berson, E. L. und Yau, K. W. (1995). "Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(22): 10177-81.
- Dzeja, C., Hagen, V., Kaupp, U. B. und Frings, S. (1999). "Ca²⁺ permeation in cyclic nucleotide-gated channels." *Embo J* 18(1): 131-44.
- Fain, G. L. und Lisman, J. E. (1993). "Photoreceptor degeneration in vitamin A deprivation and retinitis pigmentosa: the equivalent light hypothesis." *Exp Eye Res* 57(3): 335-40.
- Fariss, R. N., Li, Z. Y. und Milam, A. H. (2000). "Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa." *Am J Ophthalmol* 129(2): 215-23.

- Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S. und Lyubarsky, A. L. (1985). "Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment." *Nature* 313(6000): 310-3.
- Fülle, H. J., Vassar, R., Foster, D. C., Yang, R. B., Axel, R. und Garbers, D. L. (1995). "A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8): 3571-5.
- Gerstner, A., Zong, X., Hofmann, F. und Biel, M. (2000). "Molecular cloning and functional characterization of a new modulatory cyclic nucleotide-gated channel subunit from mouse retina." *J Neurosci* 20(4): 1324-32.
- Haeseleer, F., Sokal, I., Verlinde, C. L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Pronin, A. N., Benovic, J. L., Fariss, R. N. und Palczewski, K. (2000). "Five members of a novel Ca(2+)-binding protein (CABP) subfamily with similarity to calmodulin." *J Biol Chem* 275(2): 1247-60.
- Hamilton, D. L. und Abremski, K. (1984). "Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites." *J Mol Biol* 178(2): 481-6.
- Haverkamp, S., Ghosh, K. K., Hirano, A. A. und Wässle, H. (2003). "Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina." *J Comp Neurol* 455(4): 463-76.
- Haverkamp, S. und Wässle, H. (2000). "Immunocytochemical analysis of the mouse retina." *J Comp Neurol* 424(1): 1-23.
- Hsu, Y. T. und Molday, R. S. (1994). "Interaction of calmodulin with the cyclic GMP-gated channel of rod photoreceptor cells. Modulation of activity, affinity purification, and localization." *J Biol Chem* 269(47): 29765-70.
- Jaissle, G. B., May, C. A., Reinhard, J., Kohler, K., Fauser, S., Lutjen-Drecoll, E., Zrenner, E. und Seeliger, M. W. (2001). "Evaluation of the rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42(2): 506-13.
- Juilfs, D. M., Fülle, H. J., Zhao, A. Z., Houslay, M. D., Garbers, D. L. und Beavo, J. A. (1997). "A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7): 3388-95.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. und Jessell, T. M. (2000). "Principles of neuronal science", McGraw-Hill.
- Kaneko, H., Putzier, I., Frings, S., Kaupp, U. B. und Gensch, T. (2004). "Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons." *J Neurosci* 24(36): 7931-8.
- Kaupp, U. B., Hanke, W., Simmoteit, R. und Luhning, H. (1988). "Electrical and biochemical properties of the cGMP-gated cation channel from rod photoreceptors." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53 Pt 1: 407-15.
- Kaupp, U. B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N. J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T. und Numa, S. (1989). "Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel." *Nature* 342(6251): 762-6.
- Kelliher, K. R., Ziesmann, J., Munger, S. D., Reed, R. R. und Zufall, F. (2003). "Importance of the CNGA4 channel gene for odor discrimination and adaptation in behaving mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 4299-304.
- Kingston, P. A., Zufall, F. und Barnstable, C. J. (1996). "Rat hippocampal neurons express genes for both rod retinal and olfactory cyclic nucleotide-gated channels: novel targets for cAMP/cGMP function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(19): 10440-5.
- Koch, K. W., Duda, T. und Sharma, R. K. (2002). "Photoreceptor specific guanylate cyclases in vertebrate phototransduction." *Mol Cell Biochem* 230(1-2): 97-106.
- Kohl, S., Baumann, B., Broghammer, M., Jagle, H., Sieving, P., Kellner, U., Spegal, R., Anastasi, M., Zrenner, E., Sharpe, L. T. und Wissinger, B. (2000). "Mutations in the

