

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



**In vivo und in vitro-Untersuchungen zur Calmodulin-
abhängigen Regulation des spannungsabhängigen
Calcium-Kanals $Ca_v1.2$**

Peter Lenhardt
aus Bad Neustadt an der Saale

2007

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 28. November 2007

Peter Lenhardt

Dissertation eingereicht am 26.10.2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel
 2. Gutachter: Prof. Dr. Franz Hofmann
- Mündliche Prüfung am 27.11.2007

Meinen Eltern

1. EINLEITUNG	1
1.1 Bedeutung und Arten von Calciumkanälen.....	1
1.2 Expression und Funktion von Ca _v 1.2	1
1.3 Aufbau des Ca _v 1.2-Kanalkomplexes	3
1.4 Calciumabhängige Fazilitierung und Inaktivierung von Ca _v 1.2	5
1.5 Zielsetzung	7
2 MATERIAL UND METHODEN	8
2.1 Molekularbiologische Methoden	8
2.1.1 Verwendete Bakterien und Plasmide.....	8
2.1.2 Verwendete Bakterien-Kulturmedien	10
2.1.3 Transformation von Bakterien.....	10
2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA	12
2.1.5 Gewinnung und Reinigung von DNA.....	13
2.1.6 Primerdesign	14
2.1.7 Amplifikation mittels PCR.....	16
2.1.8 Auftrennung und Isolierung von DNA.....	18
2.1.9 Sequenzierung.....	19
2.1.10 Klonierung von PCR-Fragmenten.....	19
2.1.11 Southern-Blot.....	21
2.1.12 Cre-vermittelte Rekombination <i>in vitro</i>	26
2.2 Erzeugung genetisch veränderter Mäuse	26
2.2.1 Gewinnung muriner Feederzellen	26
2.2.2 Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen	27
2.2.3 Homologe Rekombination nach Elektroporation (1. Targeting).....	30
2.2.4 Cre-vermittelte Rekombination (2. Targeting).....	33
2.2.5 Blastozysten-Injektion und Reimplantation.....	34
2.2.6 Identifizierung und Verpaaren von Chimären.....	37
2.2.7 Überprüfung der Keimbahngängigkeit – Zucht von Knock-in-Mäusen.....	37
2.3 Analyse der Knock-in-Tiere	38
2.3.1 Genotypisierung mittels PCR.....	38
2.3.2 Genotypisierung mittels Southernblot.....	38
2.3.3 Proteinpräparation aus verschiedenen Organen.....	38
2.4 Biochemische Methoden	39
2.4.1 Puffer und Lösungen für Membranpräparation und Coimmunpräzipitation.....	39
2.4.2 Membranpräparation	40
2.4.3 Proteinbestimmung mit dem BCA-Test.....	40
2.4.4 Coimmunpräzipitation	41
2.4.5 Radioaktive Phosphorylierung	41
2.4.6 Westernblot.....	42
2.4.7 HEK-Zell-Kultur	47
2.4.8 Erzeugung von GST-Fusionsproteinen.....	49

2.5	Elektrophysiologie	52
3	ERGEBNISSE	53
3.1	EQ-Maus	53
3.1.1	Konstruktion des Targeting-Vektors	53
3.1.2	Etablierung der Screeningmethoden	58
3.1.3	Erstes und zweites Targeting.....	63
3.1.4	Blastozysteninjektion	66
3.2	CaMKII-abhängige Phosphorylierung von Ca_v1.2	67
3.2.1	Elektrophysiologische Untersuchungen	67
3.2.2	Biochemische Analysen.....	68
4	DISKUSSION	75
4.1	Die Rolle von CaMKII bei der Fazilitierung von Ca_v1.2	75
4.2	Generierung der EQ-Maus.....	77
4.3	Ausblick.....	80
4.3.1	CaMKII-abhängige Fazilitierung	80
4.3.2	Zucht und Untersuchung homozygoter EQ-Mäuse.....	80
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	ANHANG	84
6.1	Verwendete Oligonukleotide	84
6.2	Verwendete Enzyme.....	85
6.3	Verwendete Antikörper	86
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	87
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	89
8.1	Zitierte Veröffentlichungen.....	89
8.2	Eigene Veröffentlichungen	95

1. Einleitung

1.1 Bedeutung und Arten von Calciumkanälen

Das Leben, wie wir es kennen, wäre ohne Calciumionen nicht vorstellbar. Ob als Baustoff in der pflanzlichen Zellwand oder im tierischen Skelett, oder als Signalmolekül bei lebenswichtigen Prozessen wie der Muskelkontraktion oder der Immunabwehr - Calcium spielt überall in Anatomie und Physiologie eine essenzielle Rolle. Andererseits kann ein zuviel an Calcium die Gesundheit bedrohen. So führt beispielsweise eine Hypercalciämie zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen. Auf pharmakologischer Ebene nutzt man den Zusammenhang zwischen der Erniedrigung des intrazellulären Calciumspiegels und der verminderten Kontraktion von glatten Muskelzellen: Calciumkanalblocker gehören heute zum Standard der medikamentösen Behandlung von Bluthochdruckpatienten. Es leuchtet also ein, dass der Calciumgehalt im Cytoplasma und auch extrazellulär aufs Genaueste reguliert werden muss.

Die wichtigste Rolle beim Einstrom von Calciumionen in Zellen spielen Calciumkanäle. Man unterscheidet durch Liganden gesteuerte Calciumkanäle (z.B. NMDA-Rezeptoren) und spannungsabhängige Calciumkanäle. Diese unterteilen sich nach ihren elektrophysiologischen Eigenschaften in die sogenannten T-Typ-Kanäle (von „transient“, also vorübergehend; Perez-Reyes *et al.* 1998a,b; Cribbs *et al.* 1998; Klugbauer *et al.* 1999a), die schon bei niedrigen Membranpotentialen aktiviert werden, und in die verschiedenen Typen von Calciumkanälen (L-, N-, P-/Q- und R-Typ; Novycky *et al.* 1985; Llinas *et al.* 1989; Randall and Tsien 1995), die sich erst bei positiveren Potentialen öffnen. Sie werden im Englischen als „high-voltage activated channels“, oder kurz: HVA, bezeichnet. Die Familie der L-Typ-Calciumkanäle besteht aus vier Subtypen ($Ca_v1.1$ bis $Ca_v1.4$; Tanabe *et al.* 1987; Soldatov 1994; Hui *et al.* 1991; Snutch *et al.* 1991; Strom *et al.* 1998; Williams *et al.* 1992), die durch Substanzen vom Dihydropyridin-, vom Thiazepin- und vom Phenylalkylamintyp inhibiert werden können. In dieser Arbeit sollte der spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanal $Ca_v1.2$ untersucht werden.

1.2 Expression und Funktion von $Ca_v1.2$

Der spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanal $Ca_v1.2$ wird unter anderem in Herz- (Bohn *et al.* 2000; Xu *et al.* 2003) und glatten Muskelzellen (Moosmang *et al.* 2003), im ZNS (Hell *et al.* 1993), sowie in den Langerhansschen Inselzellen der Bauchspeicheldrüse exprimiert (Schulla *et al.* 2003). Er kann pharmakologisch durch Calciumkanal-Antagonisten vom Dihydropyridin-, vom Alkylamin- und vom Thiazepintyp blockiert und durch Calciumkanal-Agonisten aktiviert werden (Schuster *et al.* 1996; Hockerman *et al.* 1997; Striessnig 1999).

Zu einem Einstrom von Calciumionen (I_{Ca}) durch $Ca_v1.2$ kommt es nach Depolarisation der Zellmembran. Physiologisch öffnet sich der Kanal bei etwa -40 mV, und I_{Ca} erreicht sein Maximum bei etwa $+10$ mV (Fox *et al.* 1987). Dieser Bereich ist jedoch stark durch die verschiedenen Untereinheiten des $Ca_v1.2$ -Kanalkomplexes beeinflussbar (siehe 1.3).

In Herzmuskelzellen führen die einströmenden Calciumionen unter anderem zu einer Öffnung von Ryanodinrezeptoren (RyR2) des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR), und Calcium strömt aus intrazellulären Speichern ins Cytosol. Diesen Vorgang nennt man calciuminduzierte Calciumfreisetzung (Calcium-induced Calcium release, CICR; Fabiato 1983). Eine wichtige Voraussetzung dafür ist der geringe Abstand zwischen $Ca_v1.2$ und Ryanodinrezeptor an den Kreuzungspunkten von transversalem tubulärem System und SR (10 bis 20 nm (Korzick 2003)). Dort herrscht nach Calciumeinstrom durch den geöffneten L-Typ-Kanal eine sehr hohe subzelluläre Calciumkonzentration, die ausreicht, den RyR2 zu öffnen. Das durch den geöffneten RyR2 freigesetzte Calcium aus dem SR hat eine Erhöhung der freien cytosolischen Calciumkonzentration (Ca_i) von etwa 100 nM auf über 1 μ M zur Folge und führt im Herzen zur Bindung von Calcium an Troponin C. Dieses ändert seine Konformation und gibt die Myosinbindungsstellen am Actin frei. Letztendlich kommt es zur Kontraktion des Muskels. Dieser Vorgang findet im Herzen während der sogenannten „Plateau-Phase“ der Systole statt. Am Ende dieser Phase wird Calcium hauptsächlich durch die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und den sarkolemmalen Na^+/Ca^{2+} -Austauscher aus dem Cytosol entfernt. Außerdem wird Calcium durch die sogenannten „langsamen“ Systeme der sarkolemmalen Ca^{2+} -ATPase und des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniports aus der Zelle transportiert. Ca_i sinkt ab und der Muskel kann relaxiert werden (Bers 2002).

In der Gefäßmuskulatur spielt $Ca_v1.2$ eine wichtige Aufgabe bei der Regulation des Blutdrucks. In „SMAKO-Mäusen“ (Abkürzung: Smooth muscle-specific alpha 1.2 calcium channel knockout. Moosmang *et al.* 2003) wird $Ca_v1.2$ mit Hilfe der durch Tamoxifeninjektion induzierbaren Cre-Rekombinase genetisch aus dem glatten Muskel entfernt. Dabei sinkt der arterielle Tonus stark ab. Der Einfluss von gefäßkontrahierenden Substanzen wie Noradrenalin oder Angiotensin 2 ist vermindert und der myogene Tonus als Reaktion auf intravasale Druckerhöhung („Bayliss-Effekt“) fehlt vollkommen (Moosmang *et al.* 2003).

In der glatten Muskulatur der Blase ist $Ca_v1.2$ verantwortlich für die cholinerge Kontraktion des Detrusors (Wegener *et al.* 2004). SMAKO-Mäuse zeigen außerdem schwere Beeinträchtigungen der Motilität des Gastrointestinaltrakts (Wegener *et al.* 2006).

$Ca_v1.2$ in den insulinproduzierenden Langerhansschen Inselzellen der Bauchspeicheldrüse wird durch das Ansteigen des Blutglucosespiegels aktiviert (Barg *et al.* 2001). Nach Einstrom von Calciumionen kommt es zur Exozytose von Insulin-enthaltenden Vesikeln. Dies führt zu einer

Einleitung

ersten, kurzen Phase der Insulinausschüttung, die bei B-Zell-spezifischer genetischer Entfernung von $Ca_v1.2$ nicht mehr vorhanden ist (Schulla *et al.* 2003).

Der Calciumeinstrom durch $Ca_v1.2$ im zentralen Nervensystem (ZNS) spielt eine wichtige Rolle bei räumlichen Lernprozessen und der Ausbildung der NMDA-Rezeptor-unabhängigen Form der Langzeitpotenzierung (LTP; Cooke and Bliss 2006). Wird $Ca_v1.2$ genetisch in Hippocampus und Cortex deletiert, so ist auf elektrophysiologischer Ebene die LTP und auf biochemischer Ebene die neuronale Aktivierung des ERK-Signalweges stark reduziert. In Verhaltensversuchen weisen diese Mäuse Defizite in ihrem räumlichen Lernverhalten auf (Moosmang *et al.* 2005a).

Die wichtige Rolle des $Ca_v1.2$ im Herz der Maus erkennt man daran, dass Mäuseembryonen bei kompletter genetischer Deletion des Kanals vor dem Tag 14,5 p.c. sterben (Seisenberger *et al.* 2000). Bei Zebrafischen ist I_{Ca} durch $Ca_v1.2$ essentiell für die vollständige Entwicklung der beiden Herzkammern (Rottbauer *et al.* 2001).

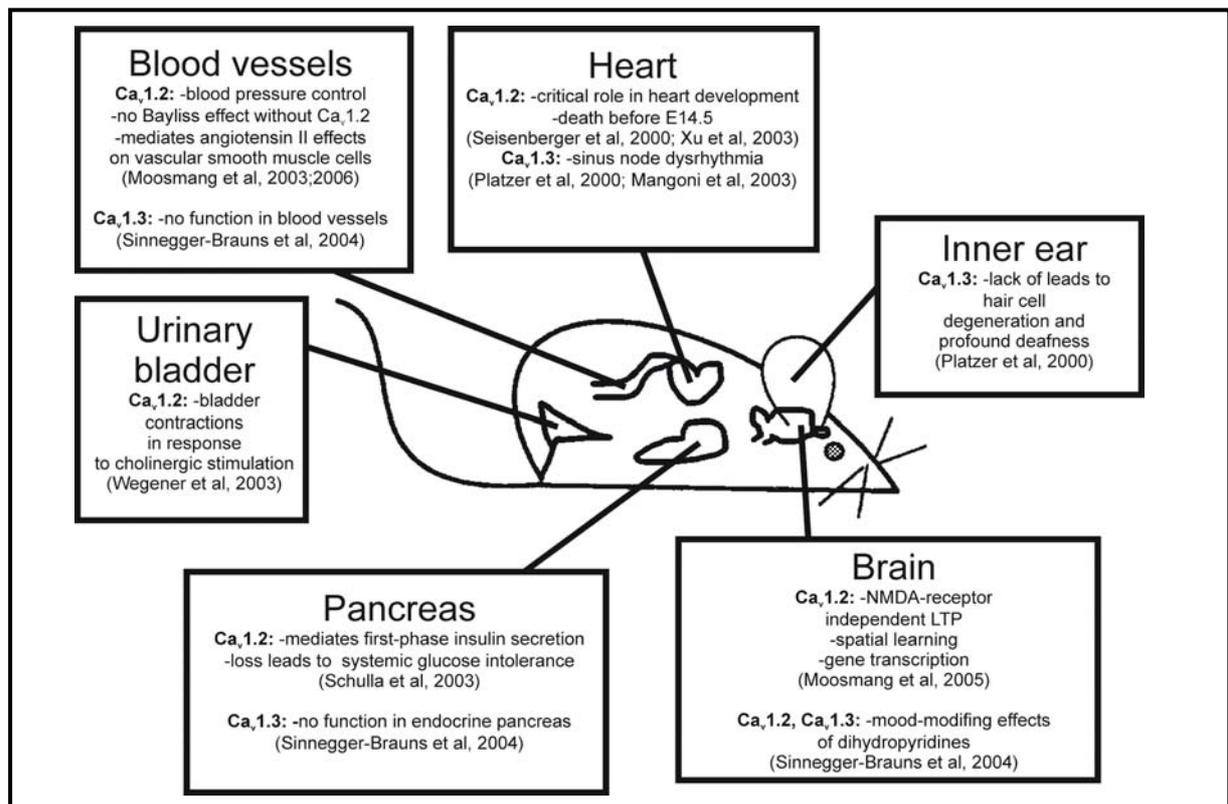


Abbildung 1 - Expression und Funktion von $Ca_v1.2$ in der Maus (aus Moosmang *et al.* 2005b).

1.3 Aufbau des $Ca_v1.2$ -Kanalkomplexes

Der $Ca_v1.2$ -Kanalkomplex ist aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut: Die 190 – 250 kDa große α_1 -Untereinheit bildet die Membranpore und enthält vier transmembranäre Domänen aus je sechs Helices, den Spannungssensor, die Angriffspunkte für die Calciumkanal-Antagonisten

Einleitung

sowie mehrere ins Cytoplasma hineinreichende Bereiche, die wiederum Bindungs- und Interaktionsstellen für andere Proteine darstellen (Hofmann *et al.* 1999).

Die 55 – 75 kDa große β -Untereinheit ist intrazellulär mit der α -Untereinheit verknüpft und verantwortlich für das Membrantargeting des Kanals. Durch sie wird der Kanal bereits bei negativeren Membranpotentialen aktiviert, die Inaktivierung wird vermindert und die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals wird erhöht (Dolphin 2003).

Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit wird als ein Gen exprimiert und erst posttranslational in zwei, durch eine Disulfidbrücke miteinander verbundene Proteine getrennt. Sie durchspannt die Membran und moduliert den Calciumeinstrom durch den Kanal in ähnlicher Weise aber weit geringerem Maße als die β -Untereinheit (Ellis *et al.* 1988; Klugbauer *et al.* 1999b).

Die genaue Funktion der acht verschiedenen transmembranären γ -Untereinheiten ist weitgehend unbekannt. Sie werden im gesamten Organismus, vor allem aber in Skelettmuskel (γ_1, γ_6) und als regulatorische Untereinheiten von AMPA-Rezeptoren im ZNS ($\gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$ und γ_8) exprimiert. Sie haben in Coexpressions-Systemen nur geringe Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des L-Typ-Calciumkanals $Ca_v1.2$ (Chen *et al.* 2007).

Einen ausführlichen Überblick bieten die Reviews von Catterall (Catterall 2000) und Hofmann (Hofmann *et al.* 1999).

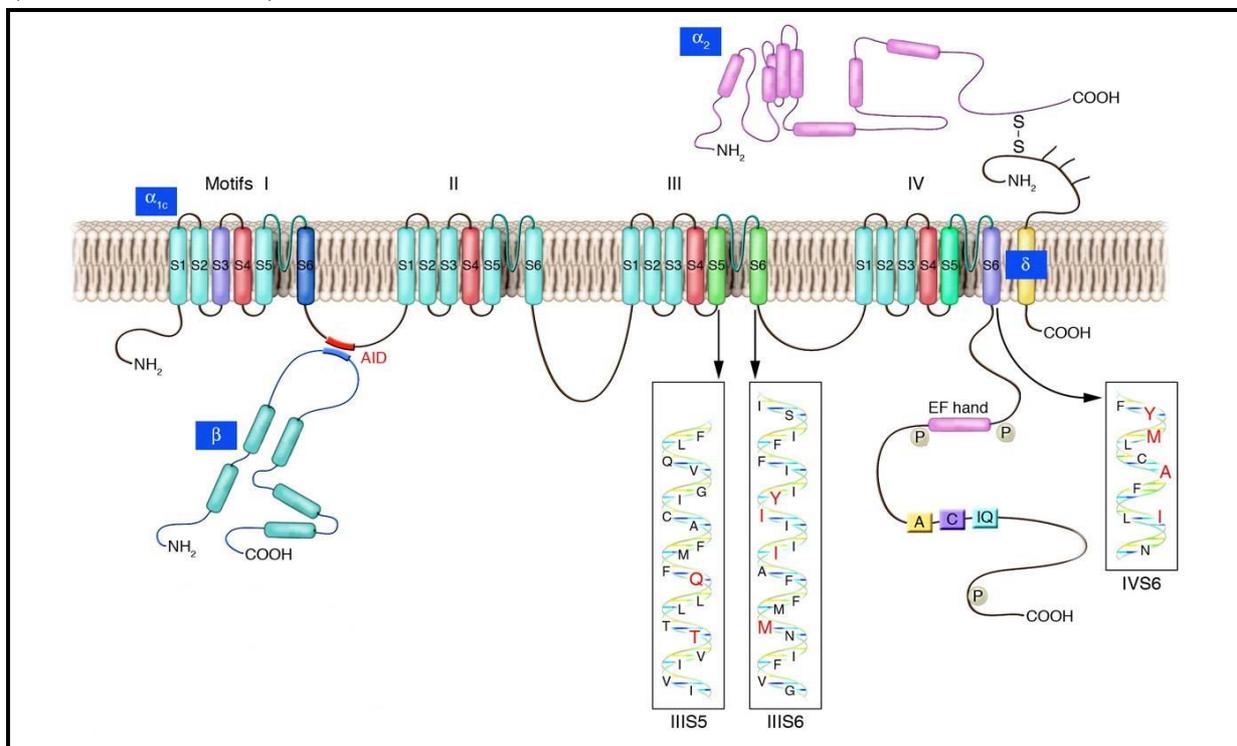


Abbildung 2 - Aufbau von Cav1.2 (modifiziert nach Bodi *et al.* 2005). Gezeigt sind die transmembranären Helices IIIS5, IIIS6 und IVS6 der α_{1c} -Untereinheit mit den spezifischen Bindungsstellen für Calciumkanalantagonisten (rot), die Interaktionsstelle mit der β -Untereinheit (AID), die Phosphorylierungsstellen für CaMKII und PKA im Carboxyterminus (P), sowie die Bindungsmotive A,C und IQ für Calmodulin.

1.4 Calciumabhängige Fazilitierung und Inaktivierung von $Ca_v1.2$

Der L-Typ-Calciumkanal $Ca_v1.2$ zeichnet sich dadurch aus, dass er nach der spannungsabhängigen Aktivierung sowohl durch einströmende Calciumionen, als auch spannungsabhängig positiv und negativ reguliert werden kann. So beobachtet man bei elektrophysiologischer Untersuchung an Herzmuskelzellen nach Stimulation einen raschen Calciumeinstrom, der ebenso rasch wieder nachlässt (Brehm and Eckert 1978; Lee *et al.* 1985). Dieser Effekt ist in calciumfreier und bariumphaltiger Lösung nicht zu beobachten, stellt also eine calciumabhängige Inaktivierung des Kanals dar.

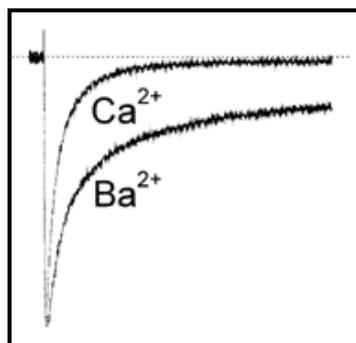


Abbildung 3 – Calcium- und spannungsabhängige Inaktivierung von $Ca_v1.2$ in Herzmuskelzellen (aus Findlay 2002). Die Abbildung zeigt den Verlauf von I_{Ca} und I_{Ba} nach Depolarisation der Zellmembran von -80 mV (Haltepotential) auf 0 mV (Testpuls). Beide Spuren wurden normalisiert.

Wird der Kanal dagegen wiederholt stimuliert (z.B. mit einer Frequenz von $0,1$ Hz), beobachtet man eine Vergrößerung oder auch Fazilitierung des Calciumeinstromes in die Herzmuskelzelle. Auch dieser Effekt ist nur in calciumhaltiger Lösung vorhanden. (Noble and Shimoni 1981a). Eine Fazilitierung kann auch durch die Applikation eines einzigen, starken Präpulses erzielt werden (Noble and Shimoni 1981b).

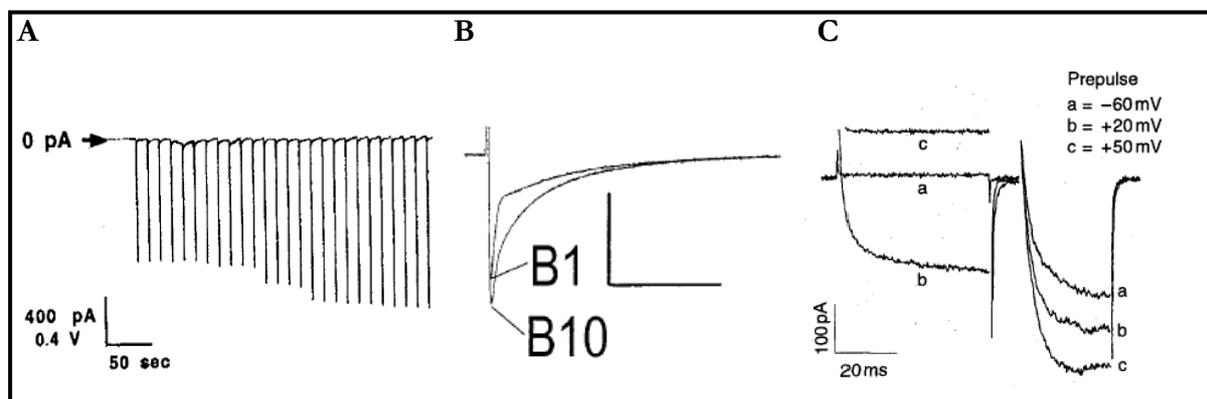


Abbildung 4 – Fazilitierung von $Ca_v1.2$ (aus Anderson 2001) in ventrikulären Herzmuskelzellen. (A) Vergrößerung von I_{Ca} durch wiederholte Stimulation bei $0,1$ Hz. (B) Vergleich des Calciumeinstroms nach der ersten (B1) und der zehnten Stimulation (B10). (C) I_{Ca} wird durch Applikation eines positiven Präpulses fazilitiert (aus Dolphin 1996).

Einleitung

Die Beteiligung von Calmodulin, einem calciumbindenden, mit dem Ca_v1.2-Carboxyterminus assoziierten Protein an Inaktivierung und Fazilitierung ist gut belegt (Halling *et al.* 2005). Es ist jedoch unklar, ob für die Fazilitierung die durch Calmodulin aktivierte Kinase, Subtyp 2 (CaMKII), verantwortlich ist (Artalejo *et al.* 1990) und, falls ja, an welchem Motiv sie den Kanal phosphoryliert (Jahn *et al.* 1988).

Das lange, carboxyterminale Ende der Ca_v1.2- α -Untereinheit spielt zweifellos eine entscheidende Rolle. Dort finden sich 1. ein Calciumionen-bindendes EF-Hand-Motiv, 2. die beiden Serine 1512 und 1570, putative Phosphorylierungsstellen für die CaMKII und 3. die Calmodulin-bindenden Motive A, C und IQ (Pitt *et al.* 2001; Kim *et al.* 2004). Das IQ-Motiv wurde im Jahre 1999 von Zühlke *et al.* punktmuiert, und der so veränderte Kanalkomplex in Oozyten exprimiert und elektrophysiologisch untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Mutation des Isoleucins („I“) zu Glutamat („E“) sowohl calciumabhängige Inaktivierung wie auch Fazilitierung ausschaltete (Zuhlke *et al.* 1999).

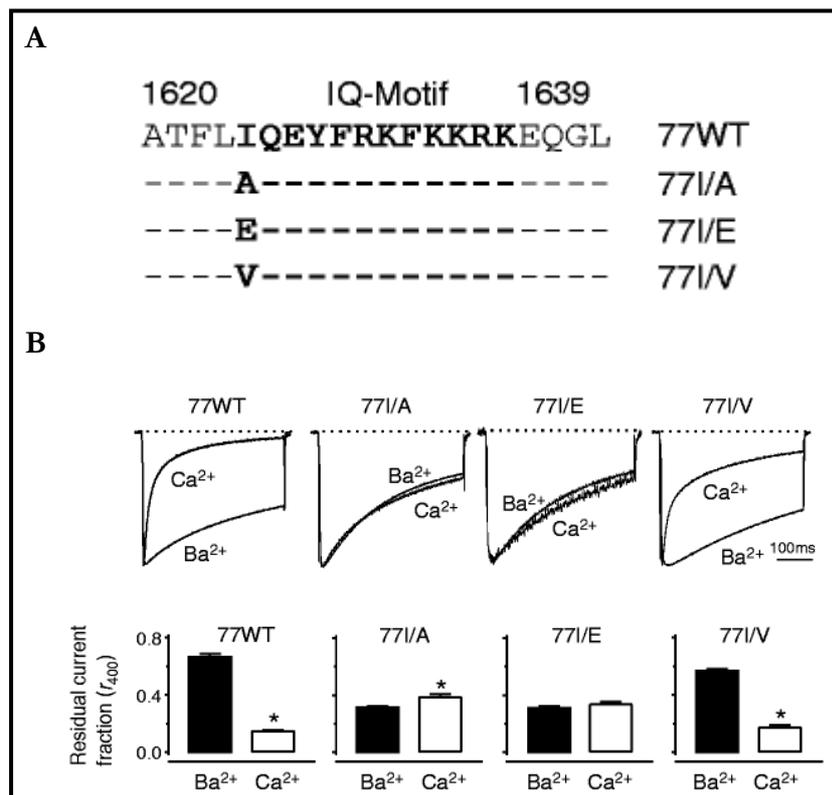


Abbildung 5 - Punktmutationen im IQ-Motif beeinflussen die calciumabhängige Inaktivierung von I_{Ca} durch Cav1.2 (aus Zühlke *et al.* 1999). (A) Aminosäuresequenz des unmutierten (77WT) sowie des mutierten IQ-Motivs (77I/A, 77I/E, 77I/V). (B) Normalisierte Ströme durch den Cav1.2 im whole-cell Modus (oben), Auswertung des Reststromes nach 400 ms Testpuls (unten). Wird Isoleucin (I) zu Alanin (A) oder Glutamat (E) mutiert, findet keine calciumabhängige Inaktivierung mehr statt.

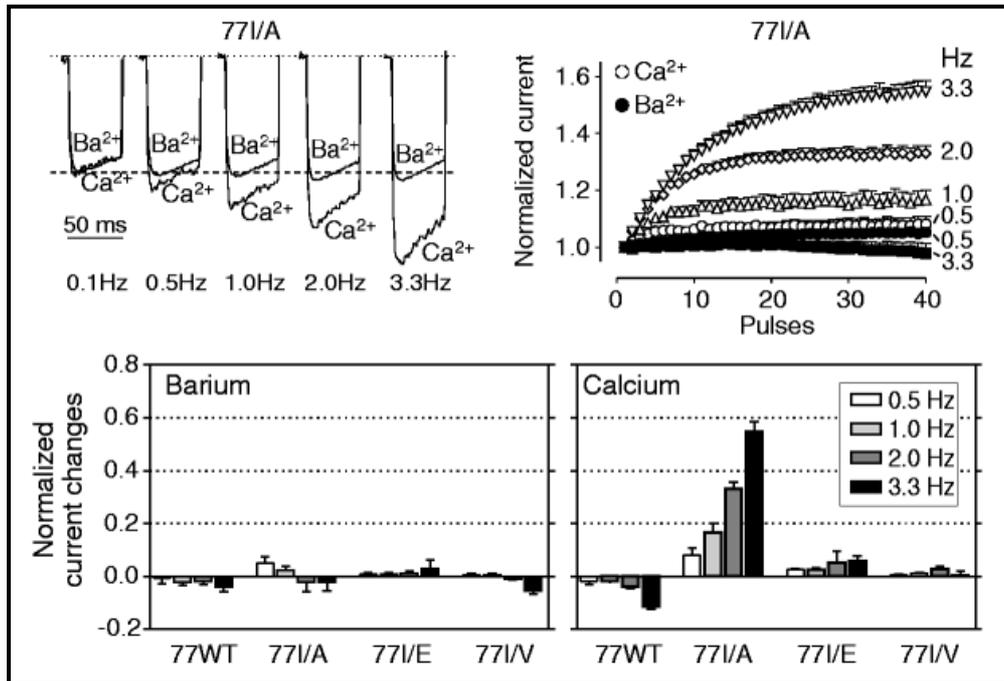


Abbildung 6 - Punktmutationen im IQ-Motiv beeinflussen die calciumabhängige Fazilitierung von I_{Ca} durch $Ca_v1.2$ (aus Zuhlke *et al.* 1999). Im Wildtyp wird die Fazilitierung durch die gleichzeitige Inaktivierung maskiert. Durch Punktmutation zu Alanin wird dieser Effekt aufgehoben. Bei der I-zu-E-Mutante findet dagegen keine Fazilitierung statt.

Nachfolgende Arbeiten bestätigten diese Erkenntnisse (Erickson *et al.* 2003; Zhou *et al.* 2005; Hudmon *et al.* 2005), bis heute konnte die Rolle des IQ-Motivs *in vivo* jedoch noch nicht charakterisiert werden.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, einen wichtigen Regulationsmechanismus des L-Typ-Calciumkanals, Subtyp 1.2, aufzuklären. Dazu sollte eine Maus generiert werden, die im IQ-Motiv des Carboxyterminus des Kanals eine Punktmutation („I zu E“) trägt. Weiterhin sollte an *in vitro*-Zellkultur-Experimenten die Bedeutung zweier Aminosäuren (S1512 und S1570) im Carboxy-Terminus des Kanals bei der Fazilitierung des Calciumeinstromes bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Verwendete Bakterien und Plasmide

Es wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene, #200249)

(*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacIqZ.M15 Tn10* (Tetr)])

XL1-Blue-Zellen tragen zur Selektion eine Tetracyclin-Resistenz und exprimieren weder Endonuclease noch Rekombinase, so dass transformierte Plasmide mit hoher Stabilität an die nächsten Bakteriengenerationen weitergegeben werden.

Escherichia coli BL21 (Amersham Biosciences, #27-1542)

(B, F⁻, *ompT*, *hsdS* (*rB*⁻, *mB*⁻), *gal*, *dcm*)

Dieser Stamm zeichnet sich durch das Fehlen einer endogenen Protease aus und ist so zur Expression von Fusionsproteinen geeignet (siehe 2.4.8).

Escherichia coli OneShot[®] INV110 Competent Cells (Invitrogen, #C7171-03)

(F⁺ {*traΔ36 proAB lacI^q lacZΔM15*} *rpsL* (Str^R) *thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) Δ(mcrC-mrr)102::Tn10* (Tet^R))

Da manche Restriktionsenzyme (z.B. ClaI) DNA nicht schneiden können, wenn sie an ihren Erkennungssequenzen *dam*- oder *dcm*-methyliert vorliegt, kommen diese Zellen zum Einsatz. Sie sind defizient für *dam*- und *dcm*-Methylierungen.

Als Plasmide kamen zum Einsatz:

pBluescript II KS+ (Stratagene, #212207)

Dieses Plasmid trägt einen Klonierungsabschnitt mit 21 Restriktionssequenzen, die sogenannte „multiple cloning site“ (MCS), sowie das Ampicillin-Resistenzgen, das zur Selektion eingesetzt werden kann. Es wurde in dieser Arbeit für alle Subklonierungsschritte des Targetingvektors verwendet.

pcDNA3 (Invitrogen, nicht mehr erhältlich)

Unter Kontrolle des CMV- (Cytomegalovirus-) Promotors exprimiert dieser Vektor die in seine MCS eingebaute cDNA. Er trägt ein Ampicillin- und ein Neomycin-Resistenz-Gen. In dieser Arbeit kam er zur Expression der teilweise mutierten Untereinheiten des Ca_v1.2-Kanalkomplexes zum Einsatz.

pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences, #27-4597-01)

Nach Induktion mit IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase) kommt es zur Expression der mit GST (Glutathion-S-Transferase) fusionierten cDNA, die in die MCS eingefügt wurde. Das Plasmid trägt ein Ampicillin-Resistenz-Gen. In dieser Arbeit wurde der Vektor für die GST-Fusionsproteine verwendet.

pBluescript lox-neo/tk-lox (nicht kommerziell erhältlich)

Ausgangspunkt für dieses Plasmid ist pBluescript II KS+, wobei hier eine Neomycinresistenz-/Thymidinkinase-Kassette in die MCS eingefügt ist, die upstream und downstream von einer loxP-Sequenz flankiert wird. In dieser Arbeit wurden die subklonierten Abschnitte (5'- und 3'-Arm) des Targetingvektors vor dem ES-Zell-Targeting in dieses Plasmid eingeführt.

