

**Genetische Ablation des natrium- und chloridabhängigen
Kaliumkanals Slo2.1 (SLICK)
in der Maus**

DISSERTATION

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2007

vorgelegt von

Claus Gassner

Tag der mündlichen Prüfung:

22. Juni 2007

Dekan:

Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Oliver Werz

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Ionenkanäle	1
1.2 Kaliumkanäle	1
1.2.1 Die Slo-Genfamilie.....	3
1.3 Slo 2.1 (Slick).....	10
1.4 Knockout-Tiermodelle	14
1.5 Gene Targeting	16
1.5.1 Doppelte Selektion	18
1.6 Das Cre/ LoxP-System	19
2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	22
3 MATERIAL	23
3.1 Chemikalien	23
3.2 Kit-Systeme.....	24
3.2.1 DNS/ RNS Isolierung.....	24
3.2.2 Klonierung	24
3.2.3 PCR.....	24
3.2.4 Southern Blotting	24
3.3 Enzyme	25
3.3.1 Restriktionsendonukleasen.....	25
3.3.2 Polymerasen.....	25
3.3.3 DNS modifizierende Enzyme.....	25
3.3.4 Sonstige Enzyme.....	25
3.3.5 Oligonukleotide.....	26
3.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien	28
3.4.1 Geräte.....	28
3.4.2 Verbrauchsmaterial	29
3.5 Bakterien.....	30
3.6 Wasser.....	30
4 METHODEN	31
4.1 Bakterienkultur.....	31
4.1.1 Medien.....	31
4.1.2 Kultivierung.....	32

4.1.3	Langzeitlagerung	33
4.2	Plasmide	33
4.2.1	Kommerzielle Plasmidvektoren	33
4.2.2	Im Rahmen der Arbeit hergestellte Vektoren.....	34
4.3	Molekularbiologische Methoden.....	34
4.3.1	Isolierung von Plasmid-DNS.....	34
4.3.2	Isolierung von genomischer DNS	35
4.3.3	Isolierung von mRNS aus Mausgewebe.....	38
4.3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
4.3.5	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren.....	40
4.3.6	Reinigung von Nukleinsäuren.....	42
4.3.7	Transformation von Bakterien.....	44
4.3.8	Agarosegelelektrophorese.....	46
4.3.9	Sequenzierung von DNS	50
4.3.10	Amplifizierung von DNS durch Polymerasekettenreaktion.....	51
4.3.11	Analyse von DNS durch Southern-Blot.....	54
4.3.12	Methoden zur Erzeugung gentechnisch veränderter Mäuse	62
4.3.13	Kultivierung embryonaler Stammzellen	63
4.3.14	Feederzellen.....	67
4.3.15	Embryonale Stammzellen.....	69
4.3.16	Injektion genetisch modifizierter ES-Zellen in Blastozysten.....	83
5	ERGEBNISSE	89
5.1	Identifizierung des murinen <i>slo2.1</i> Gens.....	89
5.2	Entwicklung der Knockout-Strategie für <i>slo2.1</i>	93
5.2.1	Erstellung einer Gen-Karte	93
5.2.2	Knockout-Strategie	93
5.2.3	Klonierung des Targeting-Konstrukts	98
5.2.4	Nachweis der homologen Rekombination	110
5.3	Targeting von <i>slo2.1</i>	114
5.3.1	Das 1. Targeting	114
5.3.2	Das 2. Targeting	119
5.3.3	Blastozysteninjektion	122
5.4	Klonierung des murinen Slo2.1 in Expressionsvektoren	123
5.4.1	Erzeugung eines kompletten cDNS-Klons von Slick	123
5.4.2	Transfektion von HEK-Zellen.....	125
6	DISKUSSION	126
7	AUSBLICK	133
8	ZUSAMMENFASSUNG.....	134
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	136

DANKSAGUNG	147
LEBENS LAUF	149

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Phylogenetischer Stammbaum.....	4
Abbildung 1-2 Struktur des BK _{Ca} mit α - und β -Untereinheit.....	5
Abbildung 1-3 Struktur des Slo2.1 (SLICK).....	10
Abbildung 1-4 Alignment von SLICK und SLACK.....	11
Abbildung 1-5 „Gene Targeting“.....	17
Abbildung 1-6 Positiv-/ Negativselektion.....	18
Abbildung 1-7 Cre-LoxP-System.....	19
Abbildung 1-8 Cre-vermittelte Rekombination.....	20
Abbildung 4-1 Topo-Reaktion.....	45
Abbildung 4-2 Southern Blot.....	57
Abbildung 4-3 Schema zur Erzeugung gentechnisch veränderter Mäuse.....	62
Abbildung 4-4 Schema zum Ablauf der zellkulturtechnischen Arbeiten.....	66
Abbildung 4-5 Bestimmung der Zellzahl mit Neubauer Zellzählkammer.....	71
Abbildung 4-6 Schema zum Ablauf eines Targetings.....	73
Abbildung 4-7 Picken der Zellen.....	76
Abbildung 4-8 Beispiel für eine Evaluation.....	77
Abbildung 4-9 Abzweigen der Zellen für DNA-Präparation.....	81
Abbildung 4-10 Schema zur Etablierung einer Knockout-Mauslinie.....	86
Abbildung 4-11 Genotypisierungs-PCR.....	87
Abbildung 5-1 Chromosomenverteilung von Slo2.1 und Slo2.2.....	89
Abbildung 5-2 Alignment des putativen slo2.1 mit slo2 der Ratte.....	91
Abbildung 5-3 Alignment muriner slo2.1 mit slo2.1 der Ratte.....	92
Abbildung 5-4 Genkarte von slo2.1.....	93
Abbildung 5-5 Porenregion.....	94
Abbildung 5-6 Knockoutvektor pBSloxPneotkloxP.....	95
Abbildung 5-7 Targetingkonstrukt.....	96
Abbildung 5-8 Klonierung des Vektors (1).....	97
Abbildung 5-9 Klonierung des Vektors (2).....	97
Abbildung 5-10 Cosmidbankscreening.....	100
Abbildung 5-11 Kurzer Arm.....	101
Abbildung 5-12 Hilfsvektor pBluescriptKS+_neu.1.....	103
Abbildung 5-13 Klonierung des langen Arms (1).....	104
Abbildung 5-14 Klonierung des langen Arms