- CNGB3 gene encoding the beta-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated channel are responsible for achromatopsia (ACHM3) linked to chromosome 8q21." *Hum Mol Genet* 9(14): 2107-16.
- Körschen, H. G., Beyermann, M., Müller, F., Heck, M., Vantler, M., Koch, K. W., Kellner, R., Wolfrum, U., Bode, C., Hofmann, K. P. und Kaupp, U. B. (1999). "Interaction of glutamic-acid-rich proteins with the cGMP signalling pathway in rod photoreceptors." *Nature* 400(6746): 761-6.
- Körschen, H. G., Illing, M., Seifert, R., Sesti, F., Williams, A., Gotzes, S., Colville, C., Müller, F., Dose, A., Godde, M., Molday, L., Kaupp, U. B. und Molday, R. S. (1995). "A 240 kDa protein represents the complete beta subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor." *Neuron* 15(3): 627-36.
- Kurahashi, T. und Menini, A. (1997). "Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell." *Nature* 385(6618): 725-9.
- Kwan, K. M. (2002). "Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts." *Genesis* 32(2): 49-62.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(259): 680-5.
- Lavrovsky, Y., Song, C. S., Chatterjee, B. und Roy, A. K. (1998). "A rapid and reliable PCR-based assay for gene transmission and sex determination in newborn transgenic mice." *Transgenic Res* 7(4): 319-20.
- Leskov, I. B., Klenchin, V. A., Handy, J. W., Whitlock, G. G., Govardovskii, V. I., Bownds, M. D., Lamb, T. D., Pugh, E. N., Jr. und Arshavsky, V. Y. (2000). "The gain of rod phototransduction: reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements." *Neuron* 27(3): 525-37.
- Leveillard, T., Mohand-Said, S., Lorentz, O., Hicks, D., Fintz, A. C., Clerin, E., Simonutti, M., Forster, V., Cavusoglu, N., Chalmel, F., Dolle, P., Poch, O., Lambrou, G. und Sahel, J. A. (2004). "Identification and characterization of rod-derived cone viability factor." *Nat Genet* 36(7): 755-9.
- Li, Z. Y., Kljavin, I. J. und Milam, A. H. (1995). "Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa." *J Neurosci* 15(8): 5429-38.
- Liu, D. T., Tibbs, G. R. und Siegelbaum, S. A. (1996). "Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function." *Neuron* 16(5): 983-90.
- Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D. und Kaupp, U. B. (1990). "Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium." *FEBS Lett* 270(1-2): 24-9.
- Ma, J., Norton, J. C., Allen, A. C., Burns, J. B., Hasel, K. W., Burns, J. L., Sutcliffe, J. G. und Travis, G. H. (1995). "Retinal degeneration slow (rds) in mouse results from simple insertion of a t haplotype-specific element into protein-coding exon II." *Genomics* 28(2): 212-9.
- Mallouk, N., Ildefonse, M., Pages, F., Ragno, M. und Bennett, N. (2002). "Basis for intracellular retention of a human mutant of the retinal rod channel alpha subunit." *J Membr Biol* 185(2): 129-36.
- Mao, Z., Bonni, A., Xia, F., Nadal-Vicens, M. und Greenberg, M. E. (1999). "Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2." *Science* 286(5440): 785-90.
- Menini, A. (1999). "Calcium signalling and regulation in olfactory neurons." *Curr Opin Neurobiol* 9(4): 419-26.
- Metzger, D. und Feil, R. (1999). "Engineering the mouse genome by site-specific recombination." *Curr Opin Biotechnol* 10(5): 470-6.