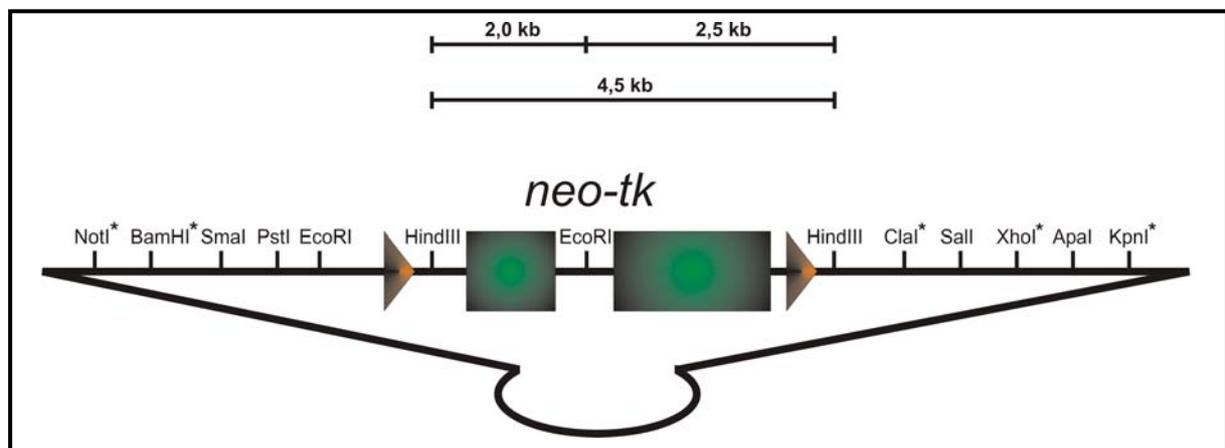


Abbildung 7 - pBluescript lox-neo / tk-lox. Die “unique restriction sites” (*) und die loxP-Sequenzen (Dreiecke) sind markiert.

pIC-Cre (Gu *et al.* 1993)

Unter Kontrolle des Herpes-Simplex-Virus- (HSV-) Promotors wird hier das Cre-Rekombinase-Gen abgelesen, das in die MCS von pMC1neo Poly A eingefügt wurde. Zudem ist ein Ampicillin-Resistenz-Gen auf dem Vektor vorhanden. Das Plasmid kam in dieser Arbeit für das 2. ES-Zell-Targeting zum Einsatz.

2.1.2 Verwendete Bakterien-Kulturmedien

Luria Bertani (LB)-Medium:

Tryptone (Firma Oxid, #LP0042)	10 g
Yeast Extract (Oxid, #LP0021)	5 g
NaCl	5 g
Wasser	ad 1000 ml

LB(+)-Medium erhält man durch Zugabe von 1 g D-(+)-Glucose nach dem Autoklavieren. Zur Herstellung von Agarplatten werden vor dem Autoklavieren 15 g Agar (Oxid, #LP0011) hinzugefügt und die Lösung vor dem Erkalten in 55cm²-Petrischalen (Firma Sarstedt, # 82 1472 001) ausgegossen.

2x YTA-Medium (pH 7,0):

Tryptone	16 g
Yeast Extract	10 g
NaCl	5 g
Wasser	ad 1000 ml
Nach dem Autoklavieren werden 2 ml Ampicillin (50 mg/ml) hinzugefügt.	

SOC(-)-Medium:

Tryptone	2 g
Yeast Extract	0,5 g
5 M NaCl	200 µl
1 M KCl	250 µl

SOC(+)-Medium:

SOC(-)-Medium	4,8 ml
1 M MgCl ₂	50 µl
1 M MgSO ₄	50 µl
20 % Glucose	100 µl

2.1.3 Transformation von Bakterien

2.1.3.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Um Fremd-DNA in Bakterien einzuführen, muss zunächst die Zellwand passiert werden. Eine Möglichkeit hierzu ist die Präzipitation der DNA mit MgCl₂. Dazu werden *E.coli* XL1-Blue über Nacht bei 37°C auf einer Tetracyclin-LB-Agar-Platte inkubiert, eine Kolonie gepickt und eine weitere Nacht bei 37°C und 225 rpm in 7 ml LB-Medium inkubiert. Man setzt dabei einen Schüttelinkubator (Certomat[®], Firma B. Braun) ein. Am darauf folgenden Morgen entnimmt man dieser Vorkultur 1 ml und impft damit 100 ml LB-Medium an. Man lässt die Hauptkultur bei 37°C und 225 rpm solange wachsen, bis eine optische Dichte von 0,3 bei 600 nm erreicht ist. Die Suspension wird 10 Minuten bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand

verworfen. Man resuspendiert das Pellet in 15 ml Transformation-Storage-Solution (TSS) und pipettiert je 450 µl in im Ethanol/Trockeneis-Bad vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße.

TSS (pH 6,5):	
40 % PEG 3350	50 ml
1 M MgCl ₂	10 ml
DMSO	10 ml
LB-Medium	ad 200 ml

2.1.3.2 Herstellung elektrokompenter Zellen

Einen anderen Weg zur Bakterien-Transformation bietet die Elektroporation. Um elektrokompente Zellen zu erzeugen, werden *E.coli* XL1-Blue über Nacht bei 37°C auf einer Tetracyclin-(12µg/ml)-LB-Agar-Platte inkubiert, eine Kolonie gepickt und eine weitere Nacht bei 37°C und 225 rpm in 7 ml LB-Medium inkubiert. 500 ml LB-Medium werden mit 1 ml aus der Vorkultur angeimpft, und man lässt die Kultur bei 37°C und 225 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,5 – 0,7 bei 600 nm wachsen. Im Anschluss wird die Suspension auf zwei Zentrifugenbecher aufgeteilt, 30 Minuten auf Eis gestellt und 15 Minuten bei 4800 rpm und 4°C zentrifugiert. Man verwirft den Überstand und wäscht jedes Pellet mit 230 ml kaltem Wasser. Nachdem die Zellen wieder bei 4800 rpm für 15 Minuten abzentrifugiert wurden, wiederholt man den Waschschrift mit je 130 ml Wasser. Ein weiteres Mal wird bei 4800 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und das Zentrifugat nun mit je 2 ml kaltem 10 % Glycerin resuspendiert. 50 µl-Aliquots werden im Ethanol/Trockeneis-Bad schockgefroren.

2.1.3.3 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Ein 450 µl-Aliquot chemisch kompetenter Zellen wird auf Eis aufgetaut. Man mischt vorsichtig durch langsames Auf-und-Ab-Pipettieren 400 µl dieses Aliquots mit der zu transformierenden DNA-Lösung und inkubiert dieses Gemisch 30 Minuten im Eisbad. Danach gibt man 2,6 ml LB(+)-Medium zu und schüttelt den Ansatz bei 37°C und 175 rpm im Schüttelinkubator. Nach 60 Minuten werden 150 µl auf eine LB(+)-Agar-Platte mit Selektionsmarker ausplattiert („A-Platte“). Man zentrifugiert die restliche Suspension bei 3500 rpm und resuspendiert das Pellet in 150 µl LB(+)-Medium, um diese auf eine weitere LB(+)-Agar-Platte mit Selektionsmarker auszustreichen („B-Platte“). Beide Platten werden im Wärmeschrank über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.3.4 Transformation elektrokompeter Zellen

DNA, die mit der Elektroporation in Bakterien eingeführt werden soll, muss zunächst mit Ethanol präzipitiert werden. Man mischt dazu 20 µl DNA-Lösung mit 5 µl tRNA (1 µg/µl), 17 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 80 µl 100 % Ethanol. Die Mischung wird 30 Minuten bei 15000 rpm und RT zentrifugiert, das resultierende DNA-Pellet zweimal mit je 800 µl 70 % Ethanol gewaschen und nach Entfernung des Überstandes 5 Minuten bei 37°C im Heizblock getrocknet. Man löst das Pellet in 5 µl Wasser.

Elektrokompetente Zellen werden im Eisbad aufgetaut, mit der DNA-Lösung vorsichtig gemischt und für 1 Minute auf Eis inkubiert. Nachdem der Ansatz in eine Elektroporationsküvette überführt wurde, appliziert man mit dem GenePulser (Biorad; Geräteeinstellung: 25µF, 200 Ω) und dem Pulscontroller (Biorad; Geräteeinstellung 2,5 kV) den Elektroporations-Puls. Bei erfolgreichem Versuch zeigt das Gerät eine Zeitkonstante von 4,6 – 4,8 ms an. Sofort im Anschluss wird 1 ml SOC(+)-Medium zugegeben und 60 Minuten bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Wie im vorherigen Kapitel geschildert wird ein Abstrich auf zwei LB(+)-Agar-Platten („A- und B-Platte“) vorgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

2.1.4.1 Minipräp

Man pickt eine Bakterienkolonie von einer Agar-Platte und überführt die Bakterien in 7 ml LB(+)-Medium mit 14 µl Ampicillin (50 mg/ml). Nach Kultivierung bei 37°C und 225 rpm über Nacht nimmt einen kleinen Teil der Suspension zum Anfertigen einer Sicherungsplatte ab und zentrifugiert die restlichen Zellen mit 5000 rpm 10 Minuten. Das Pellet wird mit 250 µl Minipräparationspuffer 1 (MP 1) resuspendiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl MP 2 lysiert. Nach 5 Minuten gibt man zur Neutralisation des Gemisches 250 µl MP 3 hinzu und zentrifugiert nach 15minütiger Inkubation auf Eis bei 14000 rpm und 4°C für 15 Minuten ab. Der klare Überstand wird in ein neues 1,5 ml-Cap überführt und mit 525 µl 100 % Isopropanol versetzt. Man zentrifugiert erneut bei 14000 rpm und 4°C für 15 Minuten, wäscht das entstandene DNA-Präzipitat mit 700 µl 70 % Ethanol und zentrifugiert erneut bei gleichen Bedingungen für 5 Minuten. Das Pellet wird in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 20 µl Wasser gelöst.

Material und Methoden

MP 1 (pH 8,0):	MP 2:	MP 3 (pH 5,5):
Tris 6,06 g	NaOH 8 g	Kaliumacetat 294,5 g
EDTA (2 H ₂ O) 3,72 g	Wasser 800 ml	Wasser ad 1000 ml
Wasser ad 1000 ml	10 % SDS 100 ml	pH 5,5 mit Eisessig
Nach dem Autoklavieren werden 100 mg RNaseA hinzugefügt.	Wasser ad 1000 ml	einstellen.

2.1.4.2 Maxipräp

Das Isolieren von Plasmid-DNA in großem Maßstab nennt man Maxipräp. Dazu wird zunächst aus einer LB-Flüssigkultur der das Plasmid exprimierenden Bakterien am Abend 150 ml LB(+)-Medium mit 300 µl Ampicillin (50 mg/ml) angeimpft. Nach der Inkubation im 500 ml-Erlenmeyerkolben bei 37°C und 225 rpm über Nacht, entnimmt man ca. 500 µl, um einen Glycerol-Stock anzulegen, und zentrifugiert nun die Suspension bei 5000 rpm und 4°C für 10 Minuten. Für die weitere Aufreinigung wurde das Plasmid Maxi Kit der Firma Quiagen verwendet (#12162) und die Anweisungen des Herstellers unverändert übernommen.

2.1.5 Gewinnung und Reinigung von DNA

DNA liegt oft gemeinsam mit Proteinen in wässriger Lösung vor. Will man reine DNA gewinnen, führt man eine Phenol-Chloroform-Extraktion durch. Dabei rüttelt man gleiche Volumina an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25/24/1 (Firma Roth, # A 156.2) (organische Phase) und DNA/Protein-Lösung (wässrige Phase) mit dem Vortexer, zentrifugiert kurz bei hoher Umdrehungsgeschwindigkeit ab und überführt die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß. Die Interphase verbleibt im Gefäß mit der organischen Phase. Dieser Schritt kann zwei- bis dreimal wiederholt werden, um einen höheren Reinheitsgrad der DNA zu erhalten.

Die DNA kann nun mit Ethanol präzipitiert werden. Hierzu gibt man 5 M NaCl-Lösung oder 3 M NaAcetat-Lösung (je 1/10 des Volumens der DNA-Lösung) und 100 % Ethanol (2,5-faches Volumen der DNA-Lösung) zur DNA-Lösung, stellt das Gemisch 15 Minuten in den – 80°C-Schrank und zentrifugiert 15 Minuten bei 15000 rpm. Das DNA-Pellet wird mit 700 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nachdem man den Überstand abgenommen hat, wird das Zentrifugat in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

Die DNA-Konzentration kann mit dem Photometer (Absorption bei 260 nm) bestimmt werden, bei nichtzirkulärer DNA bietet es sich jedoch außerdem an, nach der Auftrennung auf einem Agarosegel die Konzentration mittels Vergleich mit einem definierten Größenstandard abzuschätzen, da sich hier zudem die korrekte Größe des DNA-Stückes kontrollieren lässt.

2.1.6 Primerdesign

2.1.6.1 Regeln für das Primerdesign

Als Primer bezeichnet man DNA-Stücke mit einer Länge von 18 – 30 Basenpaaren, die meist paarweise zur Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, siehe 2.1.6) verwendet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden bei der Firma MWG-Biotech bestellt. Beim Primerdesign müssen einige Regeln beachtet werden:

- Der Anteil der Nukleoside Guanosin und Cytosin sollte zwischen 40 und 60 % liegen.
- Es sollten nie vier gleiche Basen hintereinander liegen.
- Die Schmelztemperatur sollte zwischen 55 und 80°C liegen.
- Am 3'-Ende sollte sich ein Guanosin- oder ein Cytosin-Rest befinden.
- Der Primer sollte nur an einer spezifischen Struktur innerhalb der Ziel-DNA binden.
- Sekundärstrukturen innerhalb eines Primers (sogenannte Hairpin-Strukturen) sollten vermieden werden.
- Die beiden Primer eines Primerpaares sollten nicht untereinander hybridisieren können, vor allem nicht an ihren 3'-Enden, um Dimerbildung zu umgehen.

Beim Design der Primer wurde das Computerprogramm „DNA-Man 5.0“ (Firma Lynnon BioSoft) verwendet.

2.1.6.2 Einführen von Restriktionschnittstellen

Primer können dazu verwendet werden, Restriktionsschnittstellen in ein DNA-Fragment einzuführen. Dazu wird am 5'-Ende des mit der zu amplifizierenden DNA kompatiblen Primers die Restriktionssequenz und davon stromaufwärts ein sechs Basenpaar großer Platzhalter eingefügt. Dieser Primer kann also während des ersten Zyklusses an seinem 5'-Ende zwar nicht vollständig an die Ziel-DNA binden, eine Amplifikation findet aber trotzdem statt. Es resultiert ein Amplifikat, das an seinen Enden neue Restriktionsschnittstellen trägt.

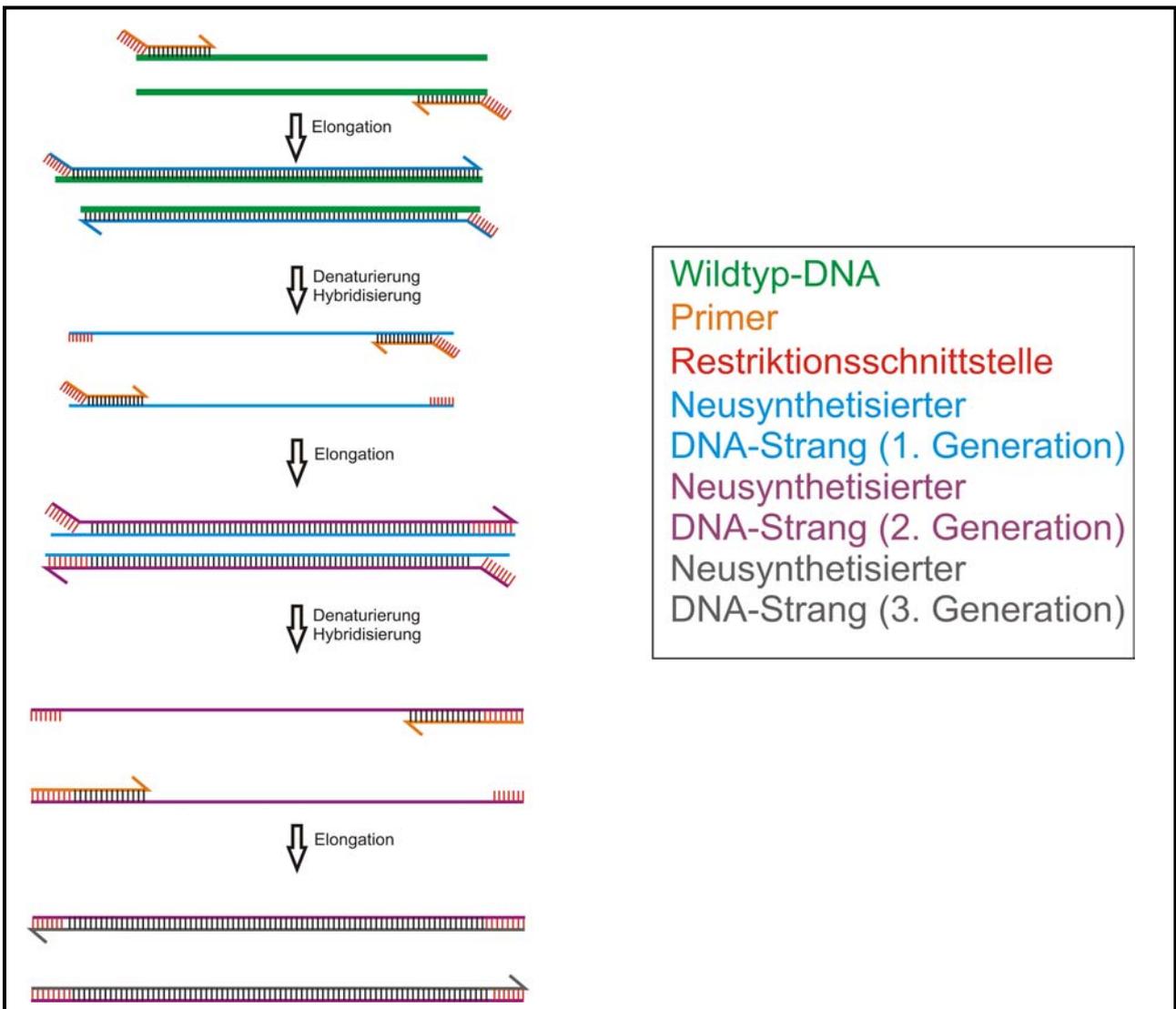


Abbildung 8 - Das Einföhren von Restriktionsschnittstellen durch die PCR-Technik.

2.1.6.3 Einföhren von Punktmutationen

Eine andere M6glichkeit, genetische Mutationen in ein DNA-Stück einzuföhren, ist die Overlap-PCR. Dabei entwirft man zwei zueinander komplementäre 25 – 35 bp lange Primer, die in ihrer Mitte die zu verändernden Basen tragen, sowie zwei Primer, die an den Enden der Ziel-DNA sitzen. Die beiden, sich überlappenden PCR-Produkte, die man in getrennten Ansätzen erhält, werden aufgereinigt und als Template für eine weitere PCR verwendet. Hier setzt man nochmals die äußeren Primer ein, so dass als Produkt das punktmutierte DNA-Stück resultiert.

Eine Variante der Overlap-PCR bietet die Firma Stratagene mit dem QuickChange®II Site-Directed Mutagenesis Kit (# 200523): Man benötigt hier nur die zwei punktmutierten Primer und amplifiziert den gesamten Vektor. Vor der Transfektion der Bakterien muss der unmutierte Ausgangsvektor aus dem Ansatz entfernt werden. Man macht sich hier eine Besonderheit des Restriktionsenzym DpnI zu nutze. Dieses ist nur dann aktiv, wenn die zu verdauende DNA methyliert vorliegt, wie beispielsweise der aus E. coli gewonnene Ausgangsvektor. Die

Amplifikate einer PCR tragen dagegen keine Methylgruppen. Inkubiert man also den PCR-Ansatz mit DpnI, wird nur das unmutierte Ausgangsplasmid verdaut. Zurück bleibt das punktmutierte Plasmid, das anschließend in Bakterienzellen transformiert werden kann.

Es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

2.1.7 Amplifikation mittels PCR

2.1.7.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, kleinste Mengen an DNA zu amplifizieren und Punktmutationen oder Restriktionsschnittstellen einzuführen. Man benötigt dazu die zu amplifizierende DNA, spezifische Primer, Desoxyribonukleotide und eine DNA-Polymerase. Dieses Enzym synthetisiert nach Bindung an einen DNA-Einzelstrang den komplementären Strang und zeichnet sich durch eine sehr hohe Hitzestabilität aus. Durch diese Besonderheit kann man den Reaktionsmix bis auf über 95°C erhitzen, der Temperatur also, bei der sich DNA-Doppelstränge trennen (auch: denaturieren), ohne das Enzym zu zerstören. Dies ermöglicht den Ablauf eines typischen, dreistufigen PCR-Programms mit Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Elongationsschritt. Bei der Denaturierung trennen sich die DNA-Doppelstränge, bei der Hybridisierung binden die Primer an ihre Zielsequenzen der DNA, und während der Elongation führt die DNA-Polymerase an das 3'-Ende des sich neu bildenden Stranges in semikonservativer Weise Desoxyribonukleotide ein.

<u>Standard-PCR-Programm</u>	
<u>taq-Polymerase (Firma Genscript, # 00007):</u>	
95°C	2 Minuten
95°C	30 Sekunden
$T_m - 5^\circ\text{C}$	30 Sekunden
72°C	1 Minute pro 1 kb
72°C	7 Minuten



x 29

T_m ist die Schmelztemperatur der Primer.

Dieses Standard-Programm kann je nach Anforderung der PCR abgewandelt werden, z.B. Erhöhung der Zyklenzahl, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen oder Verlängerung des ersten Denaturierungsschrittes bei schwer zu trennenden DNA-Edukten.

Eine andere Polymerase, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, ist der Expand High Fidelity ^{PLUS} Enzyme Blend der Firma Roche (# 3 300 242). Hier werden taq-Polymerase und ein weiteres Enzym mit 3'-5'-Exonucleaseaktivität oder Korrekturaktivität („*proof-reading*“), aber ohne Polymeraseaktivität gemischt, so dass fehlerhaft eingebaute Basen wieder entfernt werden. Die Wahrscheinlichkeit, eine unbeabsichtigte Punktmutation im Amplifikat zu generieren, sinkt so auf 1/6 der Fehlerrate der herkömmlichen taq-Polymerase (1/10⁵). Die PCR-Bedingungen wurden nach den Angaben des Herstellers gewählt.

2.1.7.2 Besonderheiten der PCR

Verlängerung der Elongationszeit: taq-Polymerase ist zwar hitzestabil, verliert aber bei hoher Zyklenzahl oder langen Elongationszeiten einen Teil ihrer Aktivität. Man kann diesen Verlust durch eine Verlängerung der Elongationszeit (z.B. 10 Sekunden pro Zyklus) teilweise ausgleichen.

Hot Start: Manche DNA-Templates sind aufgrund eines hohen GC-Anteils und einer damit verbundenen hohen Denaturierungstemperatur schwierig zu amplifizieren. Außerdem können Primer unter bestimmten Bedingungen schon bei niedrigen Temperaturen unspezifische Bindungen mit der DNA eingehen oder Primerdimere bilden, so dass viele Nebenbanden oder gar kein Amplifikat erzeugt werden. Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, besteht in der sogenannten *hot start* – Technik, bei der die Polymerase erst nach einem fünfminütigen Schritt bei 95°C zupipettiert wird. Bei dieser Temperatur liegen die beiden komplementären DNA-Stränge denaturiert vor, und die Primer binden erst beim Erreichen des ersten Hybridisierungsschrittes.

Touch Down: Besitzen Primer stark unterschiedliche Schmelztemperaturen, findet man oft keine passende Hybridisierungstemperatur. Außerdem kennt man bei Primern, die zur Einführung von Mutationen oder Schnittstellen (siehe 2.1.6.2 und 2.1.6.3) nicht komplett an die Ziel-DNA binden, nicht deren Bindungstemperatur an die DNA. Es bietet sich also an, anstelle einer einzigen Temperatur mehrere Schritte zu wählen, bei denen sie sukzessive um ein Grad Celcius gesenkt wird. So könnte man beispielsweise bei 70°C beginnen und innerhalb von zehn Zyklen bei 60°C ankommen. Man geht davon aus, dass in dieser Zeit genügend Amplifikate gebildet wurden, um anschließend bei einer definierten Hybridisierungstemperatur – im obigen Beispiel 60°C – mit der PCR fortzufahren.

2.1.8 Auftrennung und Isolierung von DNA

DNA-Fragmente aus PCR oder Restriktionsverdau werden über Agarose- oder PAGE-Gele aufgetrennt. Man wählt dabei die Konzentration der Agarose bzw. des Acrylamids je nach Größe des aufzutrennenden DNA-Fragments.

Bandengröße	Agarosekonzentration	Acrylamidkonzentration
0,8 bis 15 kb	0,8 %	-
0,5 bis 7 kb	1 %	-
0,1 bis 2 kb	2 %	-
0,03 bis 1 kb	-	12,6 %

SeaKem[®] LE-Agarose (Firma Biozym, # 840.004) wird im Erlenmeyerkolben mit TBE in der Mikrowelle aufgeköcht, auf 60°C abgekühlt, man gibt Ethidiumbromid zu und gießt das Gel in beliebiger Größe in eine Gelform mit Gelkamm. Acrylamid wird mit TBE gemischt und die Polymerisation mit TEMED (N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylen-Diamin) als Katalysator und APS (Ammoniumpersulfat) als Starter durchgeführt. PAGE-Gele werden erst nach dem Gellauf mit Ethidiumbromid inkubiert.

Man pipettiert die mit Auftragspuffer gemischten DNA-Probe in je eine der Taschen, trägt den Größenstandard (1 kb DNA ladder, Firma Invitrogen, # 15615-024) auf und legt Spannung an (kleines Agarose-Gel: etwa 120 V; großes Agarose-Gel: etwa 200 V; PAGE-Gel: bei 110 V einlaufen lassen, dann 290 V). Die Banden werden am UV-Illuminator mit einem Skalpell ausgeschnitten, in Dialyseschläuche überführt, diese mit TBE gefüllt und 90 Minuten bei 145 mA eluiert. Anschließend wird die Lösung aus dem Schlauch in ein Reaktionsgefäß pipettiert und zur Fällung der DNA wie unter 2.1.4 weiterverfahren.

10x TBE (Tris-Borat-EDTA):	
Tris-Base	540 g
Borsäure	275 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	200 ml
Wasser	ad 5000 ml

2.1.9 Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA wurde das Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosciences (#4336776) verwendet. Folgender Reaktionsansatz wurde gewählt:

Sequenzierreaktionsansatz:	
DNA (30 – 90 ng/μl)	1 μl
Primer (0,8 μM)	4 μl
Ready Reaction Mix	4 μl
Wasser	ad 20 μl

Für die Sequenzierreaktion in der PCR-Maschine wurde folgendes Protokoll gewählt:

Protokoll Sequenzierreaktion:	
95°C	5 Minuten
95°C	40 Sekunden
50°C	40 Sekunden
60°C	4 Minuten


 x 34; Ramp: 0,8°C/sec

Nach Abschluss der Reaktion wird die DNA gefällt (siehe 2.1.5), das Pellet in 20 μl Template Suppression Reagent (Firma Applied Biosciences, # 401674) gelöst, 5 Minuten bei 95°C im Heizblock denaturiert und nach Abkühlen im Abi Prism 310 Genetic Analyzer elektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet.

2.1.10 Klonierung von PCR-Fragmenten

Bei der PCR-Amplifikation von DNA werden, abhängig von verwendeter Polymerase, mit einer Wahrscheinlichkeit von $1,8 \times 10^{-5}$ bis $2,7 \times 10^{-6}$ fehlerhafte Punktmutationen im PCR-Produkt generiert. Dagegen kann ein DNA-Fragment nahezu fehlerfrei vervielfältigt werden, indem es in einen Vektor eingeführt oder auch „kloniert“ wird. Transfiziert man Bakterienzellen mit diesem Vektor (siehe 2.1.3) und isoliert die Vektor-DNA nach Vermehrung der Bakterien in Kulturmedium (siehe 2.1.4), kann man so beliebig große Mengen dieser DNA erhalten.

2.1.10.1 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme erkennen palindromische Basenabfolgen der DNA und zerschneiden an diesen Stellen beide Stränge. Dabei entstehen entweder „glatte Enden“ („blunt ends“) oder „klebrige Enden“ („sticky ends“) mit 3'- oder 5'-Überhängen. Macht der Hersteller (NEB) keine anderen Angaben, wird folgender Reaktionsansatz gewählt:

Protokoll Restriktionsverdau:		
DNA (1 µg/µl)	3 µl	
Puffer (10 x)	5 µl	
BSA (50 x)	1 µl	4 Stunden, 37°C
Enzym	1 µl	
Wasser	ad 50 µl	

2.1.10.2 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die nach einem Restriktionverdau zueinander komplementäre Enden tragen, können durch das Enzym Ligase miteinander verbunden werden. Verwendet wurden T4 DNA Ligase (Firma Promega, # M1801), der Quick Ligation™ Kit (Firma NEB, # M2200S) und der FastLink™ DNA Ligation Kit (Firma Epicentre, # LK11025). Die Anleitungen der Hersteller wurden unverändert übernommen.

2.1.10.3 Dephosphorylierung von Basenüberhängen

Um zu verhindern, dass die kompatiblen Enden eines Vektors nach einem Restriktionsverdau religieren, muss dessen 5'-Ende dephosphoryliert werden. Dazu wurden folgende Phosphatasen eingesetzt: Alkaline Phosphatase (Firma Boehringer Mannheim, # 713 023) und Antarctic Phosphatase (Firma NEB, # M0289G). Man pipettiert 1 µl der Alkaline Phosphatase in den Restriktionsansatz und inkubiert eine Stunde bei 37°C. Da die Antarctic Phosphatase zur Aktivierung Zinkionen benötigt, gibt man zusätzlich den 10x-Reaktionspuffer zum Restriktionsansatz zu. Allerdings beträgt hier die Inkubationszeit nur 15 Minuten bei 37°C.

Vor der Ligation muss die Phosphatase inaktiviert (Alk. P: 15 Minuten bei 75°C; Ant. P: 5 Minuten bei 65°C) oder durch Phenol-Chloroform-Extraktion oder Gelaufftrennung aus der Lösung entfernt werden.

2.1.11 Southern-Blot

Genetisch veränderte DNA nach dem 1. Targeting (siehe 2.2.3) wird mit dem Southernblot analysiert. Bei dieser Technik kann analysiert werden, ob der Targeting-Vektor durch homologe Rekombination spezifisch in die genomischen DNA integriert wurde. Dazu wird die DNA aus murinen embryonalen Stammzellen („ES-Zellen“) gewonnen, einem Restriktionsverdau unterzogen und nach der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente auf eine Membran überführt. Man macht sich dabei zunutze, dass die genetisch veränderte DNA zusätzliche Restriktionsschnittstellen trägt, und sich deshalb die Länge der DNA-Stücke an dieser Stelle also vom Wildtyp unterscheidet.

Die an die Membranoberfläche gebundene DNA wird mit einer mittels PCR amplifizierten, radioaktiv markierten DNA-Sonde inkubiert, die spezifisch mit der DNA des Targeting-Vektors interagieren muss. Die radioaktive Markierung der unterschiedlichen Bandengrößen kann mit Hilfe eines Phosphoimagers sichtbar gemacht werden.

2.1.11.1 Puffer und Lösungen für den Southern-Blot

<u>Lysepuffer:</u>	
NaCl	0,3 g
0,5 M Tris-Cl	10 ml
EDTA	1,86 g
N-Laurylsarcosin	2,5 g
Wasser	ad 500 ml
Nach dem Autoklavieren werden 0,25 mg/ml Proteinase K zugegeben.	

<u>Phosphat-Puffer (pH 7,4):</u>	
1 M Na ₂ HPO ₄	387 ml
1 M NaH ₂ PO ₄	113 ml

<u>0,4 M HCl:</u>	
37 % HCl	40 ml
Wasser	ad 1000 ml

<u>0,5 M NaOH/1,5 M NaCl:</u>	
NaOH	40 g
NaCl	175,3 g
Wasser	ad 2000 ml

<u>Church-Puffer:</u>	
BSA	5 g
Phosphat-Puffer	250 ml
20 % SDS	175 ml
0,5 M EDTA	1 ml
hsDNA	0,1 mg/ml
Wasser	ad 500 ml
BSA wird in 50 ml kaltem Wasser gelöst. ssDNA wird 10 Minuten bei 95°C denaturiert und sofort in den auf 60°C erwärmten Puffer gegeben.	

<u>0,5 M Tris/3 M NaCl (pH7,5):</u>	
Tris	121 g
NaCl	351 g
Wasser	ad 2000 ml

<u>20x SSC (pH 7,0):</u>	
NaCl	175 g
Na ₃ Citrat * 2 H ₂ O	88 g
Wasser	ad 1000 ml

<u>2x Waschpuffer:</u>	
20x SSC	200 ml
20 % SDS	10 ml
Wasser	ad 2000 ml

<u>0,4x Waschpuffer:</u>	
20x SSC	40 ml
20 % SDS	10 ml
Wasser	ad 2000 ml

<u>TE-Puffer (pH 8,0):</u>	
1 M Tris-Cl	5 ml
0,5 M EDTA	1 ml
Wasser	ad 500 ml

2.1.11.2 Gewinnung von genomischer DNA aus ES-Zellen

Um DNA aus ES-Zellen zu isolieren, benutzt man Proteinase K (Firma Roche, # 03 115 801 001). Man gibt 50 µl Lysepuffer in jede bewachsene Vertiefung einer 96-well-Platte und inkubiert bei 60°C über Nacht im Wärmeschrank. Am nächsten Morgen lässt man die Platte abkühlen, gibt zur Fällung der DNA je 100 µl Ethanol-NaCl-Gemisch (150 µl 5 M NaCl auf 10 ml 100 % Ethanol) und inkubiert 60 Minuten bei Raumtemperatur. Man kippt danach vorsichtig den

Überstand ab, wäscht zwei- bis dreimal mit 70 % Ethanol und lässt zum Trocknen die Platte mit offenem Deckel etwa 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen.

2.1.11.3 Restriktionsverdau der genomischen DNA

Man gibt je 50 µl Restriktionsverdau-Mix (siehe 2.1.10.1) in jede Vertiefung der 96-well-Platte, inkubiert nach den Anforderungen des Enzyms, mischt nach etwa 60 Minuten durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren nochmals durch und inkubiert über Nacht im Wärmeschrank. Nach Zugabe von 10 µl 6x Auftrags-Puffer kann die Mischung tiefgefroren oder aufs Gel aufgetragen werden.

2.1.11.4 Auftrennung der genomischen DNA auf Agarose-Gel

Wie unter 2.1.8 geschildert wird die verdaute DNA auf ein 0,8 % Agarose-Gel aufgetragen und bei 150 V aufgetrennt. Anschließend fotografiert man am UV-Transilluminator mit angelegtem Lineal das Gel, um nach dem Blotten die Größe der Banden bestimmen zu können (siehe 2.1.11.9).

2.1.11.5 Depurinierung der genomischen DNA

Um die verhältnismäßig großen DNA-Fragmente effektiv aus dem Gel auf eine Membran überführen zu können, werden sie depuriniert. Dazu inkubiert man zunächst 15 Minuten mit 0,4 M Salzsäure, dann zweimal 15 Minuten mit 0,5 M Natronlauge / 1,5 M NaCl und neutralisiert abschließend zweimal 20 Minuten mit 0,5 M Tris / 3 M NaCl (pH 7,5). Bei diesem Vorgang werden einerseits Strangbrüche induziert, andererseits trennen sich die beiden DNA-Stränge und können so einfacher aus dem Gel auf die Membran wandern.

2.1.11.6 Blotten

Die DNA wird nach dem Prinzip des Kapillarblottens aus dem Gel auf eine Membran überführt. Dazu durchtränkt man Haushaltsschwämme mit 10x SSC-Puffer. legt sie in eine etwa bis zur Hälfte mit 10x SSC-Puffer gefüllte Metallwanne, platziert darauf 3 Lagen Filterpapier (Firma Schleicher & Schüll, GB 002), das Gel, die Membran (Hybond-N, Firma Amersham, # RPN 203 N), nochmals 3 Lagen Filterpapier und einen großen Stoß Papierhandtücher. Es ist sehr wichtig, darauf zu achten, dass keine Flüssigkeitsbrücken zwischen Papierhandtüchern und Puffervorrat entstehen, damit die komplette Flüssigkeit durch das Agarosegel wandert und so die DNA-

Stücke mitgezogen werden. Man beschwert diesen Aufbau mit einer Glasflasche und lässt den Blot bis zum nächsten Morgen stehen.

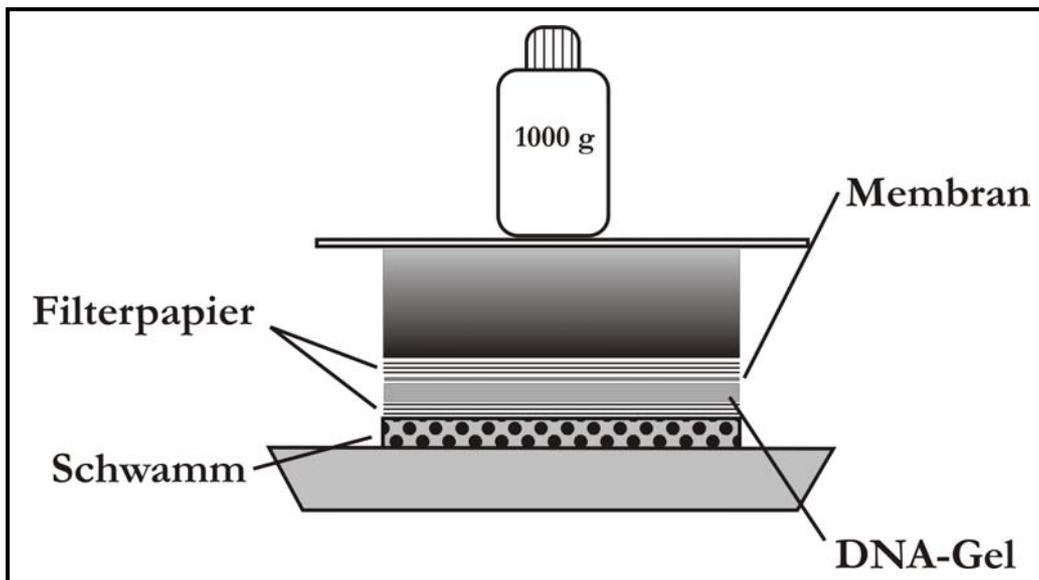


Abbildung 9 - Aufbau Southernblot

Dann entnimmt man die Membran, markiert mit Bleistift die Geltaschen, fixiert die DNA mittels Crosslinking (Programm: Auto-Crosslink am UV-Stratalinker™, Firma Stratagene) an der Membran und trocknet sie anschließend 2 Stunden bei 80°C im Trockenschrank.

2.1.11.7 Markierung der Southern-Sonde

Beim Markieren der Southern-Sonde wurde das „DNA random primed labeling kit“ (Firma Roche, # 11 004 760 001), das auf der sogenannten „random labeling“-Methode (Feinberg and Vogelstein 1983) basiert, verwendet. Etwa 100 ng des zu markierenden DNA-Stranges werden hierzu 10 Minuten bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und mit DNA-Hexameren, dNTP-Mix (mit radioaktivem α -³²P-dCTP) und Klenow-Fragment 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

<u>Ansatz Labelingreaktion:</u>	
DNA (12 ng/μl)	8 μl
dXTP-Mix	3 μl
Puffer Nr. 6 (Roche)	2 μl
α - ³² P-dCTP	6 μl
Klenow-Fragment	1 μl

Während dieser Zeit binden die Hexamere in zufälligen Abständen an die getrennten DNA-Stränge, und die Klenow-Polymerase fügt in semikonservativer Weise Desoxyribonukleotide nach der DNA-Matritze ein. Es resultieren radioaktiv markierte DNA-Stücke, die nach der Größenausschlusschromatographie mit Hilfe von mit Kieselgel gefüllten Säulen („Nick Columns“, Firma GE Healthcare, # 17-0855-02) aufgetrennt und in verschiedenen Reaktionsgefäßen gesammelt werden. Dazu wird die Säule zunächst mit TE-Puffer gewaschen, dann 20 µl DNA-Ansatz auf die Säule pipettiert und mit 380 µl TE-Puffer nochmals gewaschen (Fraktion 1). Um die markierten Sondenstücke von der Säule zu eluieren, werden 500 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben und als Fraktion 2 gesammelt. Zur Kontrolle gibt man zum Schluss 650 µl TE-Puffer zu und sammelt dabei je 6 Tropfen in den Fraktionen 3, 4 und 5. Zur Aktivitätsbestimmung entnimmt man jeder Fraktion je 2 µl und vermisst die Probe am Szintillationszähler („Cerenkov-Messung“). Bei erfolgreicher Markierung sollte Fraktion 2 eine Aktivität von 80000 – 100000 cpm/µl, Fraktion 3 dagegen eine etwa um den Faktor 8 niedrigere Aktivität besitzen. Für das weitere Vorgehen wird nur noch Fraktion 2 benötigt.

2.1.11.8 Inkubation der Sonde mit der DNA

Bei der Präinkubation werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Natriumdodecylsulfat und denaturierte DNA aus Heringssperma („hsDNA“, Firma Sigma) blockiert. Hierfür schweißt man die Membran mit auf 60°C erwärmten Church-Puffer in einen Plastikschauch (Firma neolab, # 1 – 4013) ein und inkubiert 2 Stunden bei 60°C im Wasserbad. Danach entnimmt man die Membran, überführt sie in einen neuen Schlauch und gibt nun die radioaktiv markierte Sonde, die zuvor bei 95°C 5 Minuten lang denaturiert wurde, und Church-Puffer zu. Man verschweißt den Schlauch und inkubiert über Nacht bei 60°C im Wasserbad.

2.1.11.9 Waschen und Analysieren der Membran

Am nächsten Morgen wird die Membran aus dem Schlauch entnommen und in eine Metallwanne überführt. Man wäscht zunächst kurz mit auf 60°C erwärmtem 2x Waschpuffer, und geht dann nach folgendem Muster vor:

- 15 Minuten, 60°C, 2x Waschpuffer
- 30 Minuten, 65°C, 0,4x Waschpuffer
- 30 Minuten, 67°C, 0,4x Waschpuffer
- 30 Minuten, 72°C, 0,4x Waschpuffer

Man kontrolliert anschließend die Aktivität der Membran mit dem Geigerzähler und wäscht im Bedarfsfall solange weiter, bis diese bei 20 – 50 cpm liegt.

Ist dies der Fall, trocknet man die Membran bei Raumtemperatur auf Filterpapier, schlägt sie in Klarsichtfolie ein und legt sie für 1 – 3 Tage auf eine Phosphoimagerplatte (MP 2025) auf. Danach liest man diese am Phosphoimager BAS 1000 (Firma Fujix) aus und analysiert die entstandenen Signale mit Hilfe der PC-Programme BASReader und AIDA (Firma raytest). Nach dem Ausdrucken des Blots kann nun mit dem Lineal der Abstand zwischen DNA-Tasche und Signal gemessen werden. Man vergleicht diesen Abstand mit dem unter 2.1.9.3 beschriebenen Ausdruck und bestimmt so die Größe der DNA-Banden.

2.1.12 Cre-vermittelte Rekombination *in vitro*

Die korrekte Funktionalität der loxP-Sequenzen im Targeting-Vektor wird mit Hilfe der Cre-Rekombinase (Firma NEB, # M0298S) überprüft. Dabei inkubiert man den Vektor nach den Angaben des Herstellers und führt davor und danach eine 3-Primer-PCR durch. Einer dieser Primer liegt upstream der ersten loxP-Sequenz, der zweite innerhalb der beiden loxP-Sequenzen und der dritte downstream der zweiten loxP-Sequenz. Vor und nach der Rekombination mit Cre sollte sich je ein Amplifikat bilden, die sich nach Auftrennung in Agarose-Gel in ihrer Größe unterscheiden. Da sich bei der Reaktion ein Gleichgewicht einstellt, ist keine vollständige Rekombination zu erwarten.

2.2 Erzeugung genetisch veränderter Mäuse

2.2.1 Gewinnung muriner Feederzellen

Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind omnipotent, können also in jedes beliebige Gewebe ausdifferenzieren. Um diese Eigenschaft während der Kultivierung zu erhalten, benötigen sie LIF (Leukämie-inhibierender Faktor), der dem Kulturmedium zugefügt werden kann, aber auch von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) oder auch „Feeder-Zellen“ produziert wird. Da bei der ES-Zell-Kultur mit G418 selektioniert wird, müssen sie auf mindestens einem Allel eine Neomycin-Resistenz-Kassette tragen. Man verwendet also zum Verpaaren männliche Mäuse, die diese Resistenz homozygot besitzen (z.B. CNG3^{-/-}, freundlicherweise von Prof. Dr. Martin Biel, LMU München, zur Verfügung gestellt) und weibliche Wildtypen (z.B. C57/Bl6).

Um Feeder-Zellen zu gewinnen, entnimmt man schwangeren Mäusen am Tag 14,5 p.c. alle Embryonen, entfernt deren Vorder- und Hinterläufe, Kopf und blutführenden Organe und zerschneidet den Torso in kleine Stückchen. Man inkubiert nun 10 Minuten mit 1 ml Trypsin pro

Embryo bei 37°C und homogenisiert das Gewebe durch gründliches Auf- und Abpipettieren mit Stabpipetten (beginnend mit 25 ml, dann 10 ml, 5 ml, 2 ml). Die Zellen werden auf 175 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät (2 Flaschen pro Embryo), mit 20 ml EF-Medium überschichtet und bei 37°C und 5 % CO₂ bis zur völligen Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden nun trypsiniert, vereinzelt, 80 % der Suspension entnommen und der Rest wieder bis zur völligen Konfluenz unter obigen Bedingungen kultiviert. Dieser Vorgang kann fünfmal wiederholt werden (bis zu Passage 6). Die entnommenen Zellen werden in einem 50 ml-Falkon mit 5000 rad bestrahlt (Strahlungsquelle: Institut für Medizinische Mikrobiologie, TU München), um sie teilungsunfähig zu machen. Man zentrifugiert sie anschließend bei 180 g ab und resuspendiert in 3 ml Einfriermedium pro 175 cm²-Flasche. Die Zellen können als 1 ml-Aliquots bei -180°C im Stickstofftank gelagert werden. Um zu überprüfen, welche Fläche von ihnen bedeckt wird, sät man einen Teil eines Gefrierstocks vor Beginn der ES-Zell-Kultur aus.

2.2.2 Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen

Murine embryonale Stammzellen („ES-Zellen“) müssen unter besonderen Bedingungen kultiviert werden, um ihre Omnipotenz, also die Fähigkeit, in jedes beliebige Gewebe auszudifferenzieren, zu erhalten. So wechselt man beispielsweise täglich das Medium, um die Anreicherung von Stoffwechselprodukten oder einen Verbrauch der Komponenten der Nährlösung zu vermeiden, und erwärmt alle Lösungen und Medien im Wasserbad auf 37°C, bevor sie mit den Zellen in Kontakt kommen. Die Qualität der Kultur lässt sich durch die Morphologie der Zellkolonien beurteilen. Diese weisen im nicht ausdifferenzierten Zustand glatte, definierte Ränder auf und sind so leicht von den sie umgebenden Feederzellen zu unterscheiden. Beginnen die ES-Zellen einer Kolonie den Differenzierungsprozess, so verändert sich auch das Aussehen der Kolonie: Ihr Rand wird ungleichmäßig und die gesamte Kolonie erscheint flacher.

Für die vorliegende Arbeit wurden R1-Zellen aus dem Labor von Prof. Andras Nagy (University of Toronto) verwendet (Passage 11, Sv129-Hintergrund, September 2001).

Zur Kultivierung wurde ein HeraCell-Brutschrank (Firma Heraeus) eingesetzt.

2.2.2.1 Verwendete Medien und Lösungen bei der ES-Zell-Kultur

D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) enthält Glucose, Natriumpyruvat und L-Glutamin und stellt sich bei einem CO₂-Gehalt der Atmosphäre von 5 % auf einen pH von 7,2 – 7,4 ein.

Serum aus fetalen Rindern („fetal bovine serum“, FBS, Firma Invitrogen, # PET10270106, Charge 40F2342K) wird zur Inaktivierung von Proteinasen unter regelmäßigem Schütteln 20

Material und Methoden

Minuten bei 60°C inkubiert. Anschließend aliquotiert man es in 50-ml-Falkonröhrchen und friert das Serum bei -20°C ein.

Leukämie-inhibierender Faktor (LIF, Firma Chemicon, #ESG1107) wird mit EF-Medium verdünnt, aliquotiert und bei 4°C gelagert. Man verdünnt 1 ml LIF (10⁷ Units) mit 19 ml EF-Medium.

β-Mercaptoethanol (β-ME) wird dem Medium zugegeben, um reaktive Stoffwechselprodukte der Stammzellen zu entgiften. Man verdünnt 73,5 µl konzentrierten β-ME mit 21 ml Wasser, sterilfiltriert und friert 1-ml-Aliquots bei -20°C ein.

Geneticin (G418, Firma Gibco, # 11811-031) wird mit PBS auf 200 mg/ml verdünnt und in 1-ml-Aliquots bei -20°C gelagert. Bei der Verdünnung ist darauf zu achten, dass der Hersteller eine „potency“ angibt, mit der die abzuwiegende Masse multipliziert werden muss, um die tatsächliche Masse zu erhalten.

Ganciclovir (Cymeven, Firma Roche) wird auf 20mM mit PBS verdünnt und in 50-µl-Aliquots bei -20°C gelagert.

Im Medium ergeben sich folgende Endkonzentrationen:

LIF	1000 U/ml
β-ME	100 µM
G418	400 µg/ml
Ganc	2 µM

EF-Medium:	
D-MEM	450 ml
FBS	50 ml

ES-Medium:	
D-MEM	400 ml
FBS	100 ml
LIF	1 ml
β-ME	1 ml

Trypsin/EDTA:	
10x Trypsin/EDTA	10 ml
Wasser	ad 100 ml

2.2.2.2 Zellkulturgefäße und Kennzahlen

Es wurden Gefäße der Firma Corning eingesetzt:

Zellkulturflaschen 25 cm ² , Schräghals, Belüftungskappe	# 430639
Zellkulturflaschen 75 cm ² , Schräghals, Belüftungskappe	# 3376
Zellkulturflaschen 175 cm ² , Schräghals, Belüftungskappe	# 431080
Mehrfachkulturschalen, 96-well	# 3599
Mehrfachkulturschalen, 24-well	# 3526
Mehrfachkulturschalen, 6-well	# 3516
Petrischalen, 55 cm ²	# 430167

Zellkulturgefäß	Fläche	Medium	Trypsin/EDTA
96-well-Platte	96 x 0,32 cm ² = 31 cm ²	200 µl / well	40 µl / well
24-well-Platte	24 x 2,3 cm ² = 55 cm ²	1 ml / well	500 µl / well
6-well-Platte	6 x 9 cm ² = 54 cm ²	3 ml / well	1,5 ml / well
Kleine Flasche	25 cm ²	5 ml	2 ml
Mittlere Flasche	75 cm ²	15 ml	3 ml
Große Flasche	175 cm ²	20 ml	5 ml
Petrischale	55 cm ²	10 ml	2 ml

Tabelle 1 - Kennzahlen Zellkulturflaschen

2.2.2.3 Auftauen und Aussähen von ES-Zellen

Gefrierstocks von ES-Zellen werden direkt nach der Entnahme aus dem Stickstofftank unter fließendem, warmem Wasser aufgetaut, mit ES-Medium im 15 ml-Falkon verdünnt und bei 1000 rpm 5 Minuten lang abzentrifugiert, um den Kontakt mit DMSO möglichst kurz zu halten. Das Zellpellet wird in 5 ml ES-Medium resuspendiert und in eine mit Feeder-Zellen bewachsene 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Man schwenkt diese Flasche, um die Zellen möglichst gleichmäßig über die gesamte Fläche zu verteilen, und inkubiert im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

2.2.2.4 Passagieren von ES-Zellen

ES-Zellen müssen passagiert werden, bevor die Ränder der einzelnen Kolonien aneinander stoßen, um Differenzierungsvorgänge zu unterdrücken. Man wäscht die Zellen nach Entfernen

des ES-Mediums zweimal mit PBS, da Serumreste zur Inaktivierung des Trypsins führen, und gibt Trypsin/EDTA zu. Das Volumen hängt hierbei von der Flaschengröße ab. Man inkubiert bei 37°C im Brutschrank, bis sich die Zellen vom Boden lösen, und vereinzelt sie nun durch vorsichtiges, aber gründliches Auf- und Abpipettieren mit einer 10ml- oder 5ml-Stabpipette. Die Passagezahl der ES-Zellen vergrößert sich durch diesen Vorgang um 1.

2.2.2.3 Einfrieren von ES-Zellen

Trypsinierte ES-Zellen werden 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryogefäß überführt. Dieses wird in einer Styroporbox je 1 Stunde bei -20°C und -80°C eingefroren und anschließend zur längerfristigen Lagerung (> 4 Wochen) in den Stickstofftank gestellt.

2.2.3 Homologe Rekombination nach Elektroporation (1. Targeting)

Will man das genetische Material einer ES-Zelle verändern, muss ein so genannter Targeting-Vektor in die Zelle eingeführt werden und dort mit der Wildtyp-DNA rekombinieren, also die ursprüngliche genetische Information durch seine eigene ersetzen. Ein solcher Targeting-Vektor zeichnet sich durch einen etwa 1 kb (am 5'-Ende gelegen) und einen etwa 5 – 7 kb großen (am 3'-Ende gelegen), der Wildtyp-DNA entsprechende Bereich, den zu verändernden Abschnitt sowie ein oder mehrere Resistenz- oder Markergene aus. In der vorliegenden Arbeit wird der loxP-neotk-loxP-Vektor verwendet (siehe 2.1.1), in den die genetisch veränderte DNA kloniert wurde. Dieser Vektor wird linearisiert und mittels Elektroporation in ES-Zellen eingeführt. Dort kommt es durch Interaktion des mit der DNA homologen Bereiches des Vektors zu Strangbrüchen, und die Vektor-DNA wird an definierter Stelle eingeführt – man spricht dabei von einer homologen Rekombination. Dieses Ereignis findet extrem selten statt (in etwa einer aus 10^6 Zellen). Viel wahrscheinlicher ist die zufällige Integration des Vektors in die Wildtyp-DNA (etwa eine aus 10^3 Zellen), so dass alle überlebenden Zellen nach der Selektion mit Geneticin (G418) mittels PCR oder Southern Blot auf den korrekten Einbau des Vektors hin überprüft werden müssen.

2.2.3.1 Vorbereitung der Vektor-DNA

50 µg des Vektors werden mittels Restriktionsverdau linearisiert, die DNA isoliert, gefällt und in 20 µl Wasser gelöst. Man füllt mit PBS auf 100 µl auf und bestimmt die DNA-Konzentration am Photometer.

2.2.3.2 Vorbereitung der ES-Zellen

ES-Zellen, die in einer 75 cm²-Zellkulturflasche wachsen, werden trypsiniert, 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert und in 900 µl PBS resuspendiert.

2.2.3.3 Elektroporation

Man testet zunächst die Elektroporationsapparatur (Gene Pulser, Firma Biorad). Dazu setzt man eine mit 1 ml PBS befüllte Elektroporationsküvette denselben Bedingungen wie bei der eigentlichen Elektroporation aus: Die Spannung beträgt 230 V, die Kapazität 500 µF. Es sollte sich dabei eine Zeitkonstante von etwa 5 Millisekunden ergeben. Nach diesem Vorversuch werden die Zellen elektroporiert. Dazu mischt man sie mit dem linearisierten Vektor, überführt sie in eine Elektroporationsküvette und appliziert den oben geschilderten Puls. Danach lässt man den Ansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen, mischt ihn mit 13 ml ES-Medium und sät je 1 ml der Suspension auf 14 mit Feederzellen bewachsene Petrischalen aus.

2.2.3.4 Selektion transfizierter Klone

Wurde der Vektor ins Genom integriert, ist die Zelle resistent gegen eine Behandlung mit Geneticin. Setzt man dieses Antibiotikum nach 24 Stunden in einer Konzentration von 400 µg/ml dem Medium zu, sterben alle Klone, die diese Resistenz nicht tragen, binnen 5 – 7 Tagen.

2.2.3.5 Picken von ES-Zell-Kolonien

Etwa 6 – 8 Tage nach der Elektroporation erscheinen die ersten ES-Zell-Kolonien auf den Petrischalen, die gegen G418 resistent sind. Man erkennt sie mikroskopisch durch ihre gleichmäßige Struktur und den klar definierten Rand. Sollen sie gepickt, also mit einer Pipette aus der Petrischale in eine 96-well-Platte überführt werden, legt man in die Vertiefungen dieser Platte je 30 µl PBS vor. Nun saugt man unter der sterilen Werkbank mit einer 20 µl Mikropipette eine Kolonie in die Pipettenspitze (2 µl Volumen einstellen) und gibt sie in eine der Vertiefungen. Man verfährt so mit allen 14 Petrischalen, bis alle Kolonien gepickt sind, die einerseits groß genug erscheinen, andererseits noch nicht begonnen haben, auszudifferenzieren.

2.2.3.6 Vereinzeln und Splitten der gepickten Klone

Die ES-Zellen werden durch Zugabe von 30 µl 2x Trypsin/EDTA, 5-minütige Inkubation bei 37°C und vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Danach überführt man je 30 µl in zwei

mit Feederzellen bewachsene und mit 150 µl ES-Medium pro Vertiefung gefüllte 96-well-Platten („A- und B-Platte“). Diese werden im Brutschrank solange bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, bis die ES-Zellen etwa 70 % des Bodens bedecken, ihre Ränder aber noch nicht aneinander stoßen.

2.2.3.7 Einfrieren der A-Platten

Das Medium wird von den Platten abgegossen und jede Vertiefung zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Dann trypsiniert man die Zellen durch Zugabe von je 30 µl Trypsin/EDTA, 5-minütige Inkubation bei 37°C und vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Man gibt nun je 150 µl Einfriermedium zu, verschließt die Platten mit Autoklavierband und friert sie bei –20°C ein. Nach einer Stunde werden die Platten in den –80°C-Schrank gestellt und dort bis zum Abschluss des ersten Screenings gelagert, keinesfalls aber länger als 8 Wochen.

2.2.3.8 Splitten und Einfrieren der Screening-Platten

Man trypsiniert die Zellen auch hier mit 30 µl Trypsin/EDTA, inkubiert 5 Minuten bei 37°C und pipettiert vorsichtig auf und ab, gibt allerdings nach dem Trypsinieren je 120 µl ES-Medium zu und pipettiert je 50 µl der Suspension in zwei 96-well-Platten („B-, C- und D-Platte“). Diese Platten werden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, bis 90 – 100 % des Bodens bedeckt sind – da die Zellen nicht wieder in Kultur genommen werden, spielt es keine Rolle, ob sie ausdifferenzieren. Man wäscht sie vor dem Einfrieren zweimal mit je 200 µl PBS und lagert sie bei –20°C.

2.2.3.9 Identifizierung positiver Klone mit PCR

Um die DNA aus ES-Zellen zu gewinnen, werden die Zellen wie unter 2.1.11.2 behandelt. Man löst das DNA-Präzipitat in 20 µl Wasser und setzt je PCR-Ansatz 1 µl (etwa 100 ng DNA) ein. Ein homologes Rekombinationsereignis kann mittels PCR nachgewiesen werden, indem ein auf der DNA upstream des Vektors gelegener Primer mit einem im Vektor downstream der ersten loxP-Sequenz gelegenen Primer ein Amplifikat bildet. Um diese Screening-PCR zu etablieren, wird an den Targeting-Vektor eine 5'-Verlängerung eingefügt und anhand einer Verdünnungsreihe mit Wildtyp-DNA die Nachweisgrenze bestimmt.

2.2.3.10 Identifizierung positiver Klone mit Southern Blot

Eine weitere Möglichkeit, ein homologes Rekombinationsereignis nachzuweisen, besteht im Southern Blot (2.1.11).

2.2.4 Cre-vermittelte Rekombination (2. Targeting)

Klone, in deren Erbgut der Targeting Vektor homolog rekombiniert hat, tragen intronisch eine gefloخته neo-tk-Kassette. Diese ist etwa 4,8 kb groß und wird in einem 2. Targetingvorgang entfernt, um die Wahrscheinlichkeit einer Keimbahngängigkeit der Mutation zu vergrößern. Man verwendet dafür die Cre-Rekombinase, die mittels Elektroporation in die ES-Zellen eingeführt wird.

2.2.4.1 ES-Zell-Kultur für das 2. Targeting

Die positiv gescreenten Klone aus dem 1. Targeting werden wieder in Kultur genommen. Dazu taut man die entsprechende Platte bei 37°C im Brutschrank auf und überführt die Zellsuspension in eine mit Feeder-Zellen bewachsene 24-well-Platte. Man passagiert die Zellen, bis sie den Boden einer 75 cm²-Flasche bedecken und elektroporiert wie oben geschildert (siehe 2.2.3.3). Allerdings verwendet man anstelle des Targeting-Vektors 40 µg des nicht linearisierten pic-Cre-Vektors (siehe 2.1.1). Nach der Elektroporation nimmt man die 1 ml Elektroporationsansatz in 10 ml ES-Medium auf und sät die Suspension in verschiedenen Verdünnungen auf mit Feeder-Zellen bewachsene Petrischalen aus (4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml, 500 µl, 250 µl). Die Selektion positiver Klone, die keine neo-tk-Kassette mehr tragen, erfolgt hier durch Zugabe von Ganciclovir (Cymeven i.v., Firma Roche). Dieses Virustatikum wird durch das Enzym Thymidinkinase gegiftet, indem eine Phosphatgruppe in das Molekül eingeführt wird. Da Thymidinkinase nur in Zellen exprimiert wird, in denen noch die neo-tk-Kassette vorhanden ist, kommt es zur positiven Selektion.

Man fügt dem Medium nach 36 Stunden (4-, 3-, 2-ml-Ansätze) bzw. nach 72 Stunden (1-, 0,5-, 0,25-ml-Ansätze) 2 µM Ganciclovir zu. Die negativen Klone sterben 4 – 7 Tage nach der Elektroporation ab, so dass an den Tagen 8 – 10 gepickt werden kann. Man geht weiter vor wie oben beschrieben.

2.2.4.2 Identifikation positiver Klone nach dem 2. Targeting

Wie oben beschrieben (siehe 2.2.3.9) wird die DNA der gepickten Klone isoliert, und mit Hilfe der PCR das Rekombinationsereignis überprüft. Zur Etablierung dieser PCR inkubiert man den Targeting-Vektor *in vitro* mit Cre-Rekombinase (siehe 2.1.12).

2.2.5 Blastozysten-Injektion und Reimplantation

2.2.5.1 Gewinnung von Blastozysten

Zur Gewinnung von Blastozysten verpaart man zwischen 16 und 18 Uhr 70 fünf bis sieben Wochen alte C57/Bl6-Weibchen mit 35 C57/Bl6-Männchen, die älter als acht Wochen sind. Kommt es in der Nacht zur Begattung, findet man am nächsten Morgen einen Pfropf in der Vagina des Weibchen. Dieser besteht aus koagulierten Proteinen der Samenflüssigkeit des Männchens und kann mit dem bloßen Auge beim sogenannten „Plug-Check“ identifiziert werden. Die „Plug-positiven“ Weibchen werden von den anderen getrennt und am 3. Tag getötet. Man öffnet die Bauchdecke, entfernt Fett und Gefäße des Uterus und überführt diesen in eine kleine Petrischale (35/10 mm, Firma Nunc, # 150 318) mit M2-Medium (Firma Sigma-Aldrich, # M7167). Dann spült man mit einer 5 ml-Spritze (Injekt Luer Solo, Firma B. Braun) und einer Microlance™ 3-Kanüle (27G³/₄, Nr. 20, Firma BD Biosciences) unter dem Mikroskop beide Uterushörner mit je 500 µl M2-Medium. Man sammelt die Blastozysten – fünf bis zehn pro Uterus - mit einer Mundpipette (125 –134 µm Innendurchmesser, Firma Biomedical Instruments) ein und überführt sie in eine viergeteilte Petrischale (35/10 mm, Firma Greiner) mit M2-Medium. Nachdem alle Blastozysten eingesammelt wurden, werden sie mit der Mundpipette in eine andere viergeteilte Petrischale mit M16-Medium (Firma Sigma-Aldrich, # M7292) gebracht und eine Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.2.5.2 Vorbereitung der ES-Zellen

Man nimmt die zu injizierenden ES-Zellen spätestens am Tag vor der Injektion in Kultur und zieht sie in 6-well-Platten heran. Nachdem die Blastozysten entnommen wurden, trypsiniert man eine der mit ES-Zellen bewachsenen Vertiefungen und zentrifugiert nach Standard-Bedingungen. Das Pellet wird in 500 µl ES-Medium resuspendiert und eine halbe Stunde auf Eis stehen gelassen. Nun nimmt man 380 µl des Überstandes, in dem sich tote Zellen befinden, ab und resuspendiert den Rest durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren.

2.2.5.3 Vorbereitung der Injektionsapparatur

Die Blastozysten-Injektion wird in einer Injektionskammer an einem Mikromanipulator vorgenommen. Die Injektionskammer wird mit einem Deckglas verschlossen, das mit Vaseline (Firma Bombastus) an der Unterseite befestigt wird. Etwa 1 ml M2-Medium wird in Form eines Kreuzes auf das Deckglas pipettiert. Mit der Mundpipette legt man in den linken Arm des Kreuzes die Blastozysten, in den rechten die ES-Zellen. Man senkt Haltekapillare (VacuTips,

Firma Eppendorf, # 5175 108.000) und Injektionskapillare (TransferTips, Firma Eppendorf, # 5175 107.004) ins Medium ab und überschichtet es mit Neutralöl, um Verdunstungsvorgänge zu unterdrücken.

2.2.5.4 Injektionsvorgang

Man saugt zunächst etwa 15 ES-Zellen in die Injektionskapillare. Dabei sollten nur Zellen gewählt werden, die gleichmäßig rund geformt sind. Feeder-Zellen, erkennbar durch ihre unregelmäßige Form und ihre Größe (etwa doppelt so groß wie ES-Zellen), dürfen die Injektionskapillare nicht berühren, da sie die Öffnung verstopfen. Der Abstand zwischen den einzelnen ES-Zellen in der Kapillare sollte möglichst gering sein, um nicht zu viel Medium in die Blastozyste mit zu injizieren. Man saugt eine Blastozyste mit der Haltekapillare an und dreht sie dabei so, dass die innere Zellmasse oben oder unten zu liegen kommt, um sie bei der Injektion nicht mit der Injektionskapillare zu berühren.

Man sticht durch die Zellgrenzen zweier Trophoblasten und injiziert 10 bis 14 ES-Zellen ins Blastocoel. Beim Herausziehen der Kapillare ist darauf zu achten, dass die Zellen nicht durch den Überdruck wieder aus der Blastozyste gepresst werden. Nach erfolgreicher Injektion legt man die – nun kollabierende – Blastozyste in den unteren Teil des Medium-Kreuzes und fährt mit den Injektionen fort. Nicht gut injizierte oder anderweitig ungeeignete Blastozysten (z.B. zu kleine Höhlung) werden an anderer Stelle im Medium gesammelt und nicht weiter verwendet. Sollen mehr als 15 Blastozysten injiziert werden, teilt man sie in zwei Gruppen auf, die nacheinander aus dem M16-Medium entnommen und injiziert werden.

Nachdem alle Blastozysten injiziert wurden, inkubiert man sie eine bis drei Stunden in M16-Medium im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

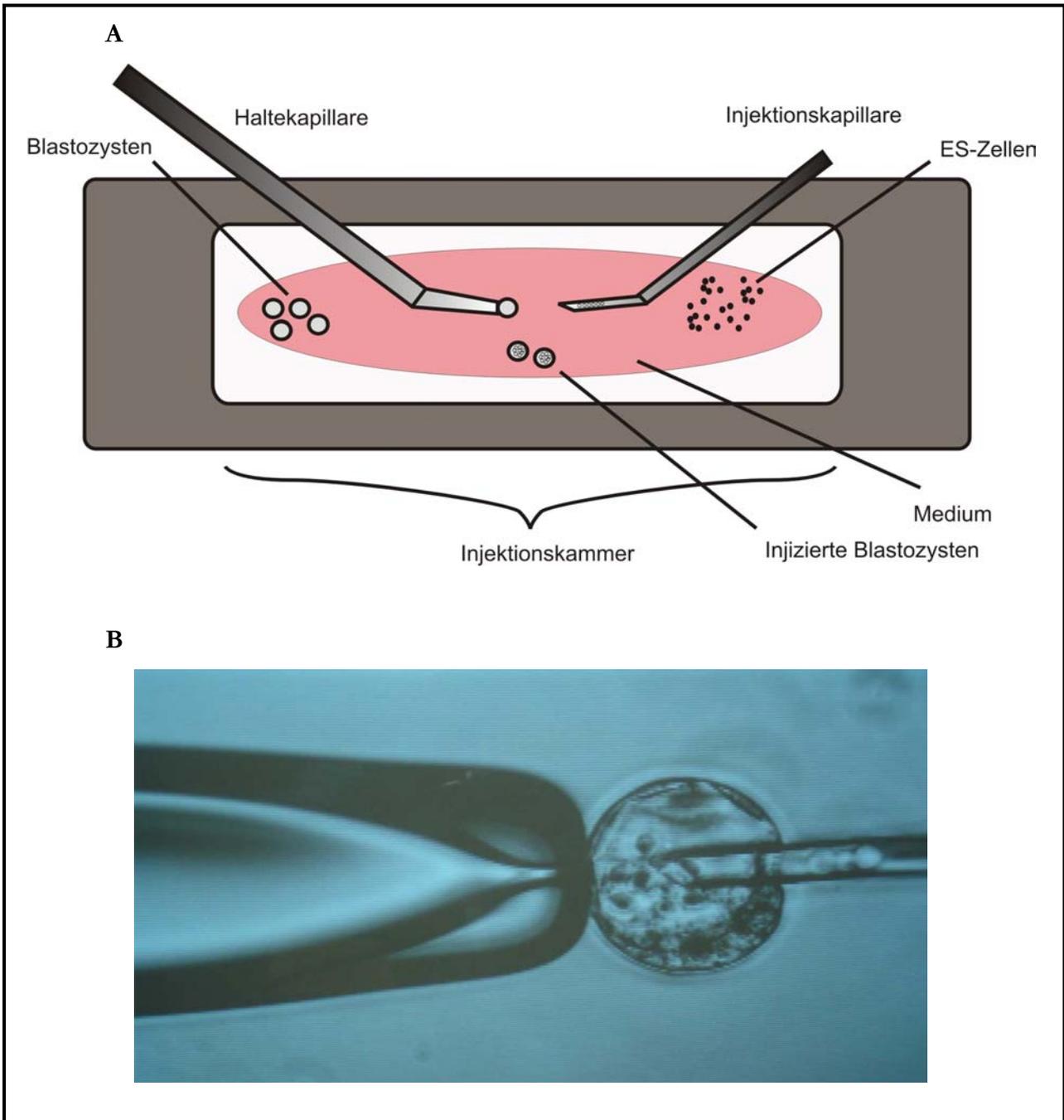


Abbildung 10 - (A) Anordnung der Injektionskammer. (B) Foto eines erfolgreichen Injektionsvorganges.

2.2.5.5 Erzeugung scheinchwangerer Mäuse

Um scheinchwangere Leihmütter zu erzeugen, die die injizierten Blastozysten austragen, verpaart man zwischen 16 und 18 Uhr 20 vasktomierte CD1-Männchen mit 40 sechs bis neun Wochen alten CD1-Weibchen. Man führt auch hier am nächsten Morgen einen „Plug-Check“ durch und trennt „Plug-Positive“ von „Plug-Negativen“.