- Meyer, M. R., Angele, A., Kremmer, E., Kaupp, U. B. und Muller, F. (2000). "A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19): 10595-600.
- Meyer, M. R., Angele, A., Kremmer, E., Kaupp, U. B. und Müller, F. (2000). "A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19): 10595-600.
- Michalakis, S. (2003). "Untersuchungen zur Funktion und pathophysiologischen Relevanz Zyklonukleotid-aktivierter Kationenkanäle im ZNS und der Retina anhand CNGA3-defizienter Mäuse." *Dissertation im Fach Pharmakologie für Naturwissenschaften, Fakultät Chemie und Pharmazie der LMU München.*
- Milam, A. H., Li, Z. Y. und Fariss, R. N. (1998). "Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa." *Prog Retin Eye Res* 17(2): 175-205.
- Misaka, T., Kusakabe, Y., Emori, Y., Gono, T., Arai, S. und Abe, K. (1997). "Taste buds have a cyclic nucleotide-activated channel, CNGgust." *J Biol Chem* 272(36): 22623-9.
- Molday, R. S. und Molday, L. L. (1998). "Molecular properties of the cGMP-gated channel of rod photoreceptors." *Vision Res* 38(10): 1315-23.
- Mombaerts, P. (1999). "Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors." *Science* 286(5440): 707-11.
- Mombaerts, P. (2001). "How smell develops." *Nat Neurosci* 4 Suppl: 1192-8.
- Müller, U. (1999). "Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis." *Mech Dev* 82(1-2): 3-21.
- Nagy, A. (2000). "Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring." *Genesis* 26(2): 99-109.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K. und Behringer, R. (2003). "Manipulating the Mouse Embryo". New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nakamura, T. und Gold, G. H. (1987). "A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia." *Nature* 325(6103): 442-4.
- Nathans, J. (1992). "Rhodopsin: structure, function, and genetics." *Biochemistry* 31(21): 4923-31.
- Newman, E. und Reichenbach, A. (1996). "The Muller cell: a functional element of the retina." *Trends Neurosci* 19(8): 307-12.
- Nufer, O. und Hauri, H. P. (2003). "ER export: call 14-3-3." *Curr Biol* 13(10): R391-3.
- Ogilvie, J. M., Tenkova, T., Lett, J. M., Speck, J., Landgraf, M. und Silverman, M. S. (1997). "Age-related distribution of cones and ON-bipolar cells in the rd mouse retina." *Curr Eye Res* 16(3): 244-51.
- Ohyama, T., Hackos, D. H., Frings, S., Hagen, V., Kaupp, U. B. und Korenbrot, J. I. (2000). "Fraction of the dark current carried by Ca(2+) through cGMP-gated ion channels of intact rod and cone photoreceptors." *J Gen Physiol* 116(6): 735-54.
- Peng, C., Rich, E. D. und Varnum, M. D. (2004). "Subunit configuration of heteromeric cone cyclic nucleotide-gated channels." *Neuron* 42(3): 401-10.
- Phelan, J. K. und Bok, D. (2000). "A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes." *Mol Vis* 6: 116-24.
- Poetsch, A., Molday, L. L. und Molday, R. S. (2001). "The cGMP-gated channel and related glutamic acid-rich proteins interact with peripherin-2 at the rim region of rod photoreceptor disc membranes." *J Biol Chem* 276(51): 48009-16.
- Pomerantz, D. (2004). "Psychology of Perception". Rice University, Spring.
- Pugh, E. N., Jr., Nikonov, S. und Lamb, T. D. (1999). "Molecular mechanisms of vertebrate photoreceptor light adaptation." *Curr Opin Neurobiol* 9(4): 410-8.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U. A., Muller, W., Roes, J. und Schwenk, F. (1996). "Conditional gene targeting." *J Clin Invest* 98(3): 600-3.