2.2.5.6 Reimplantation injizierter Blastozysten in scheinschwangere Weibchen

Man anästhesiert ein schweinschwangeres Weibchen durch i.p.-Injektion von Ketamin/Rompun/Vetranquil. Vor Beginn der Operation saugt man die injizierten Blastozysten mit etwas Medium in eine Retransferpipette (135 – 144 µm Innendurchmesser, Firma Biomedical Instruments). Man lagert die Maus in Bauchlage unter einem Stereomikroskop, reinigt das Fell mit Ethanol und führt einen kleinen Schnitt etwa einen Zentimeter neben dem Rückgrat auf Höhe des untersten Rippenbogens. Das Muskelgewebe wird vorsichtig mit einer Pinzette so durchtrennt, dass man Ovar, Eileiter und Uterus herausziehen kann. Man fixiert das Fettpolster, das den Ovar umgibt, mit einer Klemme, damit es nicht zurück in den Körper gezogen wird. Mit der Feinpinzette wird ein kleines Loch in die Membran gemacht, die Ovar und Ovidukt umgibt. Nun transferiert man die injizierten Blastozysten mit der Mundpipette in das Infundibulum. Pro Uterushorn können bis zu 12 Embryonen implantiert werden. Danach wird die Klemme entfernt und Gebärmutter, Eileiter und Eierstock mit der Pinzette wieder zurück in den Körper geschoben. Die Wunde wird mit zwei bis drei Stichen geschlossen und die Maus in den Käfig gesetzt. Man lässt sie bis zum Ende der Narkose unter einer Wärmelampe liegen.

2.2.6 Identifizierung und Verpaaren von Chimären

Nach 19 - 21 Tagen werden chimäre Mäuse geboren. Diese sind erst mit Erscheinen der Fellfarbe, also am Tag 7 - 10, als solche zu identifizieren. Da die Blastozysten einer schwarzfarbenen Mauslinie abstammen, die ES-Zellen dagegen einer agoutifarbenen, sind die Abschnitte des Fells agouti gefärbt, die von den ES-Zellen gebildet wurden. Ein hoher Anteil dieser Farbe, also ein hoher Chimaritätsgrad, erhöht die Wahrscheinlichkeit der Keimbahngängigkeit. Voraussetzung für diese Keimbahngängigkeit ist, dass die Hoden bzw. die Eierstöcke zumindest teilweise aus den injizierten ES-Zellen hervorgegangen ist. Nur in einem solchen Fall kann die veränderte genetische Information an die nachfolgende Generation weitergegeben werden.

2.2.7 Überprüfung der Keimbahngängigkeit – Zucht von Knock-in-Mäusen

Um die Keimbahngängigkeit zu überprüfen, verpaart man geschlechtsreife, chimäre Männchen mit je zwei Wildtyp-C57/Bl6-Weibchen. Chimäre Weibchen dagegen werden nicht verpaart, weil die verwendeten ES-Zellen männliches Erbgut tragen. Da Agouti-Fellfarbe dominant über schwarze Fellfarbe vererbt wird, sollten bei einer keimbahngängiger Mutation alle Nachkommen agoutifarben sein. Wird nur ein Teil der Keimbahn von den mutierten ES-Zellen gebildet, man

spricht auch von einer mosaiken Mutation, so können Würfe mit schwarzen und agoutifarbenen Nachkommen resultieren. Letztere sollten in 50 % der Fälle ein mutiertes und ein Wildtyp-Allel tragen, also heterozygot sein. Verpaart man zwei heterozygote Mäuse, resultieren daraus Komplet-Knock-In-Tiere, die die Mutation homozygot tragen.

2.3 Analyse der Knock-in-Tiere

2.3.1 Genotypisierung mittels PCR

Man nimmt bei den zu genotypisierenden Mäusen eine Schwanzbiopsie vor und verdaut das Gewebe über Nacht bei 60°C in Anwesenheit von Proteinase K.

Puffer Genotypisierungs-Verdau:	
Proteinase K (50 µg/µl)	1 µl
10x taq-Puffer	10 µl
Wasser	89 µl

Am nächsten Morgen wird die Proteinase K 10 Minuten bei 95°C inaktiviert. Man lagert die Probe bis zur PCR bei 4°C.

Die PCR wird wie unter 2.1.7.1 beschrieben durchgeführt. Als Primer wählt man die unter 2.1.12 bereits erwähnten.

2.3.2 Genotypisierung mittels Southernblot

Auch hier wird eine Schwanzbiopsie vorgenommen und mit Proteinase K über Nacht bei 60°C verdaut (siehe 2.3.1). Am nächsten Morgen zentrifugiert man die unverdauten Reste ab, nimmt den Überstand ab und überführt ihn in ein Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen an 100 % Isopropanol. Nach kurzem Mischen kann man die als weiße Flocke ausgefallene DNA mit Hilfe einer Glasangel aus dem Gefäß nehmen, einmal mit 70 % Ethanol waschen und 10 bis 15 Sekunden an der Luft trockenen lassen. Die DNA kann in 20 µl Wasser gelöst und die Konzentration bestimmt werden. Anschließend verfährt man wie unter 2.1.11 beschrieben.

2.3.3 Proteinpräparation aus verschiedenen Organen

Eine einfache Methode, Proteine aus bestimmten Organen zu isolieren, ist das Kochen mit SDS-Tris-Puffer.

Material und Methoden

SDS-Tris-Puffer (pH 7,4) :	
20 % SDS	10 ml
1 M Tris-Cl	5 ml
Wasser	ad 100 ml

Das gewünschte Gewebe wird auf mit Mörser und Pistill auf Trockeneis zu Pulver verrieben und abgewogen. Man fügt 100 µl Puffer pro 10 mg Gewebe zu und denaturiert 10 Minuten bei 95°C. Dabei wird nach 3 Minuten gerüttelt. Anschließend stellt man die Suspension auf Eis, zentrifugiert kurz bei 15000 rpm ab und überführt den Überstand in ein neues Gefäß. Die Proteinkonzentration wird bestimmt und danach ein Westernblot durchgeführt (siehe 2.4.3 und 2.4.6). Um membranständige Proteine zu analysieren, verfährt man wie unter 2.4.2 geschildert.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Puffer und Lösungen für Membranpräparation und Coimmunpräzipitation

Membranpräparationspuffer (pH 7,4):	
Saccharose	300 mM
NaCl	75 mM
EDTA	20 mM
EGTA	20 mM
Tris/HCl	10 mM
Wasser	ad 50 ml

Solubilisierungspuffer (pH 7,4):	
EDTA	20 mM
EGTA	10 mM
Tris/HCl	10 mM
Deoxycholat	1 %
Wasser	ad 50 ml

Waschpuffer (pH 7,4):	
NaCl	150 mM
Tris/HCl	10 mM
Triton X-100	1 %
Wasser	ad 50 ml

Um den Abbau von Proteinen und ihren Komplexen durch Proteinasen zu verhindern, arbeitet man so oft wie möglich auf Eis und fügt dem Membranpräparations- und Solubilisierungspuffer Proteinase-Inhibitoren zu.

Je Mililiter Puffer benutzt man:

2 µl PI-Cocktail (Firma Sigma, # P8340)

1 µl 200µM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Firma Fluka, # 78830)

0,8 µl Calpain-Inhibitor I (10 mg/ml, Firma Roche, # 11 086 090 001)

0,8 µl Calpain-Inhibitor II (10 mg/ml, Firma Roche, # 1 086 103)

2.4.2 Membranpräparation

Möchte man membranständige Proteine wie den L-Typ Calciumkanal präparieren und dabei den kompletten Proteinkomplex erhalten, muss man nicht denaturierende Bedingungen wählen. Bei der Membranpräparation lagern sich die hydrophoben Anteile der Seifenmoleküle des Solubilisierungspuffers an die hydrophoben Anteile des Zielproteins. Dabei werden die Phospholipide der Zellmembran verdrängt, bis schließlich das Protein einen Komplex mit dem Detergenz eingeht und in Lösung geht.

Das Gewebe, aus dem das Protein isoliert werden soll, wird im gefrorenen Zustand mit Mörser und Pistill zerkleinert. Man arbeitet auf Trockeneis und gibt immer wieder etwas flüssigen Stickstoff zu, um ein Auftauen des Gewebes zu verhindern. Das Pulver wird in ein 15 ml-Falkonröhrchen überführt und abgewogen. Nun gibt man 1 ml Membranpräparations-Puffer pro 100 mg Gewebe zu und zerkleinert es auf Eis bei maximaler Geschwindigkeit mit dem Ultraturrax (Polytron PT 1200, Firma Kinematica AG). Im Anschluss wird zweimal 5 Minuten bei 4500 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet jeweils verworfen. Der Überstand wird in 1,5-ml-Reaktionsgefäße pipettiert, genau austariert und mit dem Beckmann-Ti-60-Rotor 30 Minuten bei 50000 rpm und 4°C ultrazentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200 µl Solubilisierungspuffer durch Pottern auf Eis resuspendiert. Man inkubiert die Suspension 20 Minuten bei 4°C am Rotator (Firma neolab, # 2-1175), überführt sie anschließend wieder in 1,5-ml-Reaktionsgefäße und ultrazentrifugiert bei den oben genannten Bedingungen. Nun wird der Überstand, der die solubilisierten Membranproteine enthält, weiter verwendet. Er kann bei -80°C gelagert werden.

2.4.3 Proteinbestimmung mit dem BCA-Test

Die Konzentration der Proteinlösung wird mit dem BCA-Test bestimmt. Man macht sich hier zunutze, dass Kupfer(II)-Ionen mit Proteinen Komplexe eingehen und dabei zu Kupfer(I)-Ionen reduziert werden. Diese bilden mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, dessen Absorption photometrisch bestimmt werden kann. Verwendet wurde der BCA™ Protein Assay der Firma Pierce (# 23223). Es wurden Doppelwertbestimmungen von 1/100-, 1/200- und 1/400-Verdünnungen der zu analysierenden Proteinlösung vorgenommen. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von BSA (Bovines Serumalbumin, Firma Roth, # 8076.2). Die Proben wurden 45 – 60 Minuten bei 60°C inkubiert und in einer 96-well-Platte im Titertek Multiskan® MCC/340 bei 540 nm photometrisch vermessen.

2.4.4 Coimmunpräzipitation

Die Coimmunpräzipitation ermöglicht es, Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen zu analysieren. Dabei wird nach einer Antigen-Antikörper-Reaktion ein bestimmtes Protein aus der Lösung isoliert. Arbeitet man unter nicht denaturierenden Bedingungen, bleiben makromolekulare Proteinkomplexe erhalten, deren Bestandteile nach Westernblotten mit den jeweiligen Antikörpern nachgewiesen werden können. Eine wichtige Voraussetzung für die Coimmunpräzipitation ist die Bindung des Fc-Anteils des verwendeten Antikörpers an Protein-A-Sepharose oder Protein-G-Sepharose, mit deren Hilfe der Proteinkomplex von den anderen gelösten Proteinen getrennt wird.

Man wäscht zunächst 50 µl Protein-A-Sepharose (PAS, Firma Sigma, # 3391) dreimal mit Waschpuffer, pipettiert 200 µl der Membranpräparations-Lösung zu und inkubiert 60 Minuten bei 4°C am Rotator. Dabei werden unspezifische PAS-Interaktionspartner aus der Lösung entfernt. Dann zentrifugiert man bei 3000 rpm kurz ab, nimmt den Überstand ab und gibt den Antikörper zu, mit dem man präzipitieren will. Man richtet sich dabei nach den Angaben des Herstellers. Im Falle des Antikörpers gegen Ca_v1.2 pipettiert man 10 µl Antikörperlösung zu 190 µl vorgereinigter Membranpräparationslösung. Man inkubiert 2,5 Stunden bei 4°C am Rotator. Während dieser Zeit bindet der Fab-Anteil des Antikörpers an das Zielprotein. Danach überführt man die Lösung in ein Reaktionsgefäß mit 50 µl gewaschener PAS und inkubiert nochmals 60 Minuten bei 4°C. Jetzt interagiert PAS mit dem Fc-Anteil des Antikörpers, so dass der gesamte Antikörper-Protein-Komplex an PAS gebunden wird. Nach kurzer Zentrifugation bei 3000 rpm nimmt man den Überstand ab und wäscht das PAS-Pellet dreimal mit Waschpuffer.

Wird ein muriner Antikörper zur Präzipitation verwendet (z.B. anti-Calmodulin), so setzt man Protein-G-Sepharose (PGS, Firma Amersham, # 17-0618-01) ein, da zwischen diesem Fc-Anteil und Protein A nur eine schwache Interaktion auftritt.

2.4.5 Radioaktive Phosphorylierung

Durch Zugabe radioaktiv markierten ATPs und u.U. exogener Kinasen kann überprüft werden, ob der an PAS gebundene, nicht denaturierte Proteinkomplex phosphoryliert wird. Es wurden CaMKII, active (Firma upstate, # 14-217) und das CaMKII Assay Kit (Firma upstate, # 17-135) verwendet. Die Angaben des Herstellers wurden unverändert übernommen.

Nach Ablauf der Reaktion wird der Reaktionsansatz mit 4x Denaturierungs-Puffer 5 Minuten bei 95°C gekocht. Dabei werden die Proteine denaturiert und erhalten durch das SDS eine negative Ladung. Bei der elektrophoretischen Trennung wandern die Proteine deshalb nur aufgrund ihrer unterschiedlichen Größen verschieden schnell durch das Gel. Man zentrifugiert und pipettiert

Material und Methoden

20 – 30 µl des Überstandes in die Taschen eines SDS-PAGE-Geles (Polyacrylamidanteil abhängig von der Größe des zu analysierenden Proteins, siehe 2.4.6.2).

2.4.6 Westernblot

2.4.6.1 Puffer und Lösungen für den Westernblot

<u>10x SDS-Laufpuffer:</u>	
Tris	30,2 g
Glycin	144 g
Natriumdodecylsulfat	10 g
Wasser	ad 1000 ml

<u>10x TBS (pH 8,2):</u>	
Tris	12,1 g
NaCl	87,6 g
Wasser	ad 1000 ml

<u>Anodenlösung 1 (pH 10,4):</u>	
Tris	36,3 g
Methanol	200 ml
Wasser	ad 1000 ml

<u>4x TrisCl/SDS (pH 8,8):</u>	
Tris	18,2 g
SDS	0,4 g
Wasser	ad 100 ml

<u>1x TBST:</u>	
10x TBS	100 ml
Tween 20	1 ml
Wasser	ad 1000 ml

<u>Anodenlösung 2 (pH 10,4):</u>	
Tris	3,03 g
Methanol	200 ml
Wasser	ad 1000 ml

<u>4x TrisCl/SDS (pH 6,8):</u>	
Tris	3,02 g
SDS	0,2 g
Wasser	ad 50 ml

<u>4x Denaturierungspuffer (Laemmli 1970):</u>	
1 M Tris-Cl, pH 6,7	10 ml
20 % SDS	12,5 ml
Bromphenolblau	20 mg
Glycerin	20 ml
Wasser	ad 50 ml
1 ml Aliquots, vor Gebrauch eine Spatelspitze DTT zufügen.	

<u>Kathodenlösung (pH 7,6):</u>	
Tris	3,03 g
6-Aminohexansäure	5,2 g
Methanol	200 ml
Wasser	ad 1000 ml

2.4.6.2 Trenn- und Sammelgel

Man gießt mit der Mini-PROTEAN[®] 3 Gelapparatur (Firma Biorad, # 165-3301) nach den folgenden Angaben ein Gel:

PAA-Trenngel:

	5 %	10 %	12,5 %
Proteingröße	100 – 300 kDa	30 – 250 kDa	10 – 200 kDa
Acrylamid (30 %)	2,5 ml	5,0 ml	6,25 ml
4x Tris/SDS pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Wasser	8,75 ml	6,25 ml	5,0 ml
APS	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
TEMED	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl

Tabelle 2 - Trenngel für Proteine

<u>PAA-Sammelgel:</u>	
Acrylamid (30 %)	650 µl
4x Tris/SDS pH 6,8	1,25 ml
Wasser	3,05 ml
APS	12,5 µl
TEMED	5,0 µl

2.4.6.3 Beladen und Gellauf

Nach dem Aushärten des Gels werden die Taschen mit den denaturierten Proteinproben beladen. In eine der Taschen pipettiert man 8 µl des Precision Plus Protein Standards (Firma Biorad, # 161-0373). Die Kammer wird mit SDS-Laufpuffer gefüllt und der Gellauf gestartet. Man legt zum Einlaufen eine Spannung von 50 V an, bis die Protein-Lauffront das Ende des Sammelgels erreicht hat und trennt die Proteine danach bei 150 V auf.

2.4.6.4 Blotten

Wenn die Protein-Lauffront aus dem Gel gewandert ist, stoppt man die Elektrophorese und überführt das Gel in eine Blottingapparatur (Semi-Dry-Blotter, Firma Biostep, # V20-SDB).

Dazu schneidet man 10 Stücke Filterpapier (Firma Schleicher & Schüll, GB01) auf die Größe des Gels zu und tränkt sie in Anodenlösung 1 (3 Stücke), Anodenlösung 2 (2 Stücke) und Kathodenlösung (5 Stücke). PVDF-Membran (Immobilon-P, Firma Millipore, # IPVH00010) wird ebenfalls zugeschnitten und in Methanol getränkt. Man legt nun die Filterstücke aus der Anodenlösung auf die Anode, platziert darauf die Membran und das Gel und schließt den Stapel mit den Filterstücken aus der Kathodenlösung ab. Luftblasen können mit einer Pipette entfernt werden. Die Kathodenplatte wird auf den Stapel gelegt und mit einer 0,5-l-Flasche beschwert.

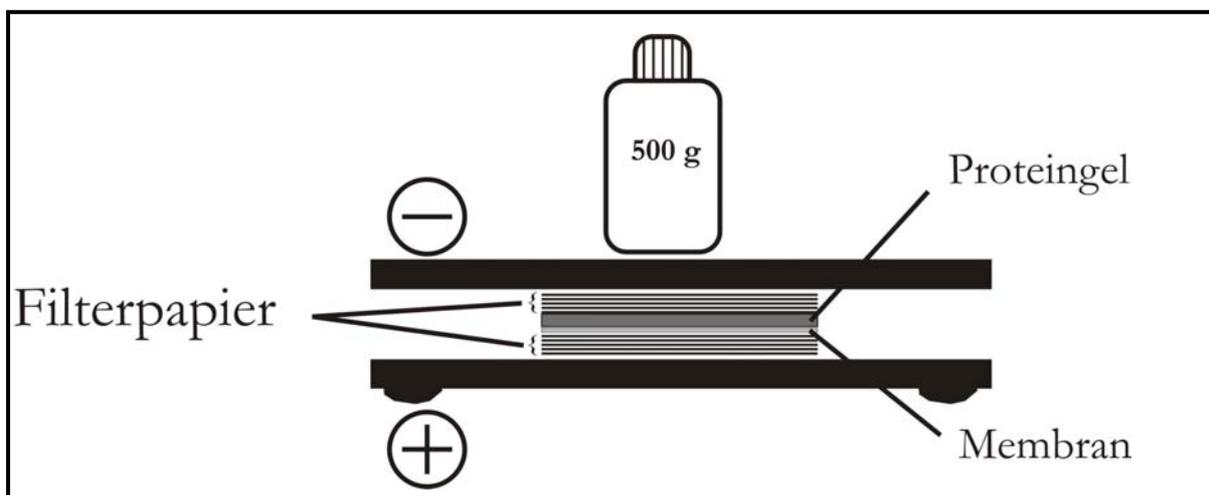


Abbildung 11 - Aufbau Westernblot

Man legt 60 Minuten eine Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Blotmembran an. In dieser Zeit wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran.

2.4.6.5 Blocken

Um unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers auf der Membran zu blocken, inkubiert man sie über Nacht bei 4°C in 5 % Milchpulver in TBST.

2.4.6.6 Inkubation mit dem 1. Antikörper

Reste der Milchpulver-Lösung werden mit TBST abgewaschen und die Membran in ein 50ml-Falkon-Röhrchen mit dem 1. Antikörper, gelöst in TBST, 0,1 % BSA, 0,05 % NaN_3 , überführt. Sollen verschiedene Proteine detektiert werden, kann die Membran zerschnitten und die Stücke mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert werden. Die Verdünnung des Antikörpers wird nach

Angabe des Herstellers vorgenommen. Nach 90 Minuten bei Raumtemperatur am Überkopfschüttler entnimmt man die Membran und blockt dreimal 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 % Milchpulver in TBST.

2.4.6.7 Inkubation mit dem 2. Antikörper

Je nach Detektionsmethode und primärem Antikörper wird die Membran mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper aus der Maus, verwendet man „anti-mouse“, bei polyklonalen Antikörpern aus dem Kaninchen wird „anti-rabbit“ eingesetzt. Soll mit NBT/BCIP detektiert werden, muss der sekundäre Antikörper mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt sein, beim ECL-System mit der Meerrettich-Peroxidase. Folgende Tabelle gibt die verwendeten Antikörper an:

Primärer Antikörper	Detektion	Sekundärer Antikörper
anti-Ca _v 1.2 alpha (polyklonal, rabbit, Moosmang <i>et al.</i> 2003)	NBT/BCIP	goat-anti-rabbit-AP (Firma Jackson Labs)
anti-Ca _v 1.2 alpha (polyklonal, rabbit, Moosmang <i>et al.</i> 2003)	ECL	goat-anti-rabbit-HRPO (Firma Dianova)
anti-CaMKII alpha (monoklonal, mouse, Firma BD)	ECL	goat-anti-rabbit-HRPO
anti-CaMKII alpha (monoklonal, mouse, Firma Chemicon)	ECL	goat-anti-rabbit-HRPO
anti-CaMKII delta (polyklonal, rabbit, Firma Abgent)	NBT/BCIP	goat-anti-rabbit-AP
anti-CaMKII delta (polyklonal, rabbit, Firma Abgent)	ECL	goat-anti-rabbit-HRPO
anti-Calmodulin (monoklonal, mouse, Firma upstate)	ECL	goat-anti-mouse-HRPO
anti-GST (polyklonal, rabbit, Firma upstate)	NBT-BCIP	goat-anti-rabbit-AP

Tabelle 3 - Primäre und sekundäre Antikörper

Die Membran wird 60 Minuten mit dem 2. Antikörper, nach den Vorschriften des Herstellers verdünnt in TBST, bei Raumtemperatur am Überkopfschüttler inkubiert. Danach blockt man

zweimal 5 Minuten mit 1 % Milchpulver in TBST und wäscht abschließend zweimal 10 Minuten mit TBST.

2.4.6.8 Detektion

Autoradiografie

Sollen die radioaktiven Signale auf einer Membran detektiert werden, so wird die Membran direkt nach dem Blotten mit dem Fön getrocknet und die Standard-Banden mit radioaktiver Tinte markiert. Dann wird die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und über Nacht auf eine Detektionsplatte (Cyclon Storage Phosphor Screen, Firma Packard Instrument Company Inc.) gelegt. Am nächsten Morgen wird die Platte mit dem Phosphoimager BAS 1000 (Firma Fujix) ausgelesen und den PC-Programmen BASReader und Tina 2.0 (Firma raytest) ausgewertet. Bei Bedarf kann die Membran auch über einen längeren Zeitraum aufgelegt werden.

NBT/BCIP

Da die Strahlung radioaktiver Membranen Fotofilme schwärzt, kann hier zur Ladekontrolle nicht das ECL-System verwendet werden. Man greift auf NBT/BCIP (Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat) zurück, zwei Substanzen, die unter Einfluss von alkalischer Phosphatase eine Redoxreaktion eingehen und farbige Produkte bilden.

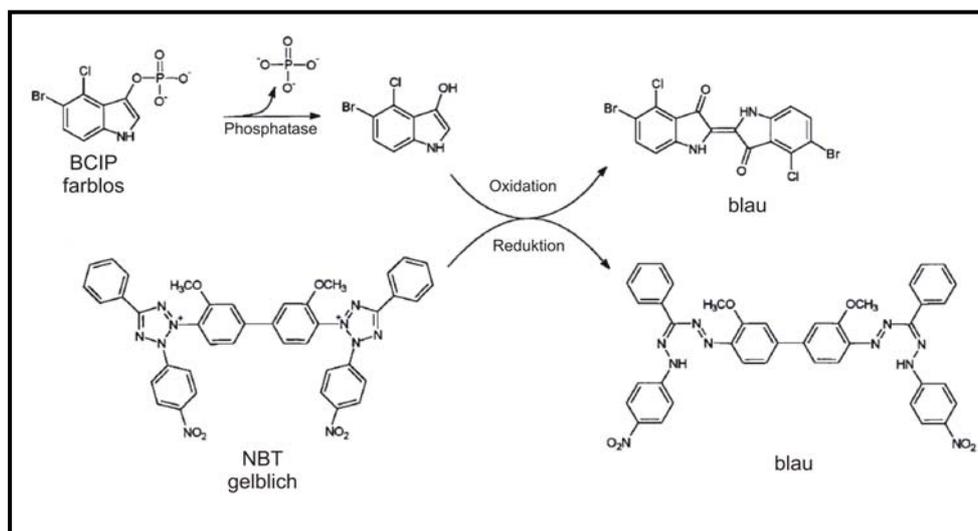


Abbildung 12 - Reaktionsgleichung NBT-BCIP

200 µl der NBT/BCIP-Lösung (Firma Roche, # 1 681 451) werden mit 10 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂ in einer Glasschale gemischt. Die gewaschene Membran wird hinzugegeben und solange inkubiert, bis die Banden die gewünscht Intensität erhalten

haben. Man stoppt die Reaktion, indem man die Membran unter fließendes, kaltes Leitungswasser hält.

ECL-System

Die Standard-Detektionsmethode für Proteine eines Westernblots ist das „enhanced chemiluminescence“- oder kurz: ECL-System. Hier wird das Reagenz Luminol unter Einfluss des Enzyms Meerrettichperoxidase und eines oxidierenden Reagenz dazu angeregt, zu fluoreszieren. Diese Fluoreszenz kann auf Fotopapier sichtbar gemacht werden.

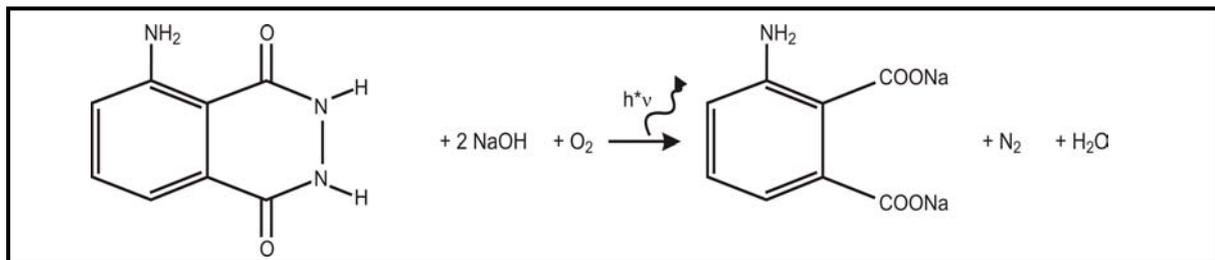


Abbildung 13 - Reaktionsgleichung Luminol-Reaktion.

Man mischt je 500 µl der beiden Lösungen des Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (Firma PerkinElmer, # NEL103) in einer Glasschale und inkubiert die Membran 1 Minute mit dieser Mischung. Dann schlägt man sie in Frischhaltefolie ein und legt sie in der Dunkelkammer 10 Sekunden bis 10 Minuten lang auf einen Fotofilm (Hyperfilm, Firma Amersham Biosciences, # RPN 1674 K). Der Film wird in der Entwicklermaschine (Firma Kodak) entwickelt. Die Stärke der Banden kann durch Verändern der Auflagezeit variiert werden.

2.4.7 HEK-Zell-Kultur

Humane embryonale Nierenzellen („HEK-Zellen“) werden für die Expression verschiedener Proteine verwendet, um beispielsweise deren Interaktionspartner oder Regulationsmechanismen zu untersuchen, die auf ihre Funktion Einfluss nehmen. Dazu muss ein Expressionsvektor in die HEK-Zelle eingeführt werden, der die cDNA des Proteins trägt. Die cDNA wird dann unter Kontrolle eines Promotors (z.B. CMV bei pcDNA3) transkribiert und in das entsprechende Zielprotein translatiert. Dieses kann unter bestimmten Voraussetzungen (z.B. beim L-Typ Calcium-Kanal 1.2 Coexpression der Beta-Untereinheit) in der HEK-Zelle funktionell rekonstituiert werden.

2.4.7.1 Zellkulturgefäße und Kennzahlen

Es wurden Gefäße der Firma TPP eingesetzt:

Zellkulturflaschen 25 cm ² , Schräghals, Belüftungskappe	# 90025
Zellkulturflaschen 75 cm ² , Schräghals, Belüftungskappe	# 90075
Zellkulturflaschen 150 cm ² , Schräghals, Belüftungskappe	# 90150

Zellkulturgefäß	Medium	Trypsin/EDTA	G418 (50mg/ml) Hygromycin (40mg/ml)
25cm ² -Flasche	5 ml	0,5 ml	G: 20 µl H: 10 µl
75cm ² -Flasche	20 ml	2,5 ml	G: 80 µl H: 40 µl
150cm ² -Flasche	35 ml	5,0 ml	G: 140 µl H: 70 µl

2.4.7.2 Auftauen und Aussähen

Man taut einen HEK-Zell-Gefrierstock aus dem –80°C-Schrank unter fließendem, kaltem Wasser auf. Das Einfriermedium des Gefrierstocks enthält 10 % DMSO, das zelltoxisch wirkt und deshalb aus der Suspension entfernt werden muss. Dazu überführt man die Zellen in ein 15ml-Falkonröhrchen, gibt 9 ml Medium (Quantum 286, Firma PAA, # U15-818) hinzu und zentrifugiert 5 Minuten bei 1000 rpm und Raumtemperatur ab. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert. Man pipettiert die HEK-Zell-Suspension in eine 25 cm²-Zellkulturflasche und inkubiert im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ über Nacht. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt und die Zellen solange weiterkultiviert, bis sie die gesamte Bodenfläche der Flasche konfluent bedecken.

2.4.7.3 Passagieren

Ist der gesamte Boden einer Zellkulturflasche mit Zellen bedeckt (man spricht auch von völliger oder 100-prozentiger Konfluenz), können die Zellen in eine größere Flasche überführt werden. Das Medium wird abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um Serumreste zu entfernen, und dann mit Trypsin/EDTA-Lösung (Firma PAA, # L11-660) überschichtet. Man inkubiert solange bei Raumtemperatur, bis sich die Zellen vom Boden ablösen. Dann gibt man Medium zu, um das Trypsin zu inaktivieren, und vereinzelt die Zellen durch mehrmaliges Auf-

und Abpipettieren. Nun kann die Suspension in eine größere (oder mehrere gleich große) Flaschen verteilt und kultiviert werden.

2.4.7.4 Transfektion von HEK-Zellen

Zur Transfektion der HEK-Zellen wird Lipofectamine™ 2000 (Firma Invitrogen, # 11668-019), eine kationische Lipidverbindung, verwendet. Dazu muss die Konfluenz einer 175 cm²-Zellkulturflasche bei 95 – 100 % liegen. Man mischt 57 µl Lipofectamin 2000 mit 5,6 ml serumfreiem Opti-MEM-Medium (Firma Gibco, # 51985) und inkubiert 5 Minuten bei Raumtemperatur. In dieser Zeit verdünnt man 57 µl cDNA-Lösung (1 µg/µl) mit 5,6 ml Opti-MEM-Medium. Die beiden Lösungen werden vereinigt, vorsichtig gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Man wäscht die Zellen einmal mit PBS, legt 20 ml Quantum-Medium ohne Antibiotikum vor und pipettiert die DNA-Lipofectamine-Mischung dazu. Nach 24 Stunden wird das Medium gewechselt und G418 zugegeben.

2.4.7.5 Ernte der HEK-Zellen

72 Stunden nach der Transfektion können die Zellen geerntet werden. Dazu werden sie zweimal mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber vom Boden der Flasche abgeschabt. Man zentrifugiert 5 Minuten bei 1000 rpm ab und friert das Pellet bei –80°C ein.

2.4.7.6 Einfrieren von HEK-Zellen

Um HEK-Zellen einzufrieren werden sie zunächst trypsiniert, bei 1000 rpm 5 Minuten lang abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Sie können wenige Wochen bei –80°C oder über einen längeren Zeitraum bei –180°C gelagert werden.

2.4.8 Erzeugung von GST-Fusionsproteinen

Will man Proteine aus einem Gemisch von Zellbestandteilen vereinzeln, kann man sie mit einer kurzen Erkennungssequenz (englisch: „tag“) versehen, die durch Bindung an bestimmte Gruppen oder Matrices leicht aus einer Lösung isoliert werden können. Bei GST-Fusionsproteinen wird die cDNA des Proteins in den pGex-Vektor kloniert. Nach Induktion mit IPTG beginnt dieser unter Kontrolle des tac-Promotors mit der Expression von Glutathion-S-Transferase (der „tag“). An ihr 3'-Ende ist das Zielprotein gekoppelt.

2.4.8.1 Puffer und Lösungen für GST-Fusionsproteine

<u>STE-Puffer (pH 8,0):</u>	
5 M NaCl	3 ml
1 M Tris-Cl	1 ml
0,5 M EDTA	200 µl
Wasser	ad 100 ml

<u>100 mM IPTG:</u>	
IPTG	500 mg
Wasser	ad 20 ml

<u>Elutionspuffer (pH 8,0):</u>	
1 M Tris-Cl	5 ml
Glutathion, red.	307 mg
Wasser	ad 100 ml

<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	
Brilliant Blue R 250 (Firma Sigma; # B0149)	1,5 g
Methanol	455 ml
Eisessig	90 ml
Wasser	455 ml

<u>Entfärbelösung:</u>	
Methanol	200 ml
Isopropanol	200 ml
Eisessig	200 ml
Wasser	ad 2000 ml

2.4.8.2 Vorversuch zur Expression

Induktion der Bakterienkultur

Man pickt nach der Transformation von Bl21-E.coli-Bakterien 4 Kolonien von der Agarplatte (siehe 2.1.3.3) und impft damit je 2 ml LB+-Medium mit Ampicillin an. Man inkubiert die Kultur bei 30°C im Schüttelinkubator und misst in regelmäßigen Zeitabständen (erstmal nach 3 Stunden) die optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD_{600}) am Photometer. Sobald sie 0,6 – 0,8 erreicht hat, entnimmt man eine 100 µl/ OD_{600} -Probe (Probe 1) und pipettiert 2 µl 100 mM IPTG in das Gemisch. Nach weiteren 3 Stunden Inkubation bei 30°C im Schüttelinkubator wird die Suspension in 2-ml-Reaktionsgefäße überführt.

Aufschluss der Zellen

Es wird 60 Sekunden bei 15000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet vorsichtig mit 200 µl eiskaltem STE gewaschen, ohne es dabei zu resuspendieren. Erst danach gibt man 0,1 mg/ml Lysozym in 300 µl eiskaltem STE zu, resuspendiert und inkubiert 15 Minuten auf Eis. 10 µl der Lösung werden entnommen (Probe 2) und der Rest bei –80°C eingefroren.

Lösen des exprimierten Proteins

Nach dem Wiederauftauen gibt man 50 µl einer 10 % Sarkosyllösung (Firma Fluka, # 61745) zu und mischt gründlich durch 5-sekündiges Vortexen. Das Pellet wird mit Ultraschall lysiert (3x 10

Sekunden, auf Eis). Danach gibt man 85 µl einer 10 % TritonX-100-Lösung (Firma Merck, # 1.08603.2500) zu, rüttelt 5 Sekunden und inkubiert das Gemisch 30 Minuten bei 4°C am Rotator. Man zentrifugiert alle ungelösten Bestandteile 5 Minuten bei 15000 rpm ab, überführt den Überstand in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß und behält das Pellet (Probe 3).

Isolierung mit Glutathion und Elution

26 µl G4B-Sepharose werden zweimal mit je 100 µl PBS gewaschen und nach kurzem Abzentrifugieren bei 3000 rpm mit 20 µl PBS gemischt. Man fügt den Überstand aus obiger Reaktion hinzu und inkubiert 5 Minuten am Rotator bei Raumtemperatur. Danach wäscht man dreimal mit je 100 µl PBS. Es werden 10 µl Elutionspuffer auf das Sepharose-Protein-Pellet pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur am Rotator inkubiert. Man zentrifugiert kurz bei 3000 rpm ab und überführt den Überstand in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß (Probe 4).

Gellauf und Coomassie-Färbung

Die 4 Proben werden mit der jeweiligen Menge an 4x-Lämmli-Puffer gemischt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen (siehe 2.4.6.3). Nach Ende des Gellaufes werden die Proteinbanden durch Einfärbung des Gels mit Coomassie sichtbar gemacht. Dazu überführt man das Gel in eine Plastikwanne, überschichtet es mit Coomassie-Färbelösung und inkubiert 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wird die Färbelösung entfernt, das Gel kurz mit Wasser gewaschen und mit Entfärbelösung überschichtet. Man inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar werden. Eventuell muss dabei die Entfärbelösung gewechselt werden.

2.4.8.3 Expression im großen Maßstab

Man wählt einen Klon, der das GST-Fusionsprotein gut exprimiert, und impft damit 7 ml YTA-Medium mit Ampicillin an. Diese Vorkultur inkubiert man über Nacht bei 30°C am Schüttelinkubator. Am nächsten Morgen entnimmt man 1 ml der Suspension, impft damit 100 ml YTA mit Ampicillin an und inkubiert solange bei 30°C am Schüttelinkubator, bis die OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 liegt. Nun fügt man 100 µl 100mM IPTG zu und lässt die Kultur weitere 3 Stunden schütteln. Man zentrifugiert 10 Minuten mit 5000 rpm ab, wäscht das Pellet vorsichtig mit 5 ml kaltem STE und resuspendiert mit 0,1 mg/ml Lysozym in 5 ml STE. Die weitere Vorgehensweise entspricht der unter 2.4.8.1 beschriebenen mit den entsprechend größeren Volumina. Möchte man das GST-Fusionsprotein phosphorylieren, verzichtet man auf die Elution und arbeitet mit den an der Sepharose gebundenen Proteinkomplexen weiter.

2.5 Elektrophysiologie

Mit den Methoden der Elektrophysiologie kann überprüft werden, ob die in HEK-Zellen exprimierten Calcium-Kanal-Proteine funktionell sind, das heißt, ob nach Öffnen des Kanals Calcium- bzw. Bariumionen ins Cytosol fließen. Außerdem kann der Kanal nach seinen elektrophysiologischen Eigenschaften (z.B. Strom-Spannungs-Beziehung, Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik) charakterisiert werden. Es wurde im „Whole-cell“-Modus bei Raumtemperatur gemessen. Die Zellen wurden mit Hilfe des EPC 9-Gerätes stimuliert und die Daten mit dem Computerprogramm HEKA PULSE (Version 8.54, Firma HEKA Electronics, Lambrecht) gesammelt und ausgewertet. Die Daten wurden mit 5 kHz abgerufen und bei 1,67 kHz gefiltert. Die Pipette hatte einen Widerstand von 2 – 3,5 M Ω , wenn sie mit Intrazellulär-Lösung gefüllt wurde.

Extrazellulär-Lösung (pH 7,4):
82 mM NaCl
20 mM Triethanolamin x HCl
30 mM CaCl ₂ /BaCl ₂
5 mM CsCl
1 mM MgCl ₂
0,1 mM EGTA
10 mM Glucose
5 mM HEPES

Intrazellulär-Lösung (pH 7,4):
102 mM CsCl
10 mM Triethanolamin-Cl
10 mM EGTA
1 mM MgCl ₂
3 mM Na ₂ ATP
5 mM HEPES

Um die Strom-Spannungs-Beziehung zu ermitteln, wurde die Zelle mit je 300 Millisekunden andauernden Pulsen von -50 bis +80 mV in 10 mV-Schritten stimuliert. Das Haltepotential betrug -80 mV. Die Fazilitierung des Calciumeinstroms wurde mit Hilfe eines dreifachen Pulsprotokolls erreicht. Zunächst wurde die Zelle bei einem Haltepotential von -80 mV mit einem 100 Millisekunden andauernden Testpuls (TP1) auf +30 mV stimuliert. Nach 10 Sekunden folgte ein 200 Millisekunden langer Präpuls auf +160 mV und gleich danach ein 100 Millisekunden langer Testpuls (TP2) auf +30 mV. Aus dem Quotienten TP2/TP1 ließ sich die spannungsabhängige Fazilitierung des Calciumeinstroms ermitteln.

3 Ergebnisse

3.1 EQ-Maus

3.1.1 Konstruktion des Targeting-Vektors

Der Targeting-Vektor, der in den $Ca_v1.2$ -Wildtyp-Genort integrieren soll, ist aufgebaut aus einem etwa 1 kB großen 5'-Arm, einer etwa 4,5 kB großen neo-tk-Kassette, die von zwei loxP-Sequenzen begrenzt wird, einem etwa 0,8 kB großen, die Punktmutation enthaltenden Bereich und dem etwa 5,5 kB großen 3'-Arm.

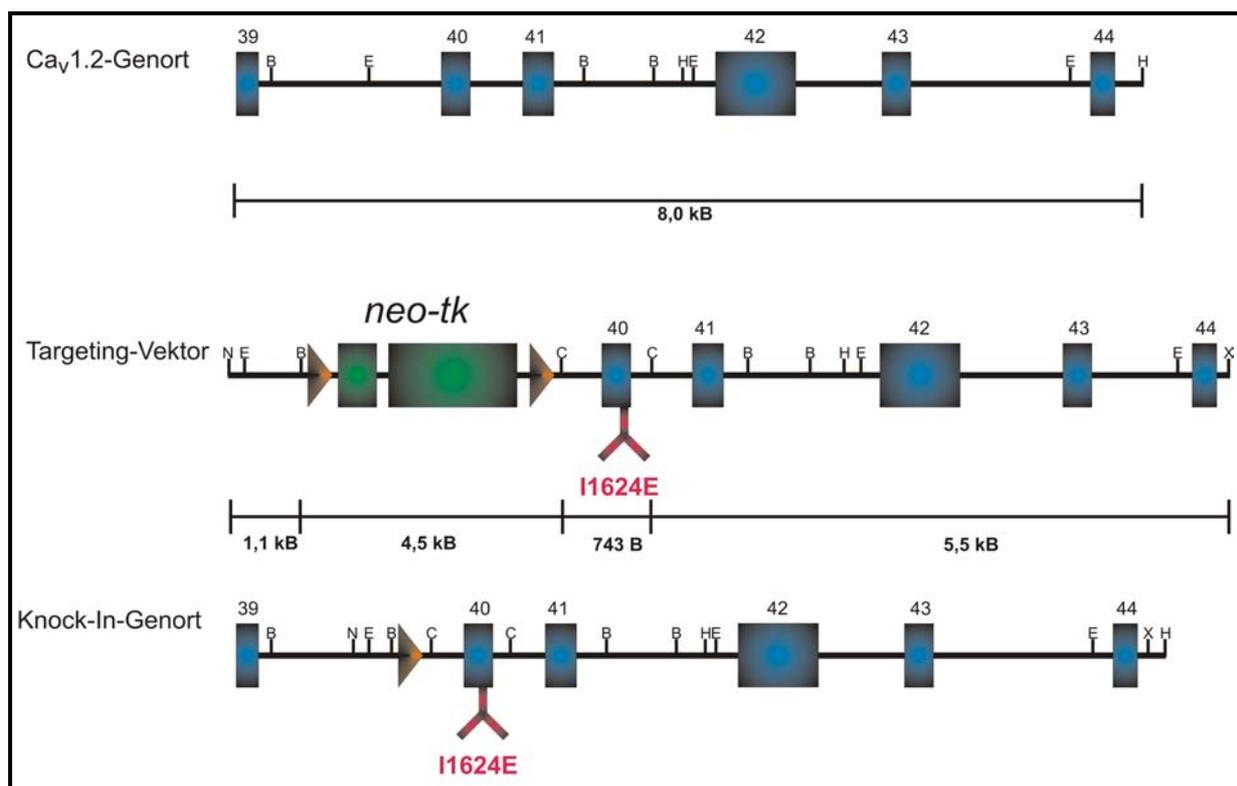


Abbildung 14 – $Ca_v1.2$ -Genort, Targeting-Vektor und Knock-In-Genort

3.1.1.1 Konstruktion des 5'-Armes

Die Primerpaarung pl_sc1_for und pl_sc21_rev lieferte in der PCR ein Produkt von etwa 1 kB Länge. Dieses Produkt wurde mit NotI und BamHI verdaut, in pB subkloniert und sequenziert. Es folgte ein weiterer Restriktionsverdau mit NotI und BamHI und die Umklonierung in pB-lox-neo/tk-lox.

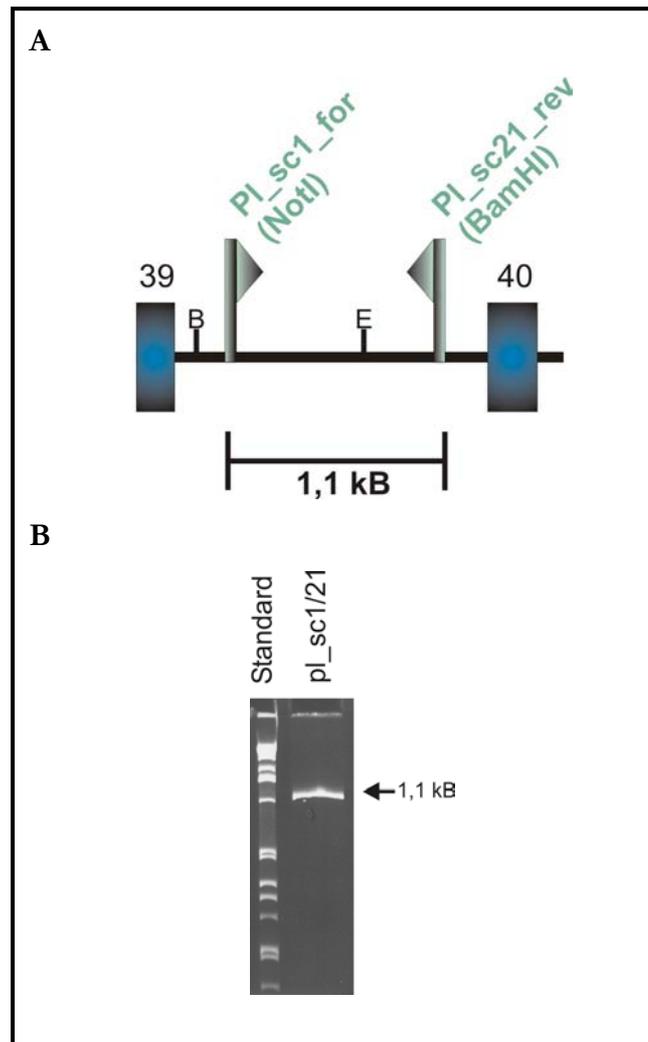


Abbildung 15 – (A) Konzept für Konstruktion des 5' Arms. (B) PCR mit Amplifikat.

3.1.1.2 Punktmutation von IQ

Das aus *pl_sc3_for* und *pl_sc4_rev* amplifizierte DNA-Stück wurde in pB subkloniert und sequenziert. Nun wurden mit Hilfe der Primerpaarungen *pl_sc3_for/IQ_DM_rev* und *IQ_DM_for/pl_sc4_rev* zwei sich überlappende, punktmutierte Produkte synthetisiert, die als Ausgangsmaterial für eine weitere PCR mit *pl_sc3_for* und *pl_sc4_rev* dienen. Das Triplet *ATC* (kodiert für Isoleucin) wurde dabei zu *CTC* (kodiert für Glutamat) ummutiert. Das resultierende Stück wurde in pB subkloniert und sequenziert.

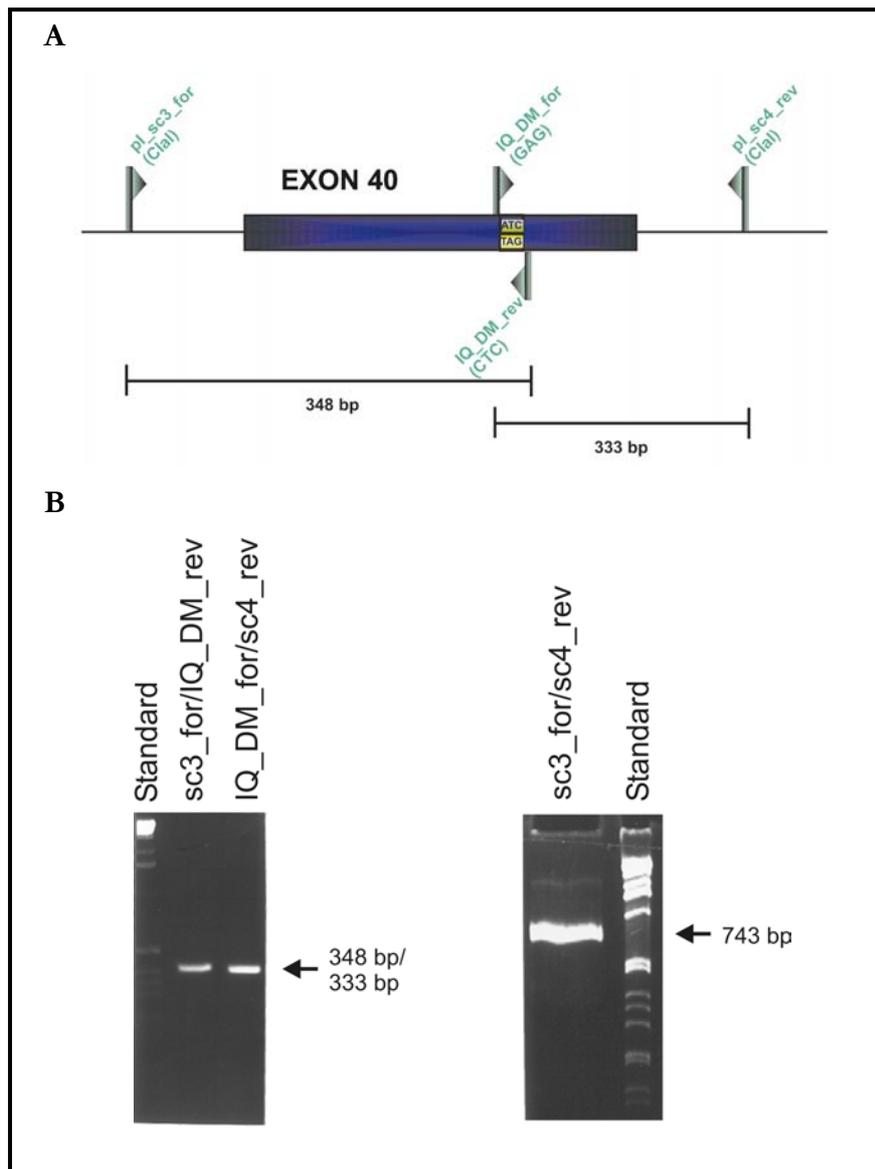


Abbildung 16 – (A) Konzept zur IQ-EQ-Punktmutation. (B) Amplifikate vor (links) und nach Overlap-PCR (rechts).

3.1.1.3 Konstruktion des 3'-Armes

Zunächst wurde mit den Primerpaarungen pl_sc5A_for/pl_sc5x1_rev und pl_sc6x2_for/pl_sc6_rev ein 2,7 kb bzw. ein 3 kb großes Amplifikat gebildet. Beide wurden in pB subkloniert, sequenziert und nach Verdau mit NsiI, XbaI und XhoI über eine Drei-Fragment-Ligation miteinander verbunden. Da die 5'-gelegene ClaI-Schnittstelle durch eine dam-Methylierung blockiert vorlag, wurden nicht-methylierende OneShot[®]-Inv 110-Bakterienzellen verwendet.

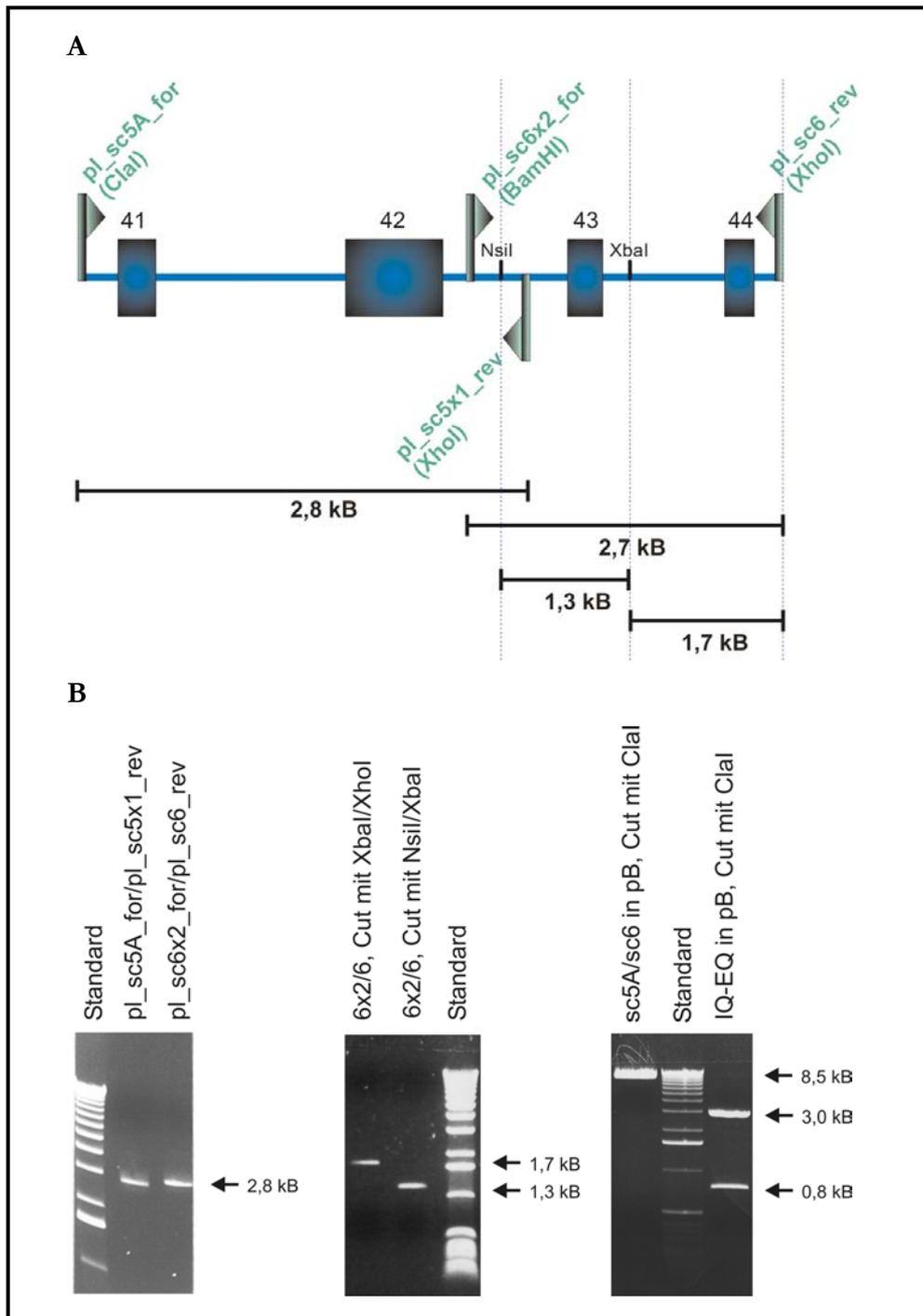


Abbildung 17 – (A) Konzept zur Konstruktion des 3'-Arms. (B) PCR-Ergebnisse (links), Restriktionsverdau von *sc6x2/sc6* (Mitte) und mit *Clal* verdauter 3'-Arm.

Das Konstrukt und der Vektor aus 3.1.1.2 wurden mit *Clal* geschnitten, ligiert und in pB subkloniert. Da dieser Vektor wieder in methylierenden XL-1-Blue-Zellen vermehrt wurde, trägt die 3'-gelegene *Clal*-Schnittstelle eine Methylgruppe. So kann man den kompletten 3'-Arm mit *Clal* und *XhoI* herauschneiden und in den pB-lox-neo/tk-lox-Vektor mit 5'-Arm aus 3.1.1.1 ligieren.

Ergebnisse

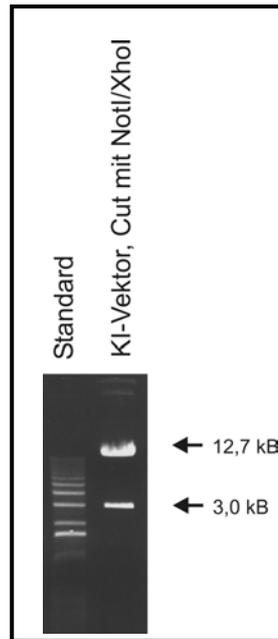


Abbildung 18 - Kompletter Targeting-Vektor mit NotI und XhoI verdaut.

Die Exons und Intron-Exon-Übergänge des gesamten Targetingvektor wurde nochmals sequenziert, bevor mit dem ersten Targeting fortgefahren wurde.

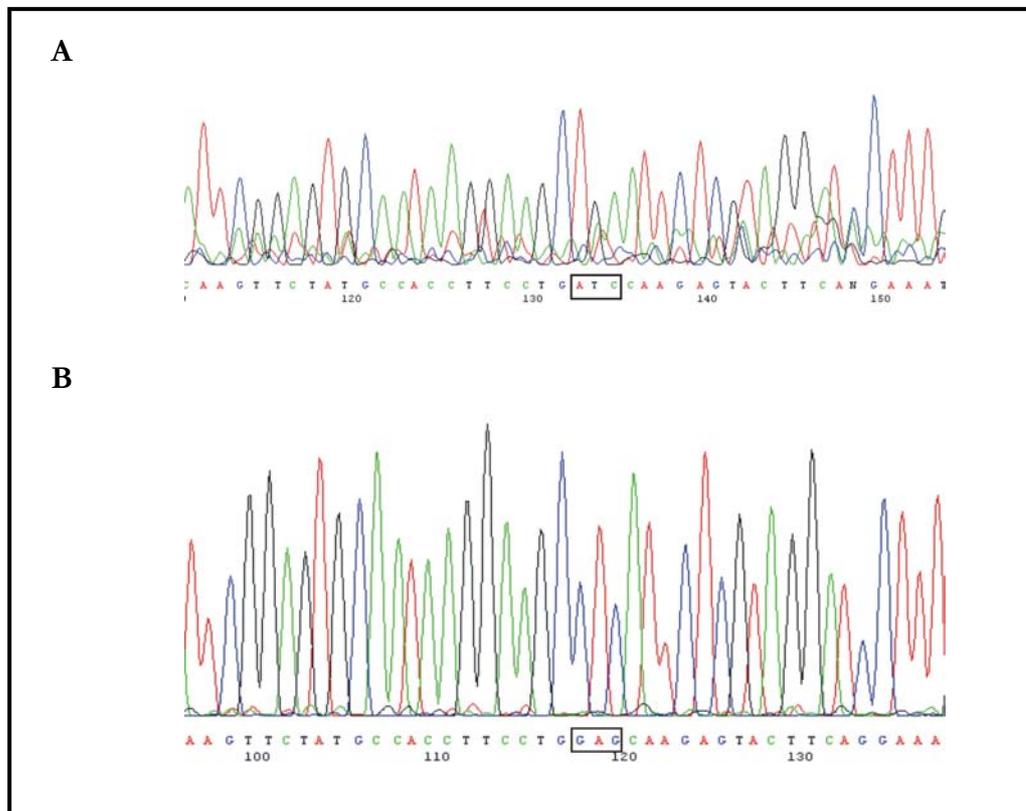


Abbildung 19 – Sequenzierung der Wildtyp-DNA (A) im Vergleich zum Targeting-Vektor (B). Das punktmutierte Basentriplett im Exon 40 (ATC zu GAG) ist markiert.

3.1.2 Etablierung der Screeningmethoden

3.1.2.1 PCR-Screening nach dem ersten Targeting

Upstream-Verlängerung des 5'-Armes

Um das PCR-Screening nach dem ersten Targeting zu etablieren, wurde upstream des 5'-Armes des Targeting-Vektors eine etwa 1,6 kb große Verlängerung in den Vektor eingefügt. Dazu wurden die beiden Primer pl_sc71_for und pl_sc8_rev verwendet. Das PCR-Produkt, das aus dieser Paarung resultierte, wurde mit NotI geschnitten und in den ebenfalls mit NotI geschnittenen Vektor aus 3.1.1.1 (5'-Arm in pB-lox-neo/tk-lox) ligiert.

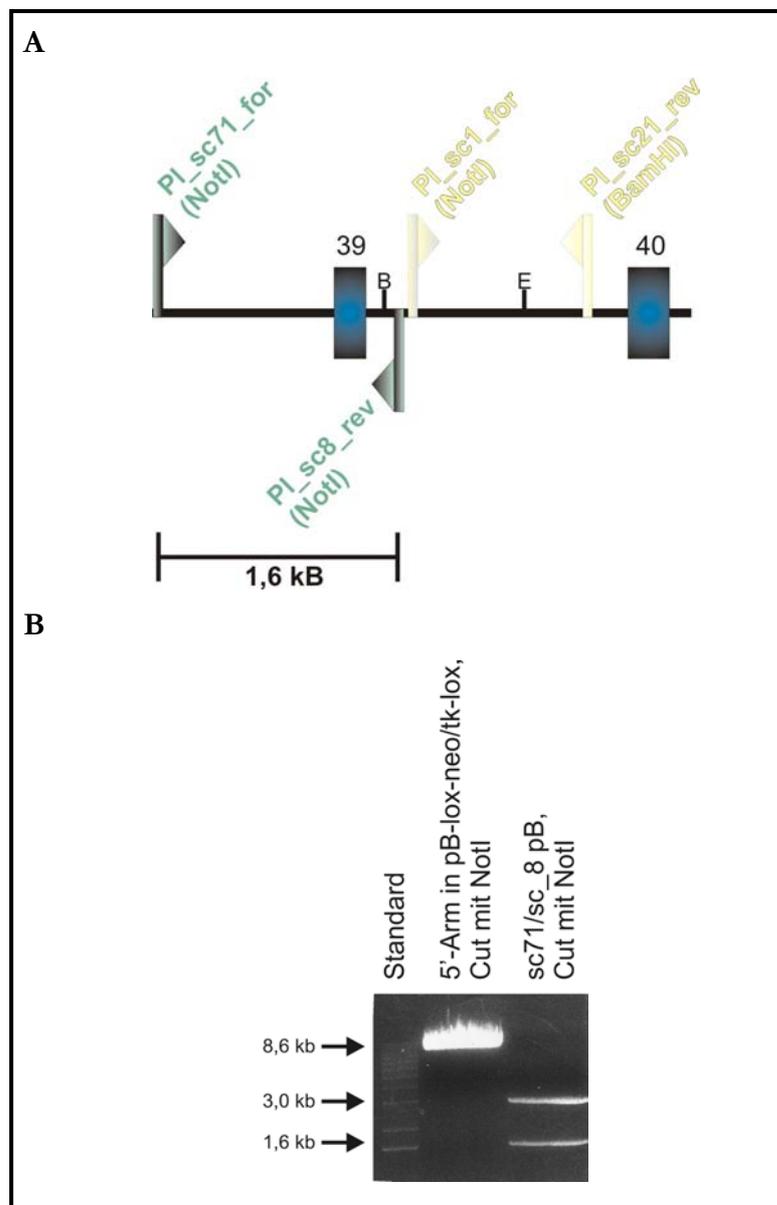


Abbildung 20 - Verlängerung des 5'-Armes. (A) Konzept zur Verlängerung. (B) Verdau der Vektoren

Ergebnisse

Bestimmung der Nachweisgrenze

Mit der Primerpaarung *pl_scr1_for* und *pl_RE2_rev* bildet sich ein 1,3 kb großes PCR-Amplifikat. Um die Nachweisgrenze der Screening-PCR zu bestimmen, wird der verlängerte Targeting-Vektor in 1/10-Schritten mit WT-ES-Zell-DNA verdünnt. Es konnten minimal 10 pg Vektor-DNA nachgewiesen werden.

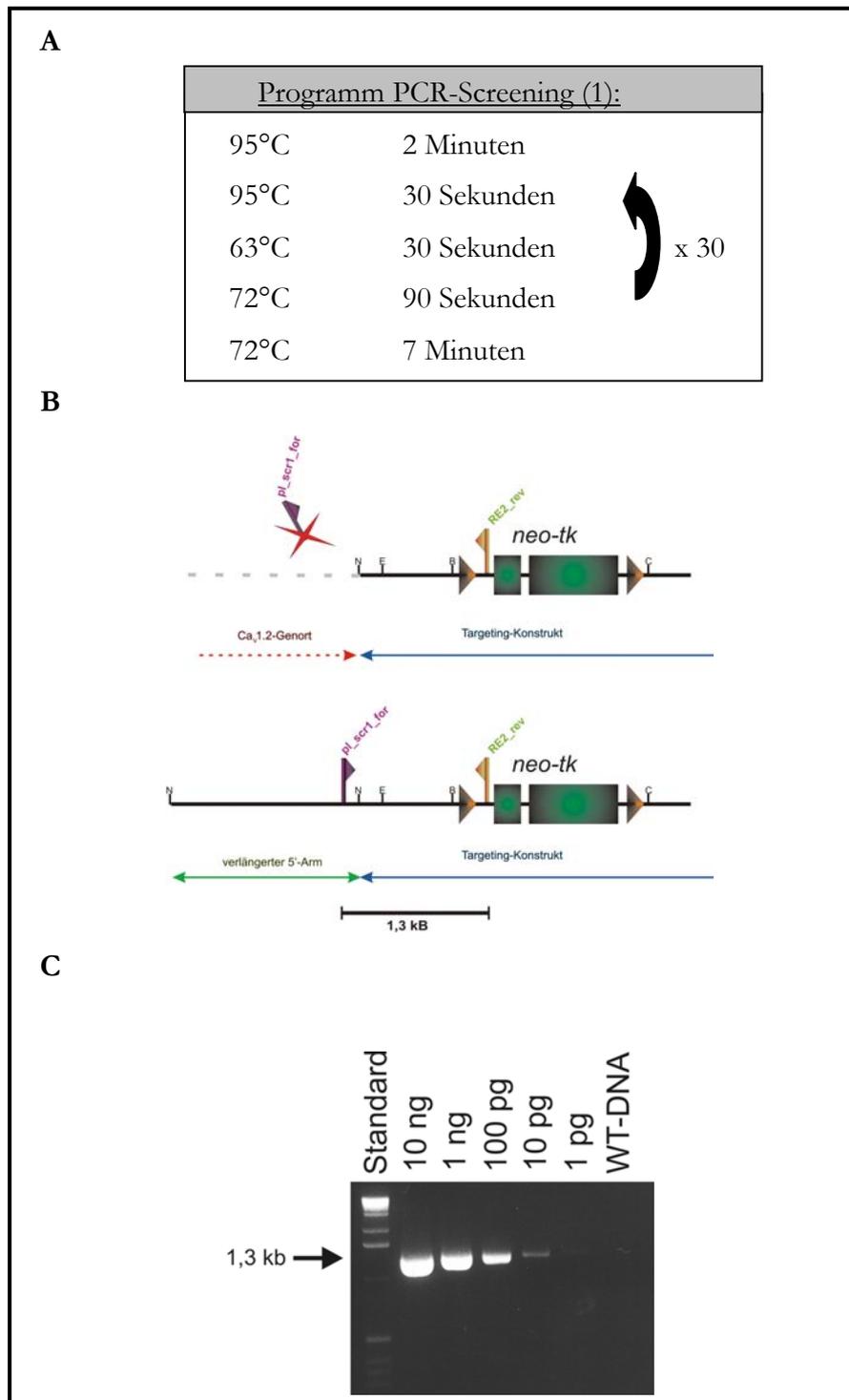


Abbildung 21 - Verdünnungsreihe PCR-Screening. (A) PCR-Programm für das Screening. (B) Konzept für das PCR-Screening. (C) PCR-Amplifikate der Verdünnungsreihe.

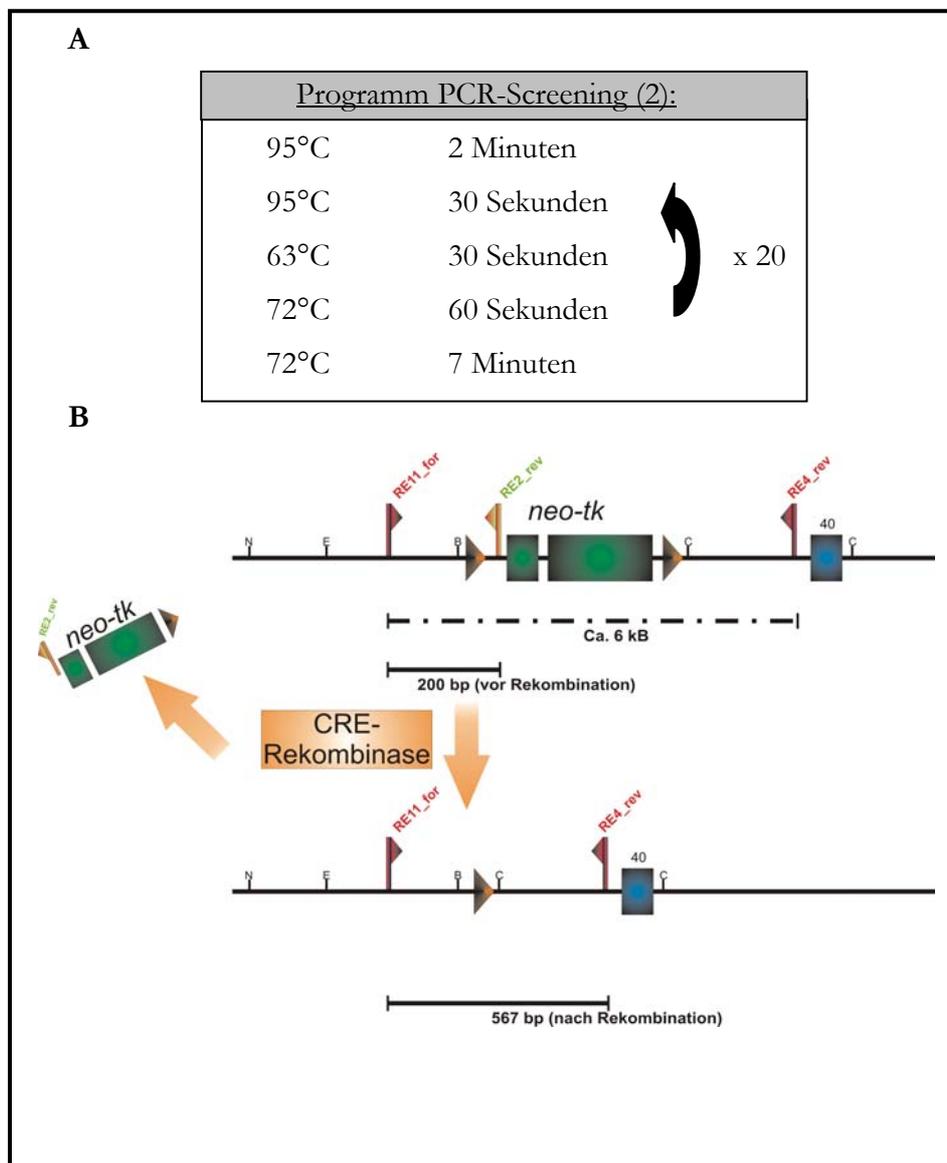
3.1.2.2 PCR-Screening nach dem zweiten Targeting

Cre-vermittelte Rekombination *in vitro*

Beim zweiten Targeting wird die „gefloxte“ neo-tk-Resistenzkassette durch Expression der Cre-Rekombinase aus dem Genom entfernt. Um das PCR-Screening nach dem zweiten Targeting zu etablieren, wurde dieser Vorgang durch Zugabe von Cre-Rekombinase zum Targeting-Konstrukt *in vitro* nachgestellt (siehe 2.1.12).

Etablierung der Screening-PCR

Mit den drei Primern pl_RE11_for, pl_RE2_rev und pl_RE4_rev bildeten sich die erwarteten PCR-Amplifikate vor und nach Inkubation mit Cre-Rekombinase.