- Risser, J. M. und Slotnick, B. M. (1987). "Nipple attachment and survival in neonatal olfactory bulbectomized rats." *Physiol Behav* 40(4): 545-9.
- Ruiz, M. L., London, B. und Nadal-Ginard, B. (1996). "Cloning and characterization of an olfactory cyclic nucleotide-gated channel expressed in mouse heart." *J Mol Cell Cardiol* 28(7): 1453-61.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Santos, A., Humayun, M. S., de Juan, E., Jr., Greenburg, R. J., Marsh, M. J., Klock, I. B. und Milam, A. H. (1997). "Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric analysis." *Arch Ophthalmol* 115(4): 511-5.
- Santy, L. C. und Guidotti, G. (1997). "Expression of a single gene produces both forms of skeletal muscle cyclic nucleotide-gated channels." *Am J Physiol* 273(6 Pt 1): E1140-8.
- Sanyal, S., De Ruiter, A. und Hawkins, R. K. (1980). "Development and degeneration of retina in rds mutant mice: light microscopy." *J Comp Neurol* 194(1): 193-207.
- Sarthy, P. V. und Fu, M. (1989). "Transcriptional activation of an intermediate filament protein gene in mice with retinal dystrophy." *DNA* 8(6): 437-46.
- Sautter, A., Biel, M. und Hofmann, F. (1997). "Molecular cloning of cyclic nucleotide-gated cation channel subunits from rat pineal gland." *Brain Res Mol Brain Res* 48(1): 171-5.
- Sautter, A., Zong, X., Hofmann, F. und Biel, M. (1998). "An isoform of the rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel beta subunit expressed in olfactory neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4696-701.
- Seeliger, M. W., Grimm, C., Stahlberg, F., Friedburg, C., Jaissle, G., Zrenner, E., Guo, H., Reme, C. E., Humphries, P., Hofmann, F., Biel, M., Fariss, R. N., Redmond, T. M. und Wenzel, A. (2001). "New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis." *Nat Genet* 29(1): 70-4.
- Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S., Wagner, L., Shenmen, C. M., Schuler, G. D., Altschul, S. F., Zeeberg, B., Buetow, K. H., Schaefer, C. F., Bhat, N. K., Hopkins, R. F., et al. (2002). "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26): 16899-903.
- Strettoi, E. und Pignatelli, V. (2000). "Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 11020-5.
- Strettoi, E., Porciatti, V., Falsini, B., Pignatelli, V. und Rossi, C. (2002). "Morphological and functional abnormalities in the inner retina of the rd/rd mouse." *J Neurosci* 22(13): 5492-504.
- Strijbos, P. J., Pratt, G. D., Khan, S., Charles, I. G. und Garthwaite, J. (1999). "Molecular characterization and in situ localization of a full-length cyclic nucleotide-gated channel in rat brain." *Eur J Neurosci* 11(12): 4463-7.
- Sundin, O. H., Yang, J. M., Li, Y., Zhu, D., Hurd, J. N., Mitchell, T. N., Silva, E. D. und Maumenee, I. H. (2000). "Genetic basis of total colourblindness among the Pingelapese islanders." *Nat Genet* 25(3): 289-93.
- Teasdale, R. D. und Jackson, M. R. (1996). "Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus." *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 27-54.
- Travis, G. H. (1998). "Mechanisms of cell death in the inherited retinal degenerations." *Am J Hum Genet* 62(3): 503-8.
- Trudeau, M. C. und Zagotta, W. N. (2002). "An intersubunit interaction regulates trafficking of rod cyclic nucleotide-gated channels and is disrupted in an inherited form of blindness." *Neuron* 34(2): 197-207.

- van Soest, S., Westerveld, A., de Jong, P. T., Bleeker-Wagemakers, E. M. und Bergen, A. A. (1999). "Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view." *Surv Ophthalmol* 43(4): 321-34.
- Wässle, H. und Boycott, B. B. (1991). "Functional architecture of the mammalian retina." *Physiol Rev* 71(2): 447-80.
- Weitz, D., Ficek, N., Kremmer, E., Bauer, P. J. und Kaupp, U. B. (2002). "Subunit stoichiometry of the CNG channel of rod photoreceptors." *Neuron* 36(5): 881-9.
- Weitz, D., Zoche, M., Müller, F., Beyermann, M., Körschen, H. G., Kaupp, U. B. und Koch, K. W. (1998). "Calmodulin controls the rod photoreceptor CNG channel through an unconventional binding site in the N-terminus of the beta-subunit." *Embo J* 17(8): 2273-84.
- Wiesner, B., Weiner, J., Middendorff, R., Hagen, V., Kaupp, U. B. und Weyand, I. (1998). "Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm." *J Cell Biol* 142(2): 473-84.
- Wong, F. (1997). "Investigating retinitis pigmentosa: a laboratory scientist's perspective." *Progress in Retinal and Eye Research* 16(3): 353-373.
- Yang, R. B. und Garbers, D. L. (1997). "Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers." *J Biol Chem* 272(21): 13738-42.
- Young, R. W. (1984). "Cell death during differentiation of the retina in the mouse." *J Comp Neurol* 229(3): 362-73.
- Zagotta, W. N., Olivier, N. B., Black, K. D., Young, E. C., Olson, R. und Gouaux, E. (2003). "Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels." *Nature* 425(6954): 200-5.
- Zhang, X. und Firestein, S. (2002). "The olfactory receptor gene superfamily of the mouse." *Nat Neurosci* 5(2): 124-33.
- Zheng, J., Trudeau, M. C. und Zagotta, W. N. (2002). "Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit." *Neuron* 36(5): 891-6.
- Zheng, J. und Zagotta, W. N. (2004). "Stoichiometry and assembly of olfactory cyclic nucleotide-gated channels." *Neuron* 42(3): 411-21.
- Zhong, H., Molday, L. L., Molday, R. S. und Yau, K. W. (2002). "The heteromeric cyclic nucleotide-gated channel adopts a 3A:1B stoichiometry." *Nature* 420(6912): 193-8.
- Zufall, F. und Leinders-Zufall, T. (2000). "The cellular and molecular basis of odor adaptation." *Chem Senses* 25(4): 473-81.