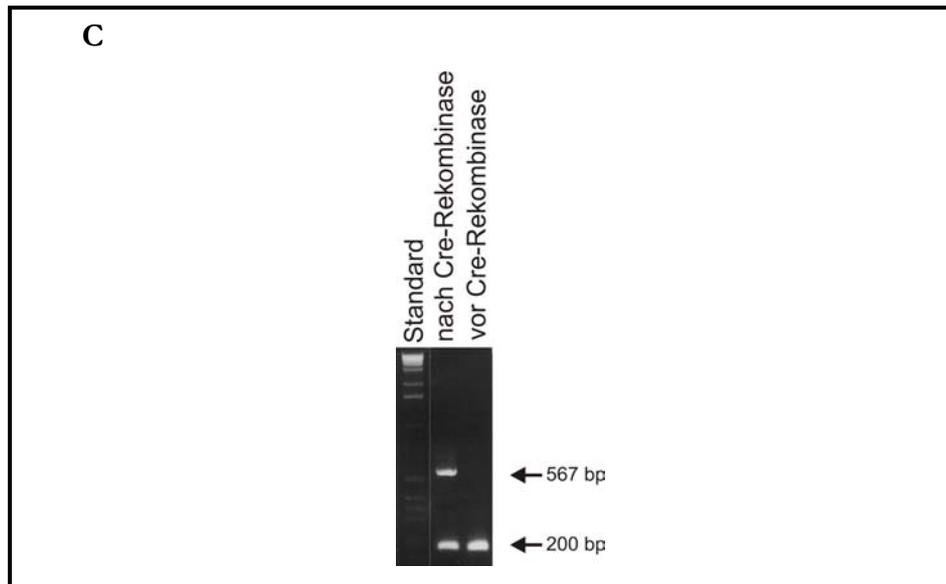
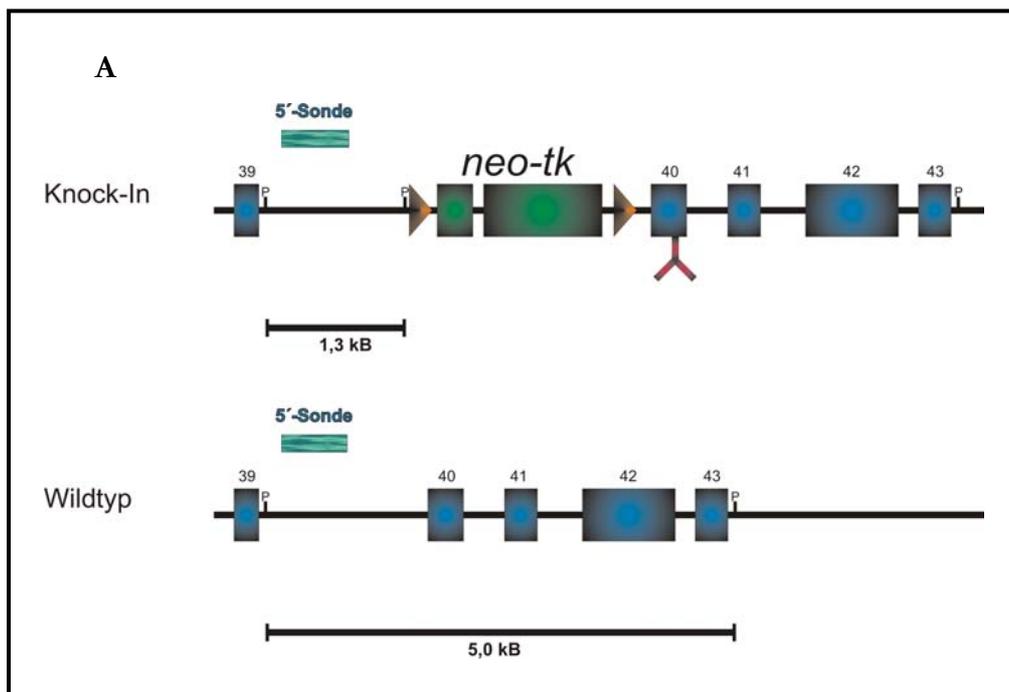


Abbildung 22 - Etablierung des PCR-Screenings nach dem 2. Targeting. (A) PCR-Programm. (B) Konzept für das Screening. (C) PCR-Amplifikate nach Cre-Rekombination *in vitro*.

3.1.2.3 Southern-Screening

Verdau der DNA mit PstI

Ein geeignetes Restriktionsenzym zum Verdau der DNA war PstI. In der WT-ES-Zell-DNA befinden sich zwei PstI-Schnittstellen, eine upstream des 5'-Armes des Targeting-Vektors und eine auf dessen 3'-Arm. Beim Restriktionsverdau resultiert an dieser Stelle ein 5 kb großes DNA-Fragment. Im Targeting-Vektor ist eine zusätzliche PstI-Schnittstelle zwischen BamHI (3'-Ende des 5'-Armes) und erster loxP-Sequenz vorhanden, so dass nach homologer Rekombination ein 1,3 kb großes DNA-Fragment gebildet wird.



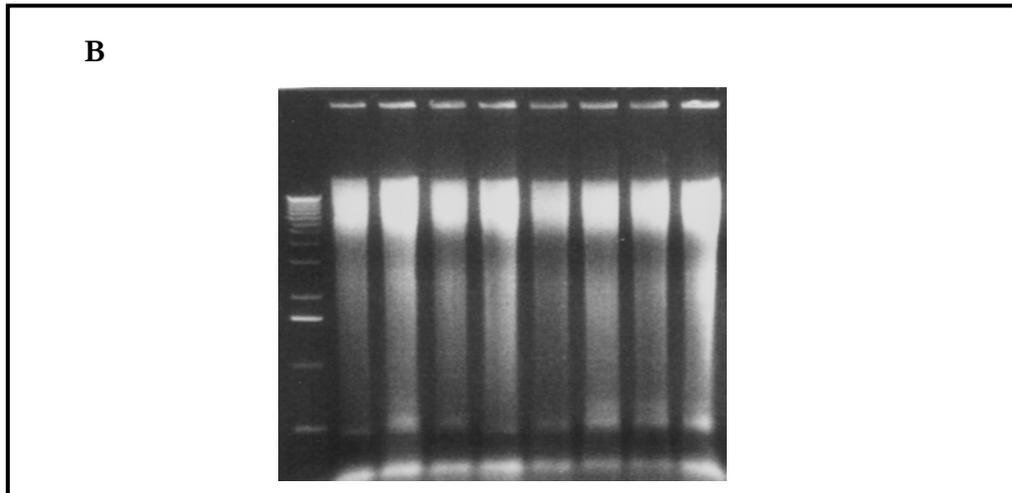
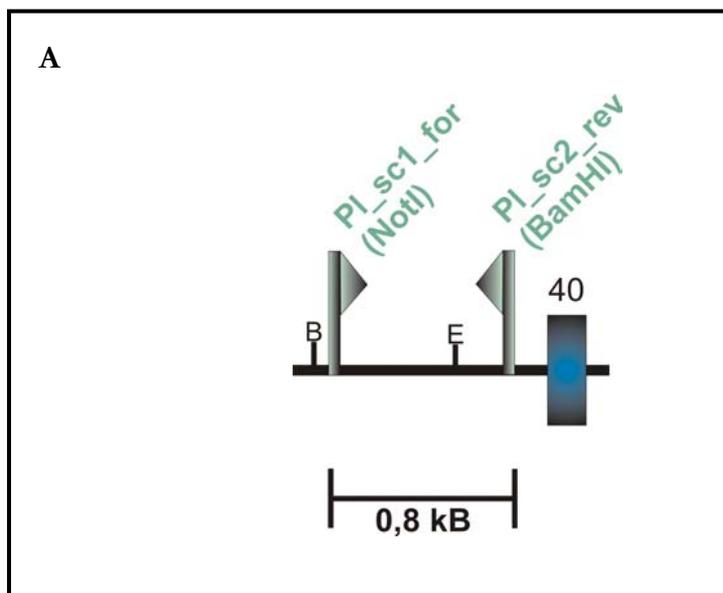


Abbildung 23 – Etablierung des Southern-Screenings. (A) Konzept für das Screening. Die PstI-Schnittstellen sind markiert (P). (B) Agarosegel nach Verdau von WT-DNA mit PstI.

Isolierung der Southern-Sonde

Als Sonde für das Southern-Screening wurde mit den Primern pl_sc1_for und pl_sc2_rev eine verkürzte Version des 5'-Armes des Targeting-Vektors gewählt. Sie wurde mit NotI und BamHI aus dem Vektor herausgeschnitten und radioaktiv markiert. Da das Fragment selbst Teil des Targeting-Vektors ist, kann mit ihm neben der homologen Rekombination eine mehrfache Integration des Vektors in das Genom überprüft werden.



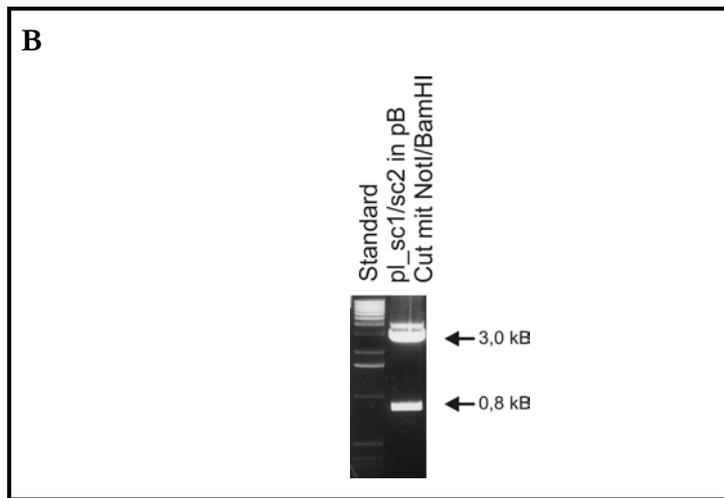


Abbildung 24 - Southern-Sonde. (A) Konzept für die Southern-Sonde. (B) Verdau der in pB subklonierten Sonde mit NotI und BamHI.

Inkubation der Sonde mit WT-DNA

Um die Spezifität der Southern-Sonde zu überprüfen, wurde die mit PstI geschnittene WT-ES-Zell-DNA mit der Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und mit der Sonde inkubiert. Dabei bildete sich, wie zu erwarten, eine 5 kb große Bande.

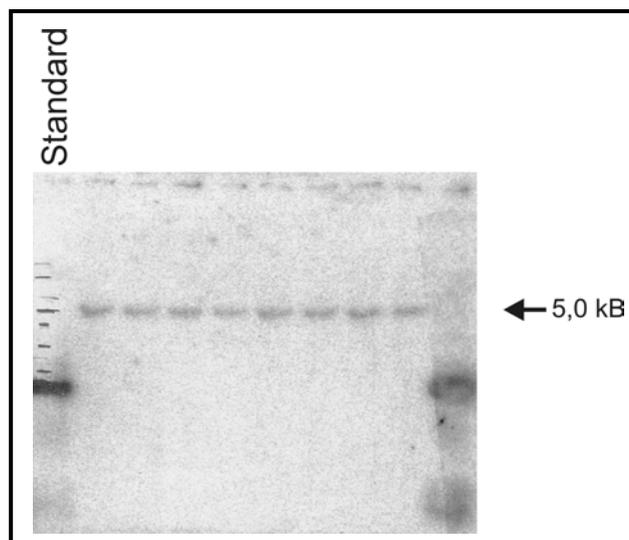


Abbildung 25 - 5,0 kb großes Signal nach Inkubation der WT-DNA mit der radioaktiven Sonde.

3.1.3 Erstes und zweites Targeting

3.1.3.1 Analyse positiver Klone des ersten Targetings mittels PCR

Nach Elektroporation und Selektion mit G418 wurden 500 Klone gepickt und mit PCR gescreent. Dabei erhielt man bei zwei Klonen (1D6 und 3G6) ein positives Signal.

Ergebnisse

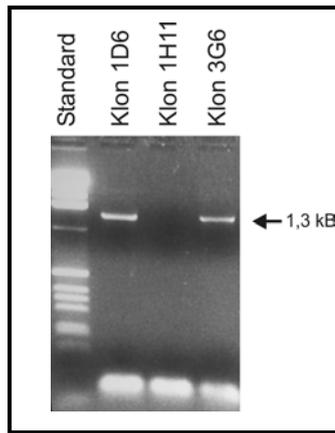


Abbildung 26 –Zwei positive und ein negativer ES-Zell-Klon, die durch das PCR-Screening ermittelt wurden.

3.1.3.2 Analyse positiver Klone des ersten Targetings mittels Southern-Blot

Die beiden mit PCR positiv gescreenten Klone wurden mit der Southern Blot-Technik nochmals überprüft. Auch hier konnte ein positives Signal erhalten werden.

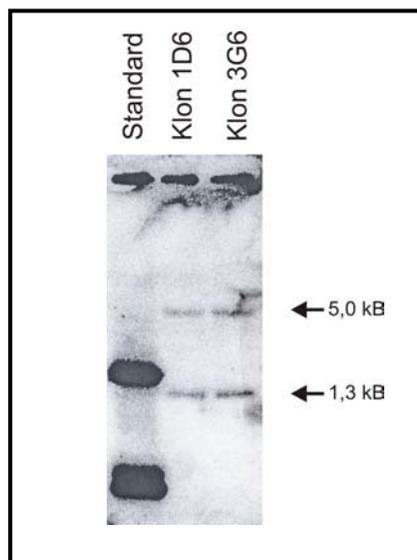


Abbildung 27 –Die mit PCR positiv gescreenten Klone bilden auch im Southern-Blot Banden auf der korrekten Höhe.

3.1.3.3 Analyse positiver Klone des zweiten Targetings mittels PCR

Die beiden Klone 1D6 und 3G6 wurden wieder in Kultur genommen und das zweite Targeting durchgeführt. Nach Selektion mit Ganciclovir konnten 102 bzw. 226 Klone gepickt und mit PCR gescreent werden. Ein Großteil der Klone zeigte die gewünschten Banden, eine der Größe 567 bp, die dem mutierten Allel entspricht, und eine der Größe 462 bp, die dem unmutierten

Ergebnisse

Wildtyp-Allel entspricht. Einige der Klone wurden wieder in Kultur genommen und für die Blastozysteninjektion herangezogen.

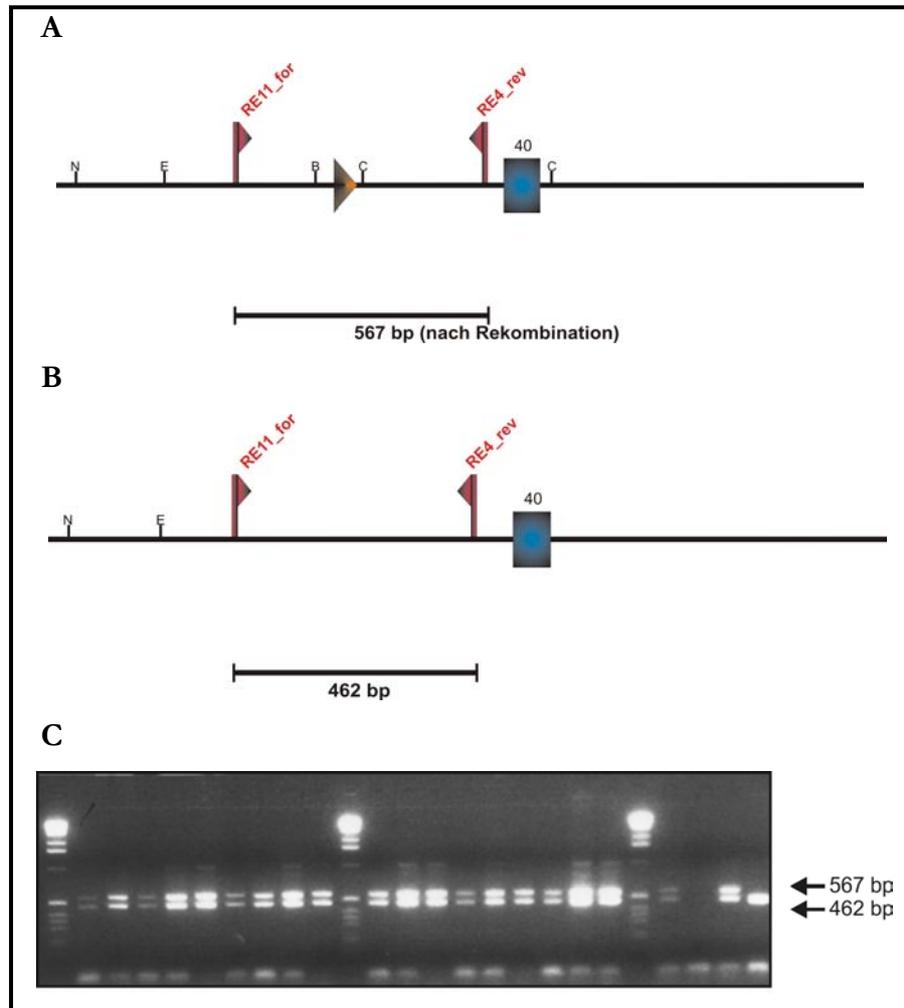


Abbildung 28 – PCR-Screening nach dem zweiten Targeting. (A) PCR im mutierten Allel. (B) PCR im Wildtyp-Allel. (C) Positiv gescreente Klone nach dem zweiten Targeting.

Ergebnisse

3.1.4 Blastozysteninjektion

Es wurden insgesamt 278 Blastozysten injiziert und reimplantiert. Dabei wurden 15 chimäre Mäuse unterschiedlichen Chimaritätsgrades erhalten.

Primärer ES-Zell-Klon	Sekundärer ES-Zell-Klon	Injizierte Blastozysten	Anzahl Chimären	Chimaritäts-Grad
3G6	1C1	29	0	
3G6	1B3	72	2	80 %, 75 %
3G6	1F3	34	0	
3G6	1H1	15	0	
3G6	1B7	14	0	
3G6	1C7	12	0	
3G6	1B8	19	0	
3G6	1D8	14	0	
3G6	1F10	11	0	
1D6	1C3	24	10	80 %, 80 %, 70 %, 50 %, 30 %, 25 %, 20 %, 10 %, 5 %, 5 %
1D6	1G2	5	0	
1D6	1B3	3	0	
1D6	1B4	17	1	30 %
1D6	1E4	9	2	35 %, 25 %

Tabelle 4 – ES-Zell-Klone der Blastozysten-Injektion

3.2 CaMKII-abhängige Phosphorylierung von Ca_v1.2

3.2.1 Elektrophysiologische Untersuchungen

Die im Folgenden dargestellten elektrophysiologischen Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Tae-Song Lee und Frau Dr. Andrea Welling angefertigt.

Bei elektrophysiologischer Untersuchung von HEK-Zellen, die α_{1C} und β_{2A} exprimieren, konnte eine Fazilitierung des Calciumeinstromes durch einen starken, positiven Präpuls nur bei gleichzeitiger Expression von CaMKII erreicht werden. Diese Fazilitierung konnte durch KN-93, einem spezifischen Inhibitor der CaMKII, unterdrückt werden. Auch die Punktmutation von Isoleucin 1649 („IQ-Motiv“) zu Glutamat unterdrückte die Fazilitierung.

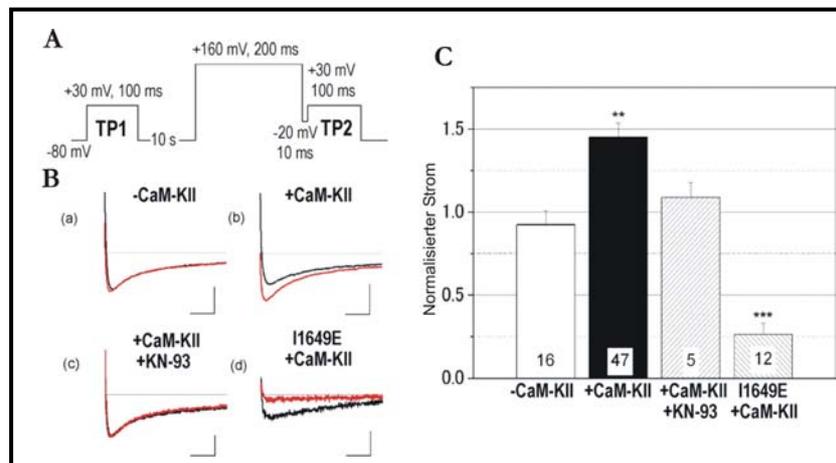


Abbildung 29 - Fazilitierung in HEK-Zellen. (A) Pulsprotokoll. (B) Calciumströme bei TP1 (schwarz) und TP2 (rot). Eine Fazilitierung findet erst nach Coexpression von CaMKII statt und wird durch deren Inhibierung mit KN-93 unterdrückt. Die Punktmutation I1649E zeigt keine Fazilitierung sondern starke, spannungsabhängige Inhibierung des Calciumeinstromes. (C) Statistische Auswertung von Daten aus (B).

Da eine Trunkierung der α_{1C} -Untereinheit bei Aminosäure 1728 keine Auswirkung auf die Fazilitierung des Kanals hatte und nach Vorarbeiten von Gao *et al.* (Gao *et al.* 2000) ausreichend in der Zellmembran integriert vorlag, wurde ausgehend von dieser Mutation die doppelmutierte Variante S1512A/S1570A elektrophysiologisch untersucht. Eine Fazilitierung durch CaMKII war hier nicht mehr nachweisbar, während die Inaktivierung des Kanals leicht erhöht war.

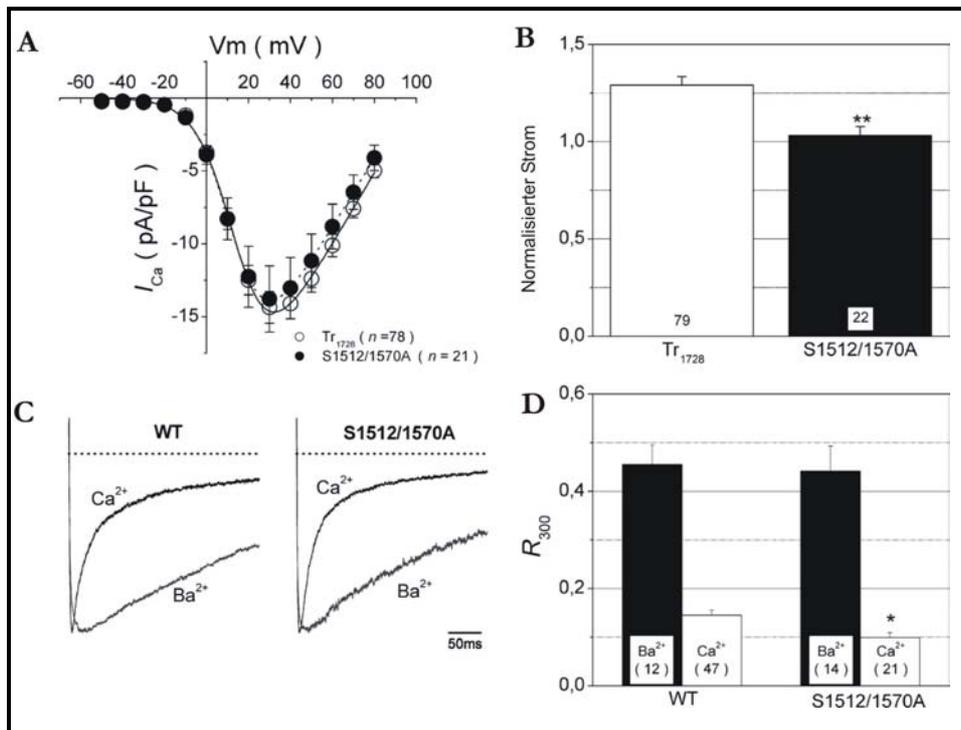


Abbildung 30 – Fazilitierung der S1512A/S1570A-Doppelmutante. (A) Vergleich der Strom-Spannungs-Beziehungen von Doppelmutante und trunkierter Variante des $Ca_v1.2$. (B) Normalisierter Calciumeinstrom von trunkierter Form und Punktmutante nach Fazilitierungs-Protokoll (siehe Abbildung 29). (C) Calcium- und Bariumeinstrom durch unmutierten (WT) und doppelmutierten (S1512/1570A) $Ca_v1.2$. (D) Reststrom nach 300 ms für die Ladungsträger Barium (schwarz) und Calcium (weiß).

3.2.2 Biochemische Analysen

3.2.2.1 Generierung von Expressionsvektoren für GST-Fusionsproteine

Als Ausgangsmaterial zur Generierung von GST-Fusionsproteinen wurde die cDNA der α -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals 1.2 verwendet, die bereits im Expressionsvektor pcDNA3 vorlag. Mit der Primerpaarung MOO_GST2_for und MOO_GST_1733_rev wurde ein etwa 800 bp großes Amplifikat erhalten, das den N-terminalen Teil des Carboxyterminus von $Ca_v1.2$ darstellt. Nach Verdau mit BamHI und XhoI wurde dieses so in den Vektor pGEX-6P-1 subkloniert, dass das Protein im korrekte Leserahmen exprimiert werden konnte.

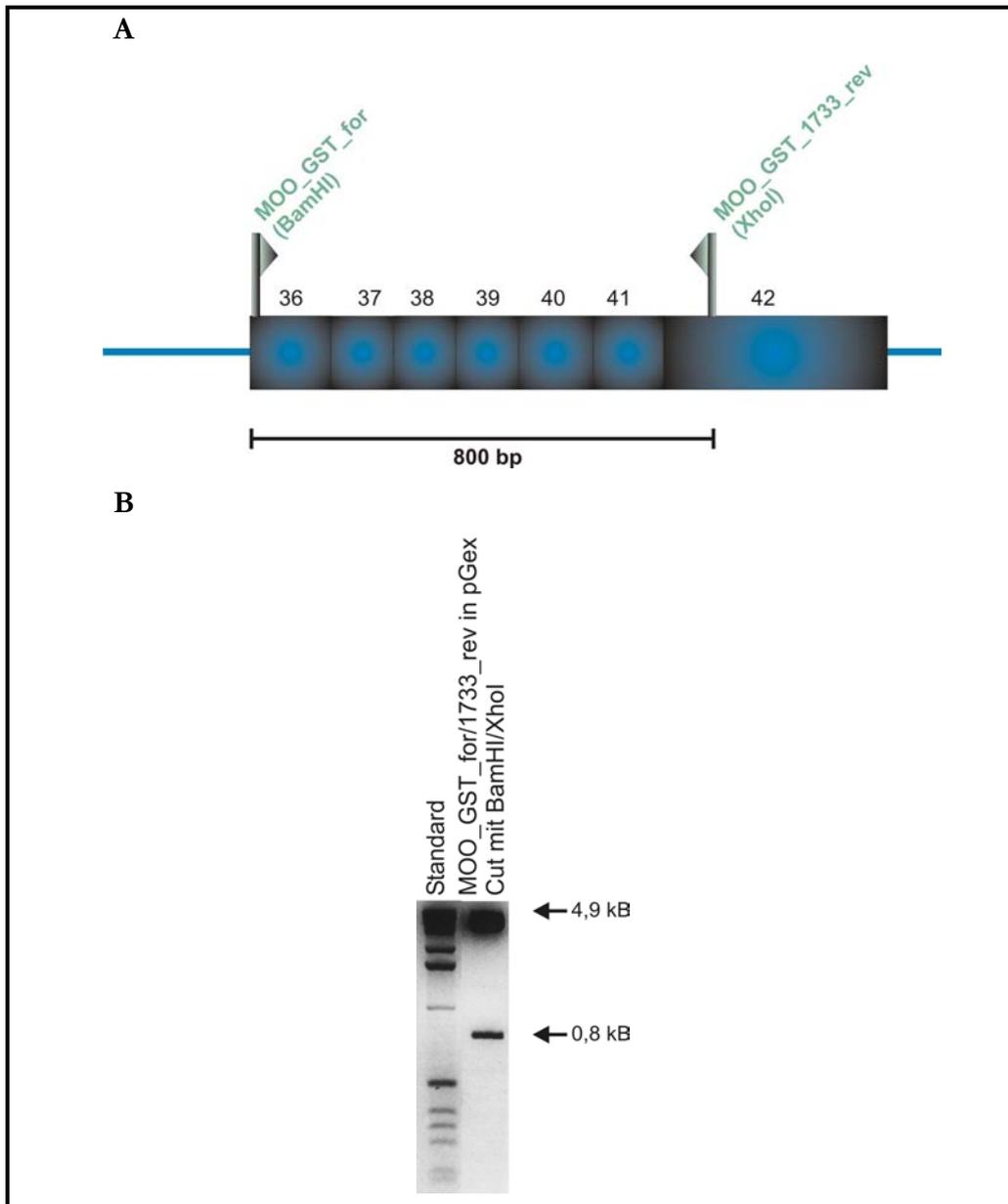


Abbildung 31 - (A) Konzept für unmutiertes GST-Fusionsprotein des Carboxyterminus aus Cav1.2-cDNA. (B) Carboxyterminus in pGEX, Probeverdau mit BamHI und XhoI.

Ausgehend von diesem Vektor wurde mit den Primern GST1_for, pl_OLS1512A_for/rev, pl_OLS1570A_for/rev, MOO_GST_1733_rev und der Overlap-PCR-Technik ein bei Serin 1512 und Serin 1570 doppelmutierter GST-Expressionsvektor generiert. Zum Nachweis der Mutationen wurde der Vektor sequenziert.

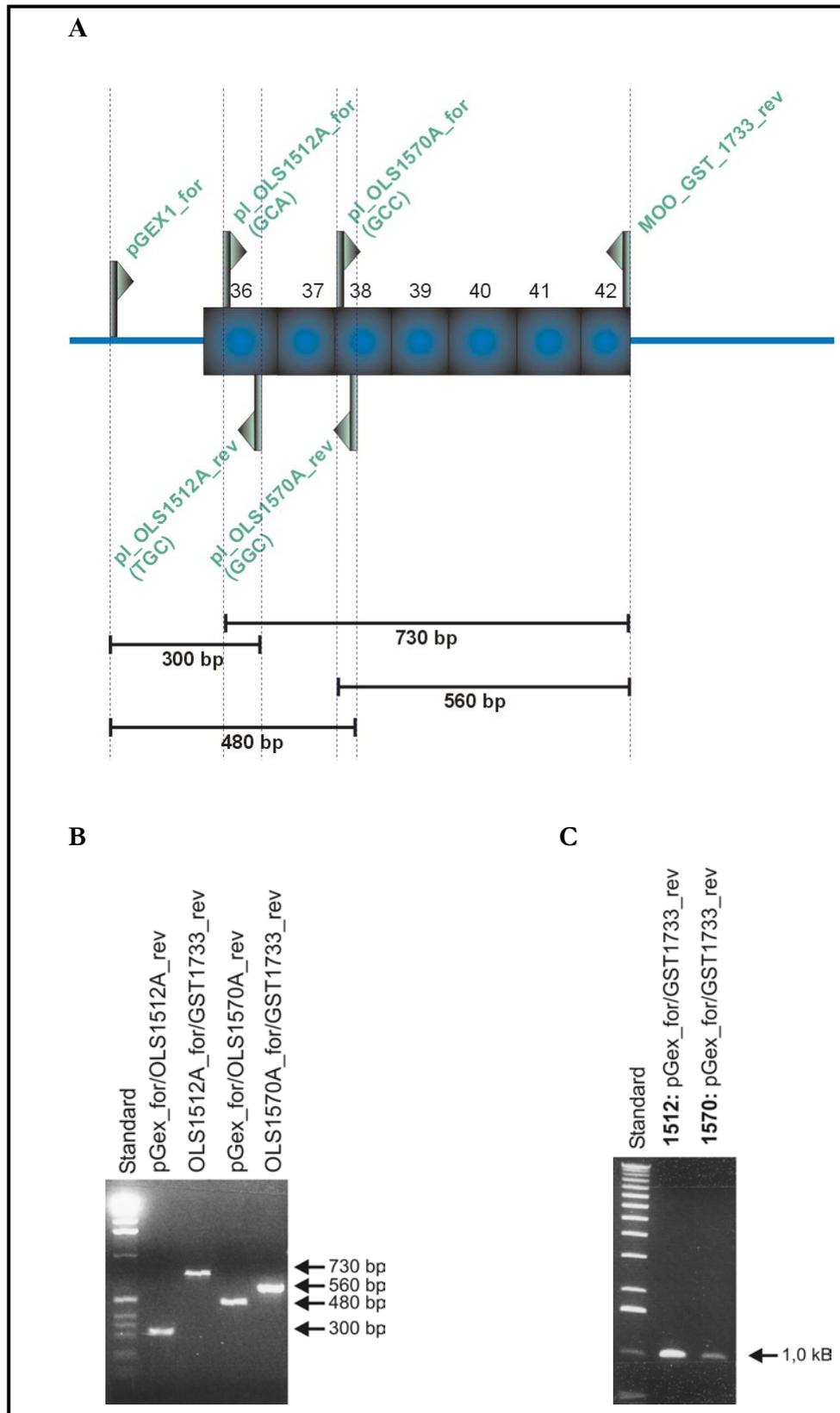


Abbildung 32 - (A) Konzept für Overlap-PCR des doppelt mutierten GST-Fusionsproteins. pGEX1_for bindet im pGEX-Vektor. (B) PCR-Banden der Einzelstücke nach Amplifikation. (C) PCR-Banden der punktmutierten Stücke.

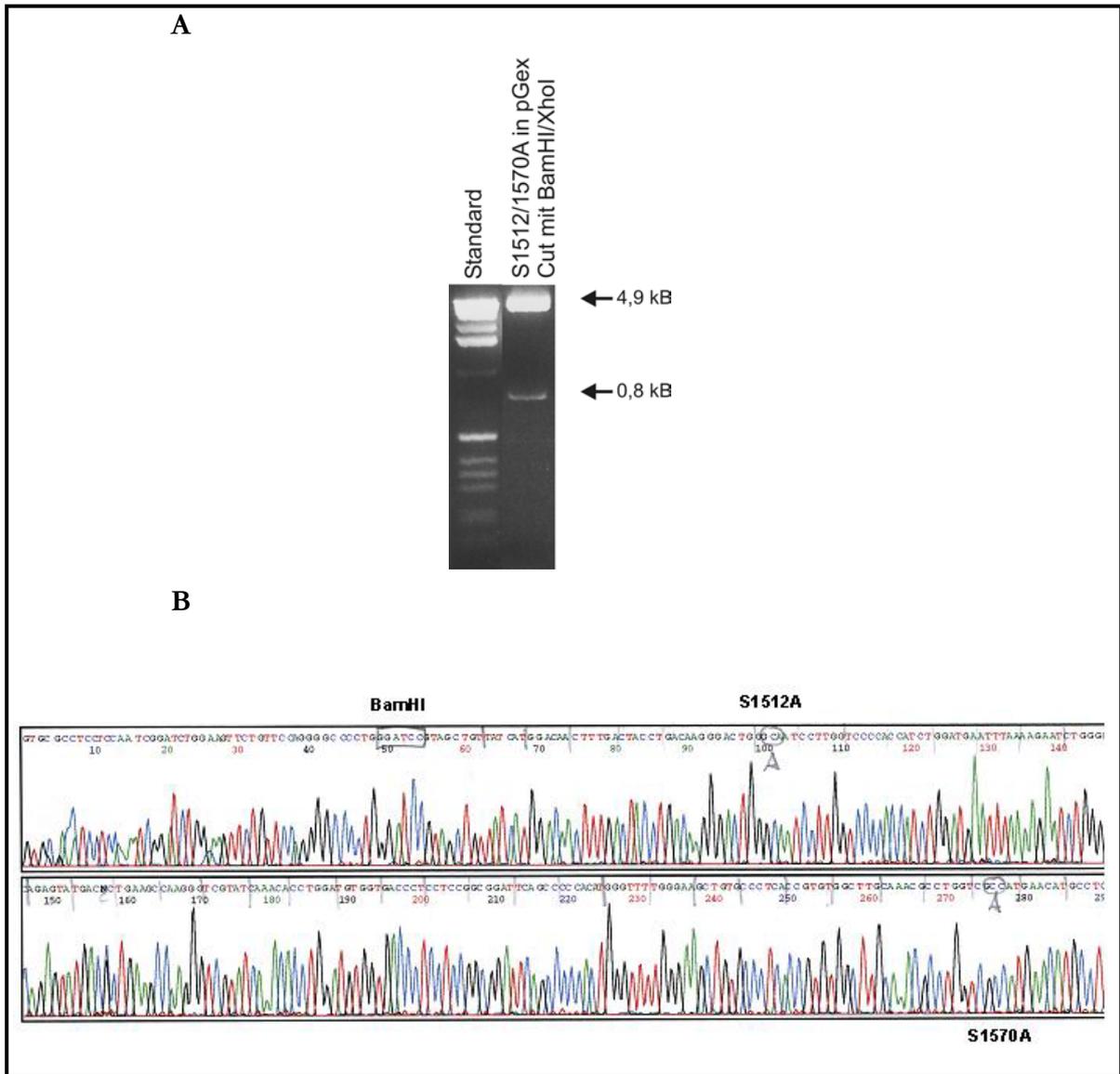


Abbildung 33 - (A) Fertige, doppelt punktmutierte DNA für das GST-Fusionsprotein in pGEX, Probeverdauer mit BamHI und XhoI. (B) Sequenz des Vektors, BamHI und die beiden S zu A-Mutationen sind gekennzeichnet.

3.2.2.2 Expression von GST-Fusionsproteinen

Im Vorversuch wurde eine Expression des doppelmutierten und des Wildtyp-GST-Fusionsproteins aus 3.2.2.1 nachgewiesen. Nach Aufreinigung wurden beide Produkte mit exogener CaMKII phosphoryliert (siehe 3.2.2.4).

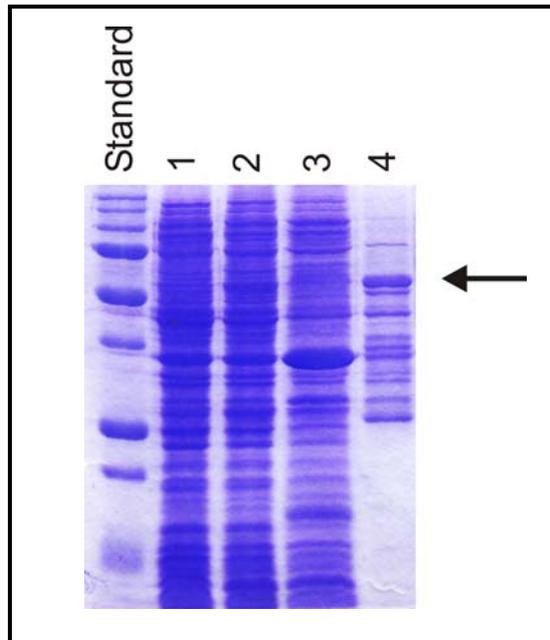
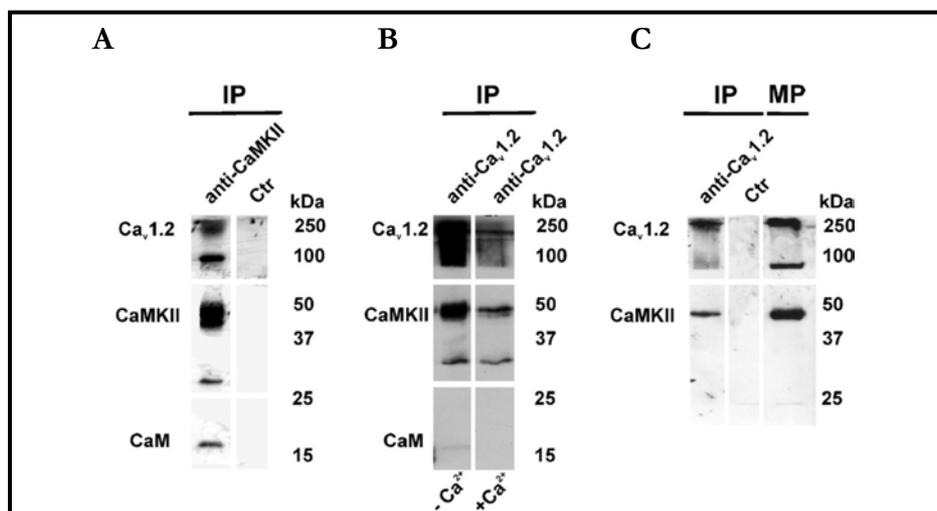


Abbildung 34 - Expressionsversuch für die SASA-Doppelmutante des GST-Fusionsproteins (markiert). 1: Vor Induktion mit IPTG. 2: Nach Induktion mit IPTG. 3: Pellet nach Ultraschall-Behandlung. 4: Eluat nach Bindung an GST-Sepharose.

3.2.2.3 Nachweis der Interaktion mittels der Coimmunpräzipitation

In HEK-Zellen, die die α_{1C} - und die β_{2A} -Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals sowie CaMKII-alpha exprimieren, kann mit der Coimmunpräzipitation eine Interaktion zwischen Calciumkanal und CaMKII nachgewiesen werden. Diese Interaktion findet ebenfalls im murinen Herz statt. Keinen Einfluss auf die Interaktion hat die Verwendung calciumfreier Lösungen. Auch die Trunkierung des Carboxyterminus des Calciumkanals nach Aminosäure 1728 oder das Punktmutieren der beiden Serine 1512 und 1570 zu Alanin oder von Isoleucin 1649 zu Glutamat verändern nicht die CaMKII-Bindung an den Calciumkanal.



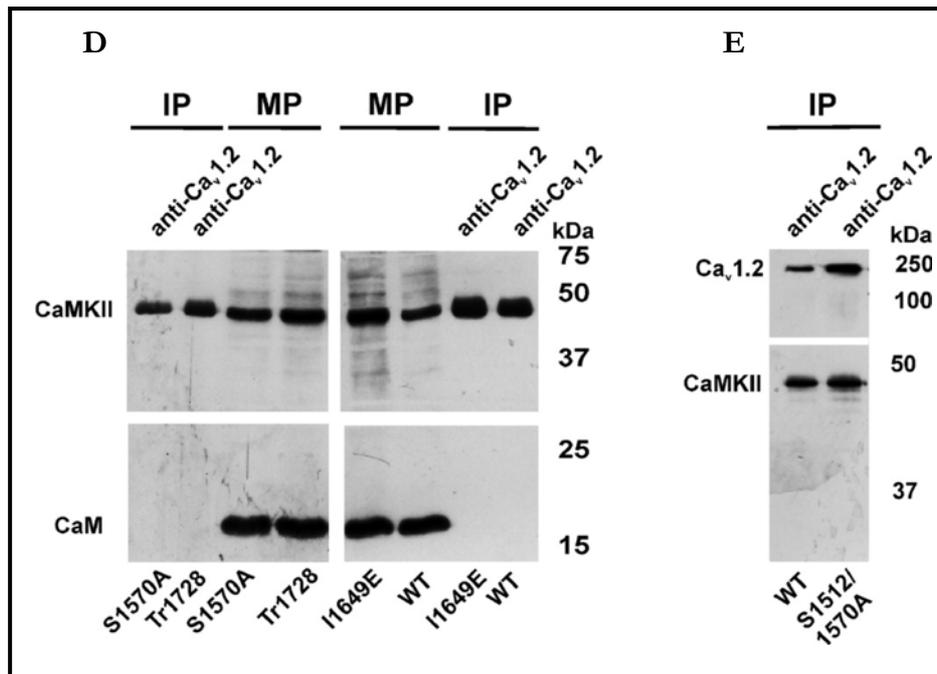


Abbildung 35 - Interaktion zwischen Cav1.2, CaMKII und CaM in HEK-Zellen und murinem Herz. (A) Coimmunopräzipitation in murinen Cardiomyozyten, gefällt mit anti-CaMKII oder (B) anti-Cav1.2 in calciumhaltiger (+Ca²⁺) oder calciumfreier (-Ca²⁺) Lösung. (C) Membranpräparation (MP) und Coimmunopräzipitation (IP) in HEK-Zellen, die α_{1C} , β_{2A} und CaMKII exprimieren. Fällung mit anti-Cav1.2. (D)(E) Membranpräparation und Coimmunopräzipitation in HEK-Zellen mit anti-Cav1.2 und punktmutierten oder trunkierten Varianten von α_{1C} .

3.2.2.4 Phosphorylierung

Die α -Untereinheit des Calciumkanals wird nach Zugabe exogener CaMKII sowohl im murinen Herzen als auch in der HEK-Zelle phosphoryliert. Gibt man keine exogene CaMKII zu oder lässt Calcium/Calmodulin aus dem Reaktionsansatz weg, wird diese Phosphorylierung unterdrückt. Die Punktmutationen S1512A/S1570A bewirken ebenfalls eine Verringerung der Phosphorylierung. GST-Fusionsproteine, die die gleiche Doppelmutteration tragen, werden nicht mehr von CaMKII phosphoryliert.

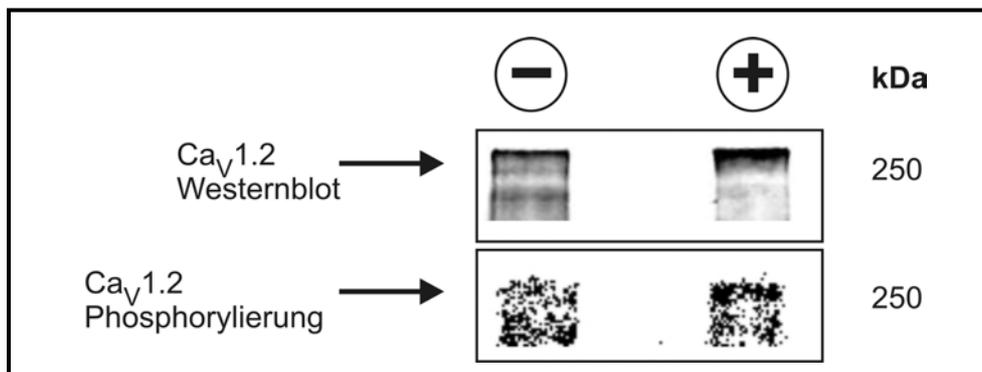


Abbildung 36 - Phosphorylierung in WT-Herz mit CaMKII. +: Zugabe exogener CaMKII. —: Keine exogene CaMKII.

Ergebnisse

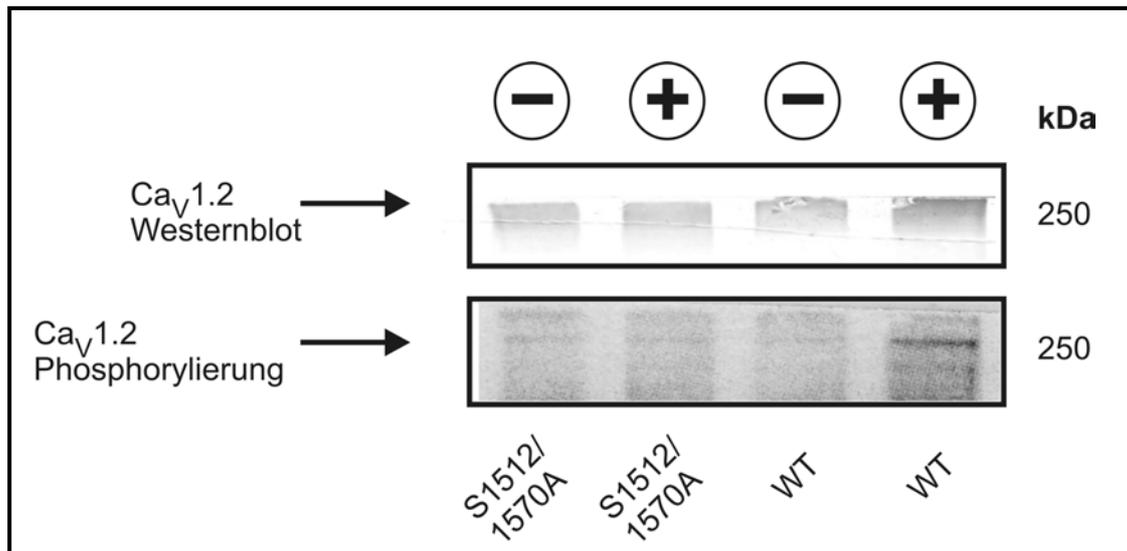


Abbildung 37 - Phosphorylierung in HEK-Zellen. + : Zugabe exogener CaMKII. — : Keine exogene CaMKII.

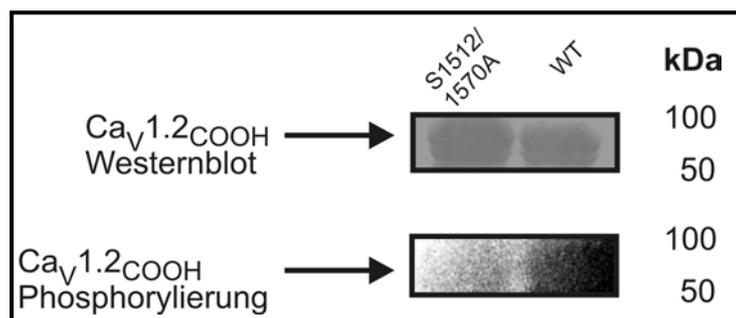


Abbildung 38 - Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen.

4 Diskussion

Die Selbstregulation spannungsabhängiger Calciumkanäle ist für die Funktion dieser Proteine entscheidend wichtig. Die mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen entdeckten Mechanismen der Inaktivierung sowie der Fazilitierung spannungsabhängiger Calciumkanäle sind Gegenstand intensiver pharmakologischer und biomedizinischer Forschung. Viele Studien haben Calmodulin und dessen Interaktion mit dem Carboxyterminus des $Ca_v1.2$ als Dreh- und Angelpunkt beider Phänomene ausmachen können (Halling *et al.* 2005 (Review); Lee *et al.* 1999; Peterson *et al.* 1999). Unklar blieb jedoch die Beteiligung von CaMKII an der Fazilitierung. (Kamp *et al.* 2000).

4.1 Die Rolle von CaMKII bei der Fazilitierung von $Ca_v1.2$

Die positive Frequenz-Kraft-Beziehung kardialer Muskelkontraktionen ist ein seit Jahrzehnten bekanntes Phänomen: Eine Erhöhung der Pulszahl geht einher mit einer Verstärkung der Auswurfkraft des Herzens. Man spricht dabei auch vom „Treppeneffekt“ oder „staircase effect“ (Koch-Weser and Blinks 1963). Während körperlicher Beanspruchung wird so eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Organismus garantiert. Einen Zusammenhang zwischen erhöhter Frequenz und einem Anstieg des Calciumeinstromes auf elektrophysiologischer Ebene („Fazilitierung“) konnten Noble und Shimoni an isolierten Froschherzen nachweisen (Noble and Shimoni 1983a). Dieser Effekt konnte auch durch die Applikation eines starken, depolarisierenden Präpulses erreicht werden (Noble and Shimoni 1983b).

Verschiedene Gruppen wiesen eine Beteiligung der Calmodulin-abhängigen Kinase II an der Fazilitierung nach (McCarron *et al.* 1992; Xiao *et al.* 1994; Yuan and Bers 1994), und 1988 konnte gezeigt werden, dass die α -Untereinheit von $Ca_v1.2$ durch CaMKII phosphoryliert wird (Jahn *et al.* 1988). Der genaue Ort dieser Phosphorylierung wurde jedoch nicht bestimmt. Dzhura *et al.* zeigten in ihren Experimenten, dass $Ca_v1.2$ durch CaMKII in einen Zustand mit erhöhter Öffnungswahrscheinlichkeit („Modus 2“) versetzt wird. Anders als bei beta-adrenerger Stimulation werden dabei länger andauernde Öffnungen des Kanals beobachtet (Dzhura *et al.* 2000). Die Ergebnisse späterer Arbeiten sprachen für eine Co-Lokalisation von Kanal und Kinase in Herzmuskelzellen (Dzhura *et al.* 2002; J *et al.* 2005).

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte eine calciumunabhängige Interaktion zwischen $Ca_v1.2$ und CaMKII in HEK-Zellen mit Hilfe der Coimmunpräzipitation nachgewiesen werden (siehe 3.2.2.3). Diese Bindung bleibt von der „IQ-zu-EQ-Mutation“ im IQ-Motiv des Carboxyterminus

unbeeinflusst. Aktuelle Befunde einer anderen Arbeitsgruppe bestätigen eine Interaktion zwischen Kanal und Kinase (Hudmon *et al.* 2005). Diese Gruppe charakterisierte außerdem biochemisch die Bindungsstelle CaMKII-Ca_v1.2, die im Carboxyterminus des Kanals an aa 1639-1660 liegt. Funktionell hob Mutation des Kanals an der Bindungsstelle die Fazilitierung auf.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass sich CaMKII nach Bindung an den Carboxyterminus von Ca_v1.2 in direkter Nähe der Kanalpore befindet. Dort führt ein verstärkter Calciumeinstrom durch den Kanal (z.B. bei positiver Chronotropie) sehr schnell zu erhöhten subzellulären Calciumspiegeln (Bers 2002) und damit zu einer veränderter Aktivierung des CaM-/CaMKII-Systems (Hudmon *et al.* 2005). Die CaMKII wäre also prädestiniert als Signalmolekül für die Regulation der Herzauswurfleistung.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde weiterhin gezeigt, dass HEK-Zellen, die die α - und β -Untereinheit des Ca_v1.2 exprimieren, nur bei Coexpression der CaMKII einen erhöhten Calciumeinstrom nach einem starken, positiven Präpuls zeigen (siehe 3.2.1). Dieser Effekt kann durch KN-93, einen spezifischen Inhibitor der CaMKII, unterdrückt werden.

Zu einer Unterdrückung kam es auch nach Mutation der beiden Serine 1512 und 1570, putativer Phosphorylierungsstellen der CaMKII im Ca_v1.2-Carboxyterminus. Die Inaktivierung des Kanals blieb nahezu unbeeinflusst (siehe Abbildung 30), was für zwei voneinander unabhängige Mechanismen für Fazilitierung und Inaktivierung spricht (Lee *et al.* 2006). Nach Punktmutation von Isoleucin 1649 zu Glutamat (IQ zu EQ) wurde die Fazilitierung komplett ausgeschaltet.

Auf biochemischer Ebene konnte dieses Ergebnis mit Hilfe radioaktiver Phosphorylierungs-Experimente bestätigt werden (siehe 3.2.2.4): Die unmutierte α -Untereinheit des Ca_v1.2 wird durch CaMKII in Cardiomyozyten und HEK-Zellen in Anwesenheit von Calciumionen und Calmodulin phosphoryliert, die doppelt punktmutierte Variante des Kanals dagegen sehr viel schwächer. Auch GST-Fusionsproteine, die den N-terminalen Teil des Carboxyterminus von Ca_v1.2 tragen, können nur in der unmutierten Form von CaMKII phosphoryliert werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass 1. die CaMKII entscheidend für die Fazilitierung des Ca_v1.2 ist und 2. hierfür die beiden Serine 1512 und 1570 im Carboxyterminus des Ca_v1.2 durch die CaMKII phosphoryliert werden müssen.

Eine andere Arbeitsgruppe identifizierte kürzlich eine weitere Phosphorylierungsstelle der CaMKII in der β -Untereinheit von Ca_v1.2 (Grueter *et al.* 2006), die für die calciumabhängige Fazilitierung des Kanals von Bedeutung zu sein scheint. In der Arbeit wurde allerdings ein anderes elektrophysiologisches Fazilitierungsprotokoll (gleichbleibende Depolarisationen von -80 mV auf 0 mV bei 0.5 Hz) als in der vorliegenden Doktorarbeit gewählt, so dass ein direkter Vergleich der Ergebnisse schwierig ist. Jedoch weisen die Resultate darauf hin, dass

möglicherweise zwei synergistische Fazilitierungsmechanismen existieren, die beide von CaMKII abhängen.

Dass die CaMKII-abhängige Phosphorylierung von Ca_v1.2 auch in pharmakologischer Hinsicht eine wichtige Rolle spielt, zeigt eine Arbeit, in der die neurotoxischen Wirkungen des Immunsuppressivums Cyclosporin mit der Erhöhung des I_{Ca} durch Ca_v1.2 in Verbindung gebracht werden (Erxleben *et al.* 2006). Cyclosporin inhibiert Calcineurin, eine Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase, die unter anderem für die Dephosphorylierung von Serin 1512 verantwortlich gemacht wird. Nach Phosphorylierung von Serin 1512 verbleibt der Kanal im „Modus 2“ (häufige Öffnungen mit längerer Dauer), und es strömt vermehrt Calcium in die Zelle ein, ohne dass eine Gegenregulierung durch Calcineurin stattfinden kann. Es kommt also zu einem Calciumüberschuss, der bei längerer Anwendung von Cyclosporin neurotoxische Effekte nach sich zieht.

Weiterhin wird in der Arbeit gezeigt, dass beim sogenannten „Timothy-Syndrom“ durch eine Punktmutation in der S6-Helix der ersten Transmembran-Domäne von Ca_v1.2 eine Erkennungssequenz für die CaMKII entsteht. Der Kanal wird dadurch vermehrt phosphoryliert und in Modus 2 versetzt, so dass es auch hier zu einem erhöhten Calciumeinstrom kommt. Die Patienten leiden dabei an Arrhythmien, und es kommt zu QT-Zeit-Verlängerung, zum Zusammenwachsen von Fingern und Zehen (Syndaktylien) und Autismus (Splawski *et al.* 2004, 2005).

4.2 Generierung der EQ-Maus

Bei calciumabhängigen Regulationsprozessen von Ca_v1.2 spielt das carboxyterminale Ende des Kanals eine wichtige Rolle. Wie im vorherigen Absatz dargestellt, findet dort einerseits Bindung und Phosphorylierung des Kanals durch CaMKII statt. Andererseits ist der Carboxyterminus unerlässlich für die calciumabhängige Inaktivierung. Diese wird durch genetische Entfernung des „IQ-Motivs“ des Kanals komplett ausgeschaltet (Zuhlke and Reuter 1998). Es zeigte sich, dass schon das alleinige Punktmutieren des IQ-Motivs (Isoleucin zu Glutamat) ausreichte, sowohl die calciumabhängige Inaktivierung, wie auch die Fazilitierung des Kanals aufzuheben (Zuhlke *et al.* 1999). Das IQ-Motiv ist eine Konsensussequenz für das calciumbindende EF-Hand-Molekül Calmodulin (CaM; Rhoads and Friedberg 1997), so dass es nahe lag, den Einfluss von CaM auf die calciumabhängige Regulation von Ca_v1.2 zu untersuchen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten CaM als Schaltstelle für diese Prozesse ausmachen, fanden jedoch neben dem IQ-Motiv noch weitere Interaktionsmotive innerhalb des Ca_v1.2-Carboxyterminus (Zuhlke *et al.* 1999; Erickson *et al.* 2001; Pitt *et al.* 2001; Tang *et al.* 2003). Die „IQ-zu-EQ-Mutation“ im IQ-Motiv

führt zu einer 100fach verringerten Bindung von CaM an den Carboxyterminus (Zuhlke *et al.* 2000).

Calcium muss für die CaM-Ca_v1.2-Interaktion nicht an CaM binden: Apo-CaM, das durch genetische Veränderung kein Calcium binden kann, bleibt bei physiologischen intracellulären Calciumspiegeln im Ruhezustand (10 – 100 nM) weiterhin mit Ca_v1.2 assoziiert (Pitt *et al.* 2001). Allerdings findet durch Expression von apo-CaM keine calciumabhängige Inaktivierung mehr statt (Zuhlke *et al.* 1999, Peterson *et al.* 1999). Wird dagegen die CaM-Bindung an den Kanal durch dessen Mutation unterbunden, beschleunigt sich die calciumabhängige Inaktivierung (Kim *et al.* 2004). Diese Befunde deuten darauf hin, dass CaM bei geschlossenem Kanal präassoziiert mit dem Carboxyterminus vorliegt und in diesem Zustand wie eine Bremse auf die calciumabhängige Inaktivierung wirkt. Sobald sich der Kanal öffnet, bindet Calcium an CaM und die „Bremse“ wird gelöst (Pitt 2007).

Neben dem Carboxyterminus scheint die ins Cytoplasma hineinragende Verbindungsdomäne der Motive I und II des Kanals (I-II-Linker; siehe 1.3) eine wichtige Rolle bei der CDI zu spielen. Das EF-Hand-Motiv des Carboxyterminus könnte den I-II-Linker binden und so die Kanalpore verschließen (Cens *et al.* 1999; Stotz *et al.* 2000). Für dieses Modell spricht, dass ein Komplex aus CaM und dem Ca_v1.2-Carboxyterminus den I-II-Linker binden kann (Kim *et al.* 2004). Zudem beinhaltet der I-II-Linker die Interaktionsstelle mit der Ca_v1.2-β-Untereinheit, die die Inaktivierung des Kanals stark beeinflusst (Pragnell *et al.* 1994).

Ergänzt wird dieses Modell durch den Befund, dass beim spannungsabhängigen Calciumkanal Ca_v1.4 keine calcium-, sondern nur spannungsabhängige Inaktivierung des I_{Ca} stattfindet (Wahl-Schott *et al.* 2006, Singh *et al.* 2006). Dabei scheint die Interaktion einer für diesen Kanalsubtyp charakteristischen, inhibitorischen Domäne im Carboxyterminus mit der EF-Hand des Kanals von entscheidender Bedeutung zu sein. Wird diese Domäne carboxyterminal des IQ-Motivs an Ca_v1.2 fusioniert, wird auch dieser nicht mehr calciumabhängig inaktiviert.

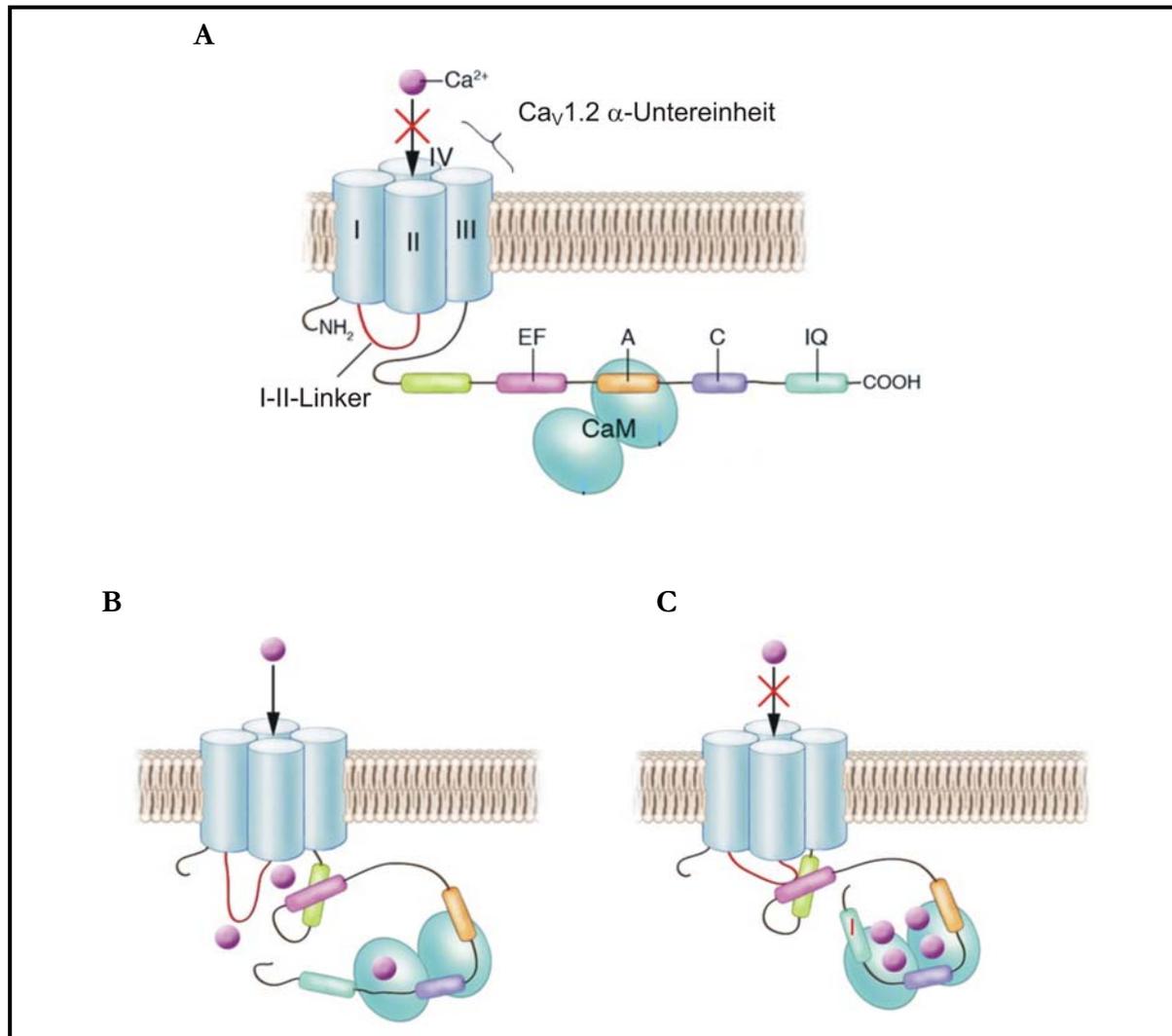


Abbildung 39 - Modell zur CDI (nach Bodi *et al.* 2005). (A) Cav1.2 im geschlossenen Zustand. CaM ist mit dem Carboxyterminus am A-Motiv präassoziiert. (B) Aktivierung des Kanals. Einströmendes Calcium bindet an CaM, und es kommt zur Konformationsänderung des Carboxyterminus. (C) Calciumabhängige Inaktivierung des Kanals. Das EF-Hand-Motiv bindet den I-II-Linker, die Kanalpore wird verschlossen.

Da bisher kein *in vivo*-Modell zur Untersuchung der calciumabhängigen Regulation vorlag, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Maus generiert, die eine Punktmutation im IQ-Motiv des Carboxyterminus trägt. In Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen (Zuhlke *et al.* 1999) sowie in unseren eigenen Ergebnissen (Lee *et al.* 2005) fand in HEK-Zellen nach Austausch von Isoleucin zu Glutamat weder calciumabhängige Inaktivierung noch Fazilitierung des Kanals statt.

Deshalb wurde ein Targeting-Vektor erstellt, der ebenfalls diese Punktmutation trägt, sich aber ansonsten in den exonischen Bereichen nicht von der Wildtyp-DNA unterscheidet. Intronic trägt der Vektor zusätzliche Schnittstellen, die bei der Subklonierung eingeführt wurden und zum Southern-Blot-Screening verwendet werden können, und eine „gefloxt“ neo-tk-Resistenzkassette. Der Vektor wurde durch homologe Rekombination in das Genom muriner embryonaler Stammzellen integriert. Nach Überprüfung mit PCR und Southern-Blot wurde die

neo-tk-Kassette mit Hilfe der Cre-Rekombinase aus dem Genom entfernt und die Klone nochmals mit PCR gescreent. Die positiven Klone wurden in Blastozysten injiziert und diese in scheinchwangere Weibchen transplantiert. Die chimären männlichen Nachkommen wurden mit Wildtyp-B16-Weibchen verpaart, um heterozygote Junge zu erhalten.

4.3 Ausblick

4.3.1 CaMKII-abhängige Fazilitierung

Durch die Analyse der beiden konkreten Aminosäuren S1512 und S1570, die für die Fazilitierung des $Ca_v1.2$ verantwortlich sind, ist eine weitergehende Untersuchung dieses Regulationsmechanismus möglich. Um die Bedeutung dieser Stellen *in vivo* zu bestimmen, müsste eine Maus generiert werden, in der durch doppelte Mutation (z.B. Serin zu Alanin) der Kanal nicht mehr durch die CaMKII phosphoryliert werden könnte.

4.3.2 Zucht und Untersuchung homozygoter EQ-Mäuse

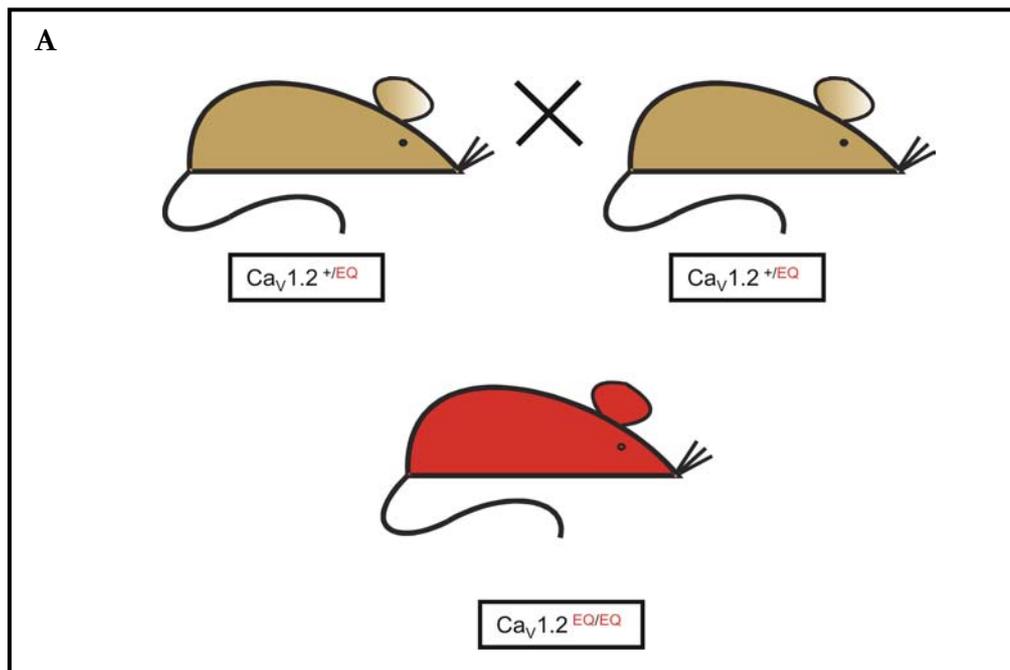
Um homozygote Mäuse zu züchten, verpaart man heterozygote Männchen und Weibchen. Der Phänotyp dieser sowie der heterozygoten Mäuse konnte im Rahmen dieser Arbeit noch nicht untersucht werden, es stehen hierfür jedoch eine Vielzahl von Experimenten zur Verfügung. Sollten die homozygoten Mäuse lebensfähig sein, muss im Westernblot der Proteinlevel des $Ca_v1.2$ in verschiedenen Organen analysiert werden. Mit der Membranpräparation kann bestimmt werden, ob der Kanal weiterhin in die Membran eingebaut wird, oder im Endoplasmatischen Retikulum verbleibt (Wang *et al.* 2007). Auf elektrophysiologischer Ebene sollte nach Zühlke *et al.* (Zühlke *et al.* 1999) weder calciumabhängige Inaktivierung noch Fazilitierung möglich sein.

Die wichtige Rolle von $Ca_v1.2$ im ZNS wurde bereits erwähnt (siehe 1.2): Mäuse, denen der Kanal in Hippocampus und Cortex genetisch entfernt wurde, weisen Defizite im räumlichen Lernverhalten auf. Auf elektrophysiologischer Ebene ist die LTP, und auf biochemischer Ebene die neuronale Aktivierung des ERK-Signalweges stark reduziert (Moosmang *et al.* 2005a). Auch für die „EQ-Maus“ werden aufgrund des Wegfallens der calciumabhängigen Regulationsmechanismen des $Ca_v1.2$ veränderte Lern- und Verhaltensmuster erwartet, jedoch bleibt abzuwarten, welche konkreten Auswirkungen dies haben wird. Hier sollen verschiedene Verhaltensversuche und elektrophysiologische Messungen Aufschluss bringen.

Es ist durchaus möglich, dass die Deregulation des Calciumeinstromes durch die Punktmutation im IQ-Motiv einen letalen Defekt für die homozygoten Mäuse darstellt. Wie in 4.1 dargestellt, kommt es z.B. beim Timothy-Syndrom (Übermäßiger Calciumeinstrom durch punktmutierten $Ca_v1.2$) zu lebensbedrohlichen Arrhythmien.