2 Eigene Veröffentlichungen

- Hüttl, S., Michalakis, S., Seeliger, M., Luo, D.-G., Acar, N., Geiger, H., Hudl, K., Mader, R., Haverkamp, S., Moser, M., Pfeifer, A., Gerstner, A., Yau, K. W. und Biel, M. (2005). "Impaired Channel Targeting and Retinal Degeneration in Mice lacking the Cyclic Nucleotide-Gated Channel Subunit CNGB1." *J Neurosci* 25(1): 130-138.

Lebenslauf

Name	Sabine Ulrike Hüttl
Geburtstag	05.09.1973
Geburtsort	München
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1980 – 1984	Grundschule Eichenau
1984 – 1993	Rhabanus-Maurus-Gymnasium St. Ottilien

Studium

1994 – 1996	Grundstudium Pharmazie an der LMU München
September 1996	1. Staatsexamen Pharmazie
1996 – 1999	Hauptstudium Pharmazie an der FU Berlin
April 1999	2. Staatsexamen Pharmazie
Mai 1999 – Oktober 1999	Pharmaziepraktikum in der Römer-Apotheke, Türkenfeld
Nov. 1999 – April 2000	Pharmaziepraktikum bei Klinge Pharma, München
Mai 2000	3. Staatsexamen Pharmazie
Juni 2000	Approbation zur Apothekerin

Wissenschaftliche Tätigkeit

Januar 2001 – Nov. 2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl Pharmakologie für Naturwissenschaften, Department Pharmazie, LMU München, unter Prof. Dr. Martin Biel
-------------------------	--

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Martin Biel möchte ich mich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Betreuung der Arbeit und die stets offene Tür für Probleme und Fragen herzlich bedanken.

Ein herzliches Dankeschön an Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar für die Übernahme des Koreferats.

Frau Dr. Andrea Gerstner danke ich für die fundierte Einarbeitung in die Molekularbiologie.

Herrn PD Dr. Markus Moser und Herrn Prof. Dr. Alexander Pfeifer danke ich für die Blastozysteninjektion und Herrn PD Dr. Mathias Seeliger für die ERG-Messungen. Weiter danke ich Frau Dr. Silke Haverkamp für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie Heidi Geiger für die Herstellung der Präparate. Frau Dr. Mintova danke ich für die Hilfe bei der Rasterelektronenmikroskopie.

Stelios und Robert, ohne Euch wäre diese Arbeit nie fertig geworden – danke für Eure tatkräftige Hilfe wann immer ich sie gebraucht habe, für Euer Mitdenken und Ratschläge, für Euer Dasein, wenn ich mal wieder am Verzweifeln war und für eine Freundschaft, die jeden Laborstress erträglich macht!

Ein herzliches Dankeschön auch an Christian für die geduldige Diskussion und Beantwortung aller pharmakologischen und medizinischen Fragen und viel gemeinsamen Spaß im Labor und außerhalb!

Vielen Dank an meine Nachfolgerin Heidi für die gute Zusammenarbeit und die reibungslose Übergabe von Mäusen und Experimenten, für die viele gute Laune mit der Du manch stressigen Tag aufgelockert hast und für all die lustigen Momente inner- und außerhalb des Labors.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls Pharmakologie für Naturwissenschaften, die durch ihre Freundschaft und Kollegialität ein so gutes Arbeitsklima möglich machen, allen voran bei Ludwig und Andi.

Ein herzliches Dankeschön gebührt unserem HiWi Benny für seine tatkräftige Unterstützung in den letzten Monaten und die gute Laune die er mit in unseren Laboralltag gebracht hat.

Danke auch an Daniela Scholz und Berit Noak für die vielen kleinen Handgriffe in der Laborarbeit, mit denen Ihr mich unterstützt habt.

Für das Korrekturlesen der Arbeit haben Stelios, Heidi, Christian, Robert und Flori noch ein Extra-Dankeschön verdient!

Daß mir die Praktikumsbetreuung immer Spaß gemacht hat, lag nicht nur an den netten Studenten, sondern vor allem an den netten Kollegen, die ich an meiner Seite hatte: Danke an Andi im Physiologiepraktikum sowie Dr. Jürgen Krauß und die Chemie-Doktoranden aus dem 1. Semester-Praktikum!

Ein großer Dank zuletzt an meine Familie und meine Freunde, die immer für mich da waren, und vor allem an meinen Flori, der das alles so liebevoll mit mir durchgestanden hat!