Um die Auswirkung der IQ-zu-EQ-Mutation bei der Maus in unterschiedlichen Geweben auch bei eventueller Letalität einer komplett homozygoten Knock-In-Maus zu untersuchen, stehen das Cre-loxP-System (Rajewsky *et al.* 1996; Metzger and Feil 1999) und die $Ca_v1.2$ -Knockout-Maus zur Verfügung (Seisenberger *et al.* 2000). Bei dieser sind die Exone 14 und 15, die für die Kanalpore des $Ca_v1.2$ codieren, mit zwei loxP-Sequenzen flankiert (L2) und werden erst nach Expression der Cre-Rekombinase aus dem Genom entfernt. Dabei bleibt eine loxP-Sequenz im Genom zurück (L1). Cre-Rekombinase kann konstitutiv oder induzierbar über gewebsspezifische Promotoren (z.B. Nestin im kompletten ZNS (Tronche *et al.* 1999), MerCreMer im Herzen (Verrou *et al.* 1999), SM-Ki im glatten Muskel, induzierbar durch Tamoxifen (Kuhbandner *et al.* 2000)) exprimiert werden.

Verpaart man die „geflochten“ Tiere mit heterozygoten IQ-EQ-Mäusen, erhält man Tiere, die auf einem Allel die Punktmutation und auf dem anderen den geflochten Calciumkanal tragen. Da diese Information gewebsspezifisch entfernt wird, kommt hier nur noch das punktmutierte Protein zum tragen.



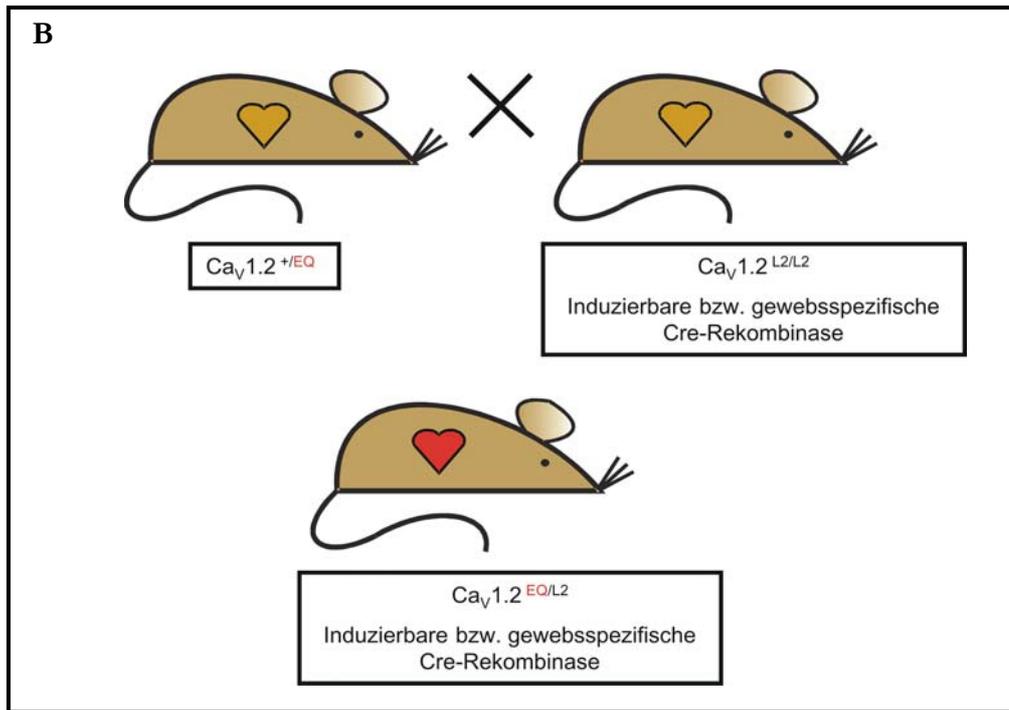


Abbildung 40 - (A) Zucht von homozygoten Mäusen. (B) Zucht gewebsspezifischer Knock-In-Mäuse.

5 Zusammenfassung

Die Aufklärung der Regulation spannungsabhängiger Calciumkanäle gehört zu den herausforderndsten Gebieten pharmakologischer Forschung. Gerade die Beteiligung an Physiologie und Pathophysiologie des Herz-Kreislauf-Systems weisen auf die Bedeutung dieser Membranproteine und ihrer Aktionspartner hin. Obwohl bereits seit Jahrzehnten auf diesem Gebiet geforscht wird und eine Vielzahl an Arbeiten vorliegt, existiert noch kein Tiermodell, mit dem das IQ-Motiv, eine wahrscheinlich entscheidende Schaltstelle im Carboxyterminus des Ca_v1.2, untersucht werden kann.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine genetisch veränderte Maus generiert, die im Carboxyterminus des spannungsabhängigen Calciumkanals Ca_v1.2 eine Punktmutation (Isoleucin 1624 zu Glutamat) trägt. Diese Mutation befindet sich im sogenannten „IQ-Motiv“, einer Aminosäuresequenz, die für die calciumabhängige Inaktivierung und Fazilitierung des Kanals *in vitro* benötigt wird. Anhand dieses Tiermodells soll erstmals die Bedeutung des IQ-Motivs *in vivo* untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die für die Fazilitierung des Kanals verantwortlichen Aminosäuren im Carboxyterminus des Ca_v1.2 erforscht. Es wurde sowohl auf elektrophysiologischer wie auch auf biochemischer Ebene gezeigt, dass die beiden Serine 1512 und 1570 essenziell für die Fazilitierung sind. Sie müssen dazu von CaMKII phosphoryliert werden.

Auch wenn dem behandelnden Arzt mit den Calciumkanal-Blockern schon heute wichtige Werkzeuge zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen an die Hand gegeben sind, bergen andere Angriffspunkte der Calciumkanäle möglicherweise großes Potential. So zeigen aktuelle Untersuchungen (Hoch *et al.* 1999; Kirchhefer *et al.* 1999), dass bei herzinsuffizienten Patienten sowohl Expression als auch Aktivität der CaMKII im Herzen erhöht ist. Dies scheint ein *downstream*-Effekt der sympathischen Signalkaskade bei Aktivierung von cardialen β -Rezeptoren zu sein (Zhu *et al.* 2003). So könnte ein Teil der positiven Wirkung von Betablockern auf eine verminderte Aktivität der CaMKII zurückzuführen sein (Grueter *et al.* 2007). Im Tiermodell führt eine Inhibierung der CaMKII zu einer Verminderung struktureller Herzschäden nach Myocardinfarkt und chronischer Isoprenalingabe (Zhang *et al.* 2005).

Die in dieser Doktorarbeit geleisteten Forschungen werden zur weiteren Aufklärung der Regulierung spannungsabhängiger Calciumkanäle beitragen können.

6 Anhang

6.1 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Lage/Verwendung
pl_sc1_for	TCT AGT GCG GCC GCT ACA CAC ACT TGA ATG CAA A	5'-Arm
pl_sc21_rev	CCG GCG GGA TCC CAT AGT CTG GAT CTT AGG AG	5'-Arm
pl_sc3_for	TAA TAA ATC GAT GTG GTC TGG TGC ATC CAG CC	3'-Arm
pl_sc4_rev	CGG CCC ATC GAT AGA ATC TAT CCA TCT TTC TAG	3'-Arm
pl_sc5A_for	ATA ATA ATC GAT CTA GGA TGA TGG GGG CAG GG	3'-Arm
pl_sc5x1_rev	TAA ACA CTC GAG CGA GGG TGG GGA AAT ATC AG	3'-Arm
pl_sc6x2_for	TAA CAA GGA TCC GCC AGG GAT TGA CAT CCA GT	3'-Arm
pl_sc6_rev	ACG ACG CTC GAG TCT AAG TGA GGC CCA AAT AG	3'-Arm
IQ_DM_for	CCT TCC TGG AGC AAG AGT ACT TCA GGA AAT TC	IQ Punktmutation
IQ_DM_rev	TAC TCT TGC TCC AGG AAG GTG GCA TAG AAC	IQ Punktmutation
pl_sc71_for	ATA ATT GCG GCC GCC TCG AGC ATC GCT CTA CAG CAA ACC CCA TAG	5'-Arm-Verlängerung
pl_sc8_rev	ATA TAT GCG GCC GCC AAC CTG GTA GGA CCT CTG A	5'-Arm-Verlängerung
pl_sc2_rev	ACG CTC GGA TCC GAT TCC TGA TGA GGT AAA TTG G	Southern-Screening
pl_RE11_for	ACG CTT ACA GCT TCC CTA CC	Screening 2. T
pl_RE2_rev	GAA TTG ACC TGC AGG GGC CCT	Screening 1./2. T
pl_RE4_rev	GCT TCT TGA ATT TCC TGA AGT AC	Screening 2. T
pl_scr1_for	ACT TGA GTC TCC CCT GCT TCT G	Screening 1. T
moo_GST2_for	AGA GGA TCC GTA GCT GTT ATC ATG GAC	GST-Fusionsprotein
moo_GST1733_rev	AGA CTC GAG CTA GAT GTG CAG TGG GCG CTG	GST-Fusionsprotein
pl_OLS1512A_for	GGA CTG GGC AAT CCT TGG TC	S1512 Punktmutation
pl_OLS1512A_rev	GAC CAA GGA TTG CCC AGT CC	S1512 Punktmutation
pl_OLS1570A_for	ACG CCT GGT CGC CAT GAA CA	S1570 Punktmutation
pl_OLS1570A_rev	TGT TCA TGG CGA CCA GGC GT	S1570 Punktmutation
pUC_for	GTA AAA CGA CGG CCA GT	Sequenzierung
pUC_rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Sequenzierung
pGEX_for	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	Sequenzierung
pGEX_rev	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG	Sequenzierung

Tabelle 5 - Verwendete Oligonukleotide

6.2 Verwendete Enzyme

Restriktionsenzyme (Firma NEB):

Name	Erkennungssequenz	NEB-Puffer
NotI	GC GGCCGC	3
BamHI	G GATCC	2
ClaI	AT CGAT	4
XhoI	C TCGAG	2
PstI	CTGCA G	3
NsiI	ATGCA T	NsiI
XbaI	T CTAGA	2

Tabelle 6 - Verwendete Restriktionsenzyme

Andere Enzyme und Reaktionskits:

Name	Hersteller	Anwendung
Expand HighFidelity ^{PLUS} PCR System	Roche	PCR
taq DNA Polymerase	Genscript	PCR
Antarctic Phosphatase	NEB	Dephosphorylierung
Alkaline Phosphatase	Boehringer Ingelheim	Dephosphorylierung
Fast-Link DNA Ligation Kit	Epicentre	Ligation
Quick Liagtion Kit	NEB	Ligation
T4 DNA Ligase	Promega	Ligation
Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosciences	Sequenzierung
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche	Radioaktive Markierung
CamKII	NEB	Phosphorylierungs-Assay
CaMKII Assay Kit	upstate/Biomol	Phosphorylierungs-Assay

Tabelle 7 - Andere verwendete Enzyme

6.3 Verwendete Antikörper

Name	Hersteller/Referenz	Art
anti-Ca _v 1.2 alpha	Moosmang <i>et al.</i> 2003	polyklonal, Kaninchen
anti-CaMKII alpha	Chemicon	monoklonal, Maus
anti-Calmodulin	upstate	monoklonal, Maus
anti-GST	upstate	polyklonal, Kaninchen

Tabelle 8 - Verwendete Antikörper

7 Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acid; Aminosäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin; Rinderserumalbumin
Ca _i	Freie cytosolische Calciumkonzentration
Ca _v	Spannungsabhängiger Calciumkanal
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calmodulin-abhängige Kinase, Subtyp 2
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CDF	calcium-dependent facilitation; Calciumabhängige Fazilitierung
CDI	calcium-dependent inactivation; Calciumabhängige Inaktivierung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemi-luminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
GST	Glutathion-S-Transferase
HEK	human embryonic kidney
HRP	horseradish peroxidase; Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
I _{Ca}	Calciumionen-Einstrom
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen, Einheit, 1000 Basenpaare
KI	knock-in
IP	Immunopräzipitation
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
loxP	Erkennungssequenz der CRE-Rekombinase, locus of crossover (x) of Phage P

Abkürzungsverzeichnis

MCS	multiple cloning site; Multiple Klonierungsstelle
NaCl	Natriumchlorid
neo	Neomycinresistenz-Gen
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gel
PAS	Protein-A-Sepharose
pB	pBluescript
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAKO	<u>S</u>mooth <u>m</u>uscle-specific <u>a</u>lpha 1.2 calcium channel <u>k</u>nock<u>o</u>ut
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Borat-NaCl-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tk	Thymidinkinase
Tris	α,α,α-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit, Einheit
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Literaturverzeichnis

8.1 Zitierte Veröffentlichungen

- Anderson, M. E. (2001). "Ca²⁺-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels: is a unifying mechanism at hand?" *J Mol Cell Cardiol* **33**(4): 639-50.
- Artalejo, C. R., M. A. Ariano, R. L. Perlman and A. P. Fox (1990). "Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism." *Nature* **348**(6298): 239-42.
- Barg, S., X. Ma, L. Eliasson, J. Galvanovskis, S. O. Gopel, S. Obermuller, J. Platzer, E. Renstrom, M. Trus, D. Atlas, J. Striessnig and P. Rorsman (2001). "Fast exocytosis with few Ca(2+) channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells." *Biophys J* **81**(6): 3308-23.
- Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." *Nature* **415**(6868): 198-205.
- Bodi, I., G. Mikala, S. E. Koch, S. A. Akhter and A. Schwartz (2005). "The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on." *J Clin Invest* **115**(12): 3306-17.
- Bohn, G., S. Moosmang, H. Conrad, A. Ludwig, F. Hofmann and N. Klugbauer (2000). "Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node." *FEBS Lett* **481**(1): 73-6.
- Brehm, P. and R. Eckert (1978). "Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium." *Science* **202**(4373): 1203-6.
- Budde, T., S. Meuth and H. C. Pape (2002). "Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels." *Nat Rev Neurosci* **3**(11): 873-83.
- Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 521-55.
- Cens, T., S. Restituito, S. Galas and P. Charnet (1999). "Voltage and calcium use the same molecular determinants to inactivate calcium channels." *J Biol Chem* **274**(9): 5483-90.
- Chen, R. S., T. C. Deng, T. Garcia, Z. M. Sellers, P. M. Best (2007). "Calcium Channel γ subunits: A functionally diverse protein family." *Cell Biochem Biophys* **47**(2): 178-186
- Cooke, S. F. and T. V. Bliss (2006). "Plasticity in the human central nervous system." *Brain* **129**(Pt 7): 1659-73.
- Cribbs, L. L., J. H. Lee, J. Yang, J. Satin, Y. Zhang, A. Daud, J. Barclay, M. P. Williamson, M. Fox, M. Rees and E. Perez-Reyes (1998). "Cloning and characterization of $\alpha 1H$ from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family." *Circ Res* **83**(1): 103-9.
- Dolphin, A. C. (1996). "Facilitation of Ca²⁺ current in excitable cells." *Trends Neurosci* **19**(1): 35-43.
- Dolphin, A. C. (2003). "Beta subunits of voltage-gated calcium channels." *J Bioenerg Biomembr* **35**(6): 599-620.
- Dzhura, I., Y. Wu, R. J. Colbran, J. R. Balsler and M. E. Anderson (2000). "Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels." *Nat Cell Biol* **2**(3): 173-7.
- Dzhura, I., Y. Wu, R. J. Colbran, J. D. Corbin, J. R. Balsler and M. E. Anderson (2002). "Cytoskeletal disrupting agents prevent calmodulin kinase, IQ domain and voltage-dependent facilitation of L-type Ca²⁺ channels." *J Physiol* **545**(Pt 2): 399-406.
- Erickson, M. G., H. Liang, M. X. Mori and D. T. Yue (2003). "FRET two-hybrid mapping reveals function and location of L-type Ca²⁺ channel CaM preassociation." *Neuron* **39**(1): 97-107.
- Erxleben, C., Y. Liao, S. Gentile, D. Chin, C. Gomez-Alegria, Y. Mori, L. Birnbaumer and D. L. Armstrong (2006). "Cyclosporin and Timothy syndrome increase mode 2 gating of CaV1.2 calcium channels through aberrant phosphorylation of S6 helices." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3932-7.

- Fabiato, A. (1983). "Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum." *Am J Physiol* **245**(1): C1-14.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal Biochem* **132**(1): 6-13.
- Findlay, I. (2002). "Voltage- and cation-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channel currents in guinea-pig ventricular myocytes." *J Physiol* **541**(Pt 3): 731-40.
- Fox, A. P., M. C. Nowycky and R. W. Tsien (1987). "Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones." *J Physiol* **394**: 173-200.
- Gao, T., M. Bunemann, B. L. Gerhardstein, H. Ma and M. M. Hosey (2000). "Role of the C terminus of the alpha 1C (CaV1.2) subunit in membrane targeting of cardiac L-type calcium channels." *J Biol Chem* **275**(33): 25436-44.
- Grueter, C. E., S. A. Abiria, I. Dzhura, Y. Wu, A. J. Ham, P. J. Mohler, M. E. Anderson and R. J. Colbran (2006). "L-type Ca²⁺ channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII." *Mol Cell* **23**(5): 641-50.
- Grueter, C. E., R. J. Colbran and M. E. Anderson (2007). "CaMKII, an emerging molecular driver for calcium homeostasis, arrhythmias, and cardiac dysfunction." *J Mol Med* **85**(1): 5-14.
- Gu, H., Y. R. Zou and K. Rajewsky (1993). "Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting." *Cell* **73**(6): 1155-64.
- Halling, D. B., P. Aracena-Parks and S. L. Hamilton (2005). "Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by calmodulin." *Sci STKE* **2005**(315): re15.
- Hell, J. W., R. E. Westenbroek, C. Warner, M. K. Ahljianian, W. Prystay, M. M. Gilbert, T. P. Snutch and W. A. Catterall (1993). "Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits." *J Cell Biol* **123**(4): 949-62.
- Hoch, B., R. Meyer, R. Hetzer, E. G. Krause and P. Karczewski (1999). "Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium." *Circ Res* **84**(6): 713-21.
- Hockerman, G. H., B. D. Johnson, M. R. Abbott, T. Scheuer and W. A. Catterall (1997). "Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIS6 and the pore region of the alpha1 subunit." *J Biol Chem* **272**(30): 18759-65.
- Hofmann, F., L. Lacinova and N. Klugbauer (1999). "Voltage-dependent calcium channels: from structure to function." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **139**: 33-87.
- Hudmon, A., H. Schulman, J. Kim, J. M. Maltez, R. W. Tsien and G. S. Pitt (2005). "CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation." *J Cell Biol* **171**(3): 537-47.
- Hui, A., P. T. Ellinor, O. Krizanova, J. J. Wang, R. J. Diebold and A. Schwartz (1991). "Molecular cloning of multiple subtypes of a novel rat brain isoform of the alpha 1 subunit of the voltage-dependent calcium channel." *Neuron* **7**(1): 35-44.
- J, O. U., K. Komukai, Y. Kusakari, T. Obata, K. Hongo, H. Sasaki and S. Kurihara (2005). "alpha1-adrenoceptor stimulation potentiates L-type Ca²⁺ current through Ca²⁺/calmodulin-dependent PK II (CaMKII) activation in rat ventricular myocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(26): 9400-5.
- Jahn, H., W. Nastainczyk, A. Rohrkasten, T. Schneider and F. Hofmann (1988). "Site-specific phosphorylation of the purified receptor for calcium-channel blockers by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases, protein kinase C, calmodulin-dependent protein kinase II and casein kinase II." *Eur J Biochem* **178**(2): 535-42.
- Kamp, T. J., H. Hu and E. Marban (2000). "Voltage-dependent facilitation of cardiac L-type Ca channels expressed in HEK-293 cells requires beta-subunit." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**(1): H126-36.

- Kim, J., S. Ghosh, D. A. Nunziato and G. S. Pitt (2004). "Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca²⁺ channels." *Neuron* **41**(5): 745-54.
- Kirchhefer, U., W. Schmitz, H. Scholz and J. Neumann (1999). "Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts." *Cardiovasc Res* **42**(1): 254-61.
- Klugbauer, N., E. Marais, L. Lacinova and F. Hofmann (1999a). "A T-type calcium channel from mouse brain." *Pflugers Arch* **437**(5): 710-5.
- Klugbauer, N., L. Lacinova, E. Marais, M. Hobom and F. Hofmann (1999b). "Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit." *J Neurosci* **19**(2): 684-91.
- Koch-Weser, J. and J. R. Blinks (1963). "The Influence of the Interval between Beats on Myocardial Contractility." *Pharmacol Rev* **15**: 601-52.
- Korzick, D. H. (2003). "Regulation of cardiac excitation-contraction coupling: a cellular update." *Adv Physiol Educ* **27**(1-4): 192-200.
- Kuhbandner, S., S. Brummer, D. Metzger, P. Chambon, F. Hofmann and R. Feil (2000). "Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle." *Genesis* **28**(1): 15-22.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lee, K. S., E. Marban and R. W. Tsien (1985). "Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium." *J Physiol* **364**: 395-411.
- Lee, A., S. T. Wong, D. Gallagher, B. Li, D. R. Storm, T. Scheuer and W. A. Catterall (1999). "Ca²⁺/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels." *Nature* **399**(6732): 155-9.
- Llinas, R. R., M. Sugimori and B. Cherksey (1989). "Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel." *Ann N Y Acad Sci* **560**: 103-11.
- McCarron, J. G., J. G. McGeown, S. Reardon, M. Ikebe, F. S. Fay and J. V. Walsh, Jr. (1992). "Calcium-dependent enhancement of calcium current in smooth muscle by calmodulin-dependent protein kinase II." *Nature* **357**(6373): 74-7.
- Metzger, D. and R. Feil (1999). "Engineering the mouse genome by site-specific recombination." *Curr Opin Biotechnol* **10**(5): 470-6.
- Moosmang, S., N. Haider, B. Bruderl, A. Welling and F. Hofmann (2006). "Antihypertensive effects of the putative T-type calcium channel antagonist mibefradil are mediated by the L-type calcium channel Cav1.2." *Circ Res* **98**(1): 105-10.
- Moosmang, S., N. Haider, N. Klugbauer, H. Adelsberger, N. Langwieser, J. Muller, M. Stuess, E. Marais, V. Schulla, L. Lacinova, S. Goebbels, K. A. Nave, D. R. Storm, F. Hofmann and T. Kleppisch (2005a). "Role of hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory." *J Neurosci* **25**(43): 9883-92.
- Moosmang, S., V. Schulla, A. Welling, R. Feil, S. Feil, J. W. Wegener, F. Hofmann and N. Klugbauer (2003). "Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation." *Embo J* **22**(22): 6027-34.
- Noble, S. and Y. Shimoni (1981a). "The calcium and frequency dependence of the slow inward current 'staircase' in frog atrium." *J Physiol* **310**: 57-75.
- Noble, S. and Y. Shimoni (1981b). "Voltage-dependent potentiation of the slow inward current in frog atrium." *J Physiol* **310**: 77-95.
- Nowycky, M. C., A. P. Fox and R. W. Tsien (1985). "Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity." *Nature* **316**(6027): 440-3.
- Perez-Reyes, E., L. L. Cribbs, A. Daud, A. E. Lacerda, J. Barclay, M. P. Williamson, M. Fox, M. Rees and J. H. Lee (1998a). "Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel." *Nature* **391**(6670): 896-900.
- Perez-Reyes, E. (1998b). "Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels." *J Bioenerg Biomembr* **30**(4): 313-8.

- Peterson, B. Z., C. D. DeMaria, J. P. Adelman and D. T. Yue (1999). "Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels." *Neuron* **22**(3): 549-58.
- Pitt, G. S., R. D. Zuhlke, A. Hudmon, H. Schulman, H. Reuter and R. W. Tsien (2001). "Molecular basis of calmodulin tethering and Ca²⁺-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channels." *J Biol Chem* **276**(33): 30794-802.
- Pitt, G. S. (2007). "Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels." *Cardiovasc Res* **73**(4): 641-7.
- Platzer, J., J. Engel, A. Schrott-Fischer, K. Stephan, S. Bova, H. Chen, H. Zheng and J. Striessnig (2000). "Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels." *Cell* **102**(1): 89-97.
- Pragnell, M., M. De Waard, Y. Mori, T. Tanabe, T. P. Snutch and K. P. Campbell (1994). "Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit." *Nature* **368**(6466): 67-70.
- Rajewsky, K., H. Gu, R. Kuhn, U. A. Betz, W. Muller, J. Roes and F. Schwenk (1996). "Conditional gene targeting." *J Clin Invest* **98**(3): 600-3.
- Randall, A. and R. W. Tsien (1995). "Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons." *J Neurosci* **15**(4): 2995-3012.
- Rhoads, A. R. and F. Friedberg (1997). "Sequence motifs for calmodulin recognition." *Faseb J* **11**(5): 331-40.
- Rottbauer, W., K. Baker, Z. G. Wo, M. A. Mohideen, H. F. Cantiello and M. C. Fishman (2001). "Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel alpha1 subunit." *Dev Cell* **1**(2): 265-75.
- Schulla, V., E. Renstrom, R. Feil, S. Feil, I. Franklin, A. Gjinovci, X. J. Jing, D. Laux, I. Lundquist, M. A. Magnuson, S. Obermuller, C. S. Olofsson, A. Salehi, A. Wendt, N. Klugbauer, C. B. Wollheim, P. Rorsman and F. Hofmann (2003). "Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca²⁺ channel null mice." *Embo J* **22**(15): 3844-54.
- Schuster, A., L. Lacinova, N. Klugbauer, H. Ito, L. Birnbaumer and F. Hofmann (1996). "The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines." *Embo J* **15**(10): 2365-70.
- Seisenberger, C., V. Specht, A. Welling, J. Platzer, A. Pfeifer, S. Kuhbandner, J. Striessnig, N. Klugbauer, R. Feil and F. Hofmann (2000). "Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse." *J Biol Chem* **275**(50): 39193-9.
- Singh, A., D. Hamedinger, J. C. Hoda, M. Gebhart, A. Koschak, C. Romanin and J. Striessnig (2006). "C-terminal modulator controls Ca²⁺-dependent gating of Ca(v)1.4 L-type Ca²⁺ channels." *Nat Neurosci* **9**(9): 1108-16.
- Sinnegger-Brauns, M. J., A. Hetzenauer, I. G. Huber, E. Renstrom, G. Wietzorrek, S. Berjukov, M. Cavalli, D. Walter, A. Koschak, R. Waldschutz, S. Hering, S. Bova, P. Rorsman, O. Pongs, N. Singewald and J. J. Striessnig (2004). "Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca²⁺ channels." *J Clin Invest* **113**(10): 1430-9.
- Snutch, T. P., W. J. Tomlinson, J. P. Leonard and M. M. Gilbert (1991). "Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS." *Neuron* **7**(1): 45-57.
- Soldatov, N. M. (1994). "Genomic structure of human L-type Ca²⁺ channel." *Genomics* **22**(1): 77-87.
- Splawski, I., K. W. Timothy, N. Decher, P. Kumar, F. B. Sachse, A. H. Beggs, M. C. Sanguinetti and M. T. Keating (2005). "Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(23): 8089-96; discussion 8086-8.

- Splawski, I., K. W. Timothy, L. M. Sharpe, N. Decher, P. Kumar, R. Bloise, C. Napolitano, P. J. Schwartz, R. M. Joseph, K. Condouris, H. Tager-Flusberg, S. G. Priori, M. C. Sanguinetti and M. T. Keating (2004). "Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism." *Cell* **119**(1): 19-31.
- Stotz, S. C., J. Hamid, R. L. Spaetgens, S. E. Jarvis and G. W. Zamponi (2000). "Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism?" *J Biol Chem* **275**(32): 24575-82.
- Striessnig, J. (1999). "Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels." *Cell Physiol Biochem* **9**(4-5): 242-69.
- Strom, T. M., G. Nyakatura, E. Apfelstedt-Sylla, H. Hellebrand, B. Lorenz, B. H. Weber, K. Wutz, N. Gutwillinger, K. Ruther, B. Drescher, C. Sauer, E. Zrenner, T. Meitinger, A. Rosenthal and A. Meindl (1998). "An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness." *Nat Genet* **19**(3): 260-3.
- Tanabe, T., H. Takeshima, A. Mikami, V. Flockerzi, H. Takahashi, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, T. Hirose and S. Numa (1987). "Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle." *Nature* **328**(6128): 313-8.
- Tang, W., D. B. Halling, D. J. Black, P. Pate, J. Z. Zhang, S. Pedersen, R. A. Altschuld and S. L. Hamilton (2003). "Apocalmodulin and Ca²⁺ calmodulin-binding sites on the CaV1.2 channel." *Biophys J* **85**(3): 1538-47.
- Tronche, F., C. Kellendonk, O. Kretz, P. Gass, K. Anlag, P. C. Orban, R. Bock, R. Klein and G. Schutz (1999). "Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety." *Nat Genet* **23**(1): 99-103.
- Verrou, C., Y. Zhang, C. Zurn, W. W. Schamel and M. Reth (1999). "Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer." *Biol Chem* **380**(12): 1435-8.
- Wahl-Schott, C., L. Baumann, H. Cuny, C. Eckert, K. Griessmeier and M. Biel (2006). "Switching off calcium-dependent inactivation in L-type calcium channels by an autoinhibitory domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(42): 15657-62.
- Wang, H. G., M. S. George, J. Kim, C. Wang and G. S. Pitt (2007). "Ca²⁺/calmodulin regulates trafficking of Ca(V)1.2 Ca²⁺ channels in cultured hippocampal neurons." *J Neurosci* **27**(34): 9086-93.
- Wegener, J. W., V. Schulla, A. Koller, N. Klugbauer, R. Feil and F. Hofmann (2006). "Control of intestinal motility by the Ca(v)1.2 L-type calcium channel in mice." *Faseb J* **20**(8): 1260-2.
- Wegener, J. W., V. Schulla, T. S. Lee, A. Koller, S. Feil, R. Feil, T. Kleppisch, N. Klugbauer, S. Moosmang, A. Welling and F. Hofmann (2004). "An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function." *Faseb J* **18**(10): 1159-61.
- Williams, M. E., D. H. Feldman, A. F. McCue, R. Brenner, G. Velicelebi, S. B. Ellis and M. M. Harpold (1992). "Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype." *Neuron* **8**(1): 71-84.
- Wu, Y., I. Dzhura, R. J. Colbran and M. E. Anderson (2001). "Calmodulin kinase and a calmodulin-binding 'IQ' domain facilitate L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes by a common mechanism." *J Physiol* **535**(Pt 3): 679-87.
- Xiao, R. P., H. Cheng, W. J. Lederer, T. Suzuki and E. G. Lakatta (1994). "Dual regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20): 9659-63.
- Xu, M., A. Welling, S. Paparisto, F. Hofmann and N. Klugbauer (2003). "Enhanced expression of L-type Cav1.3 calcium channels in murine embryonic hearts from Cav1.2-deficient mice." *J Biol Chem* **278**(42): 40837-41.
- Yuan, W. and D. M. Bers (1994). "Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase." *Am J Physiol* **267**(3 Pt 2): H982-93.
- Zhang, R., M. S. Khoo, Y. Wu, Y. Yang, C. E. Grueter, G. Ni, E. E. Price, Jr., W. Thiel, S. Guatimosim, L. S. Song, E. C. Madu, A. N. Shah, T. A. Vishnivetskaya, J. B. Atkinson, V.

- V. Gurevich, G. Salama, W. J. Lederer, R. J. Colbran and M. E. Anderson (2005). "Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease." Nat Med **11**(4): 409-17.
- Zhou, H., K. Yu, K. L. McCoy and A. Lee (2005). "Molecular mechanism for divergent regulation of Cav1.2 Ca²⁺ channels by calmodulin and Ca²⁺-binding protein-1." J Biol Chem **280**(33): 29612-9.
- Zhu, W. Z., S. Q. Wang, K. Chakir, D. Yang, T. Zhang, J. H. Brown, E. Devic, B. K. Kobilka, H. Cheng and R. P. Xiao (2003). "Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II." J Clin Invest **111**(5): 617-25.
- Zuhlke, R. D. and H. Reuter (1998). "Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3287-94.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, K. Deisseroth, R. W. Tsien and H. Reuter (1999). "Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels." Nature **399**(6732): 159-62.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, R. W. Tsien and H. Reuter (2000). "Ca²⁺-sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca²⁺ channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the(alpha)1C subunit." J Biol Chem **275**(28): 21121-9.

8.2 Eigene Veröffentlichungen

- Lee, T. S., R. Karl, S. Moosmang, P. Lenhardt, N. Klugbauer, F. Hofmann, T. Kleppisch and A. Welling (2006). "Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites." J Biol Chem **281**(35): 25560-7.
- Moosmang, S., P. Lenhardt, N. Haider, F. Hofmann and J. W. Wegener (2005b). "Mouse models to study L-type calcium channel function." Pharmacol Ther **106**(3): 347-55.
- Lenhardt, P., T. Lee, F. Hofmann, A. Welling and S. Moosmang (2006). "Biochemical and functional identification of calmodulin kinase II phosphorylation sites in the C-terminus of Cav1.2." Nauyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **372**, Supp. 1: 59.

Danksagung

Ich bedanke mich bei den folgenden Personen:

Bei Herrn PD Dr. Sven Moosmang für die engagierte und freundliche Leitung der Arbeitsgruppe, seine schier unendliche Geduld und das Wiederaufbauen deprimierter Doktoranden, wovon dringend nötig war.

Bei Herrn Professor Dr. Franz Hofmann für die freundliche Aufnahme an das Institut für Pharmakologie und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Bei Herrn Professor Dr. Martin Biel für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und für die Berichterstattung vor der Fakultät.

Bei Herrn Dr. Tae-Song Lee und Frau Dr. Andrea Welling für das freundliche Überlassen der elektrophysiologischen Daten.

Bei Nicole fürs Einweisen in Laborarbeit und Tierzucht und natürlich das eine oder andere Kinder-Country. Can you hear me???

Bei Steffi für ihren Beistand bei ES-Zell-Kultur und Blastozysteninjektion („Wunderbär!“) und viele, viele lustige (Bayern-1-)Lieder und Gespräche.

Bei Toni für ihre ruhige Art und ihr offenes Ohr.

Bei Angelika für die Übernahme von manch unliebsamen Versuchen und ihre liebevolle Ironie.

Bei Carl für 1000 lange Abende im Muddy Boot und seine unerreichten Kochkünste.

Bei Dominik für gegenseitigen Frustabbau, für seine offenen Worte und fürs Philosophieren.

Bei Lior für zwei wunderschöne Wochen im Gelobten Land und für den unverkrampften Umgang miteinander.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern (auch den ehemaligen) des Biedersteins, die auf ihre eigene Art und Weise die letzten dreieinhalb Jahre nicht nur erträglich, sondern manchmal auch richtig schön gemacht haben – ganz egal, welches Stockwerk!

Bei meinen Eltern, ohne deren Unterstützung nichts von alledem möglich geworden wäre.

Bei Nadine für ihren gnadenlosen Optimismus, ihr Verständnis und für unendlich viel mehr.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Peter Lenhardt
Anschrift: Rottmannstraße 9
80333 München
Email: peter_lenhardt@yahoo.de
Geburtsdatum und -ort: 29.05.1978 in Bad Neustadt/Saale
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung:

09/1984 – 08/1988 Grundschule Oberelsbach
09/1988 – 07/1997 Martin-Pollich-Gymnasium in Mellrichstadt

Grundwehrdienst:

08/1997 – 05/1998 Heeresmusikkorps 13 in Erfurt (Schlagzeuger)

Studium:

11/1998 – 10/2002 Pharmaziestudium an der Julius-Maximilians-Universität in
Würzburg, Abschluss: 2. Staatsexamen (1,5)
11/1998 – 10/2002 Semestersprecher
11/2000 – 10/2001 Fachschaftssprecher

Pharmaziepraktikum:

11/2002 – 04/2003 Bourke's Pharmacy in Dun Laoghaire, Dublin, Republik Irland
06/2003 – 02/2004 Internationale Ludwigs-Apotheke in München
31.03.2004 Approbation als Apotheker

Promotion:

05/2004 – heute Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München,
Thema: "In vivo und in vitro-Untersuchungen zur Calmodulin-
abhängigen Regulation des spannungsabhängigen Calcium-Kanals
Ca_v1.2"

München, den 28. November 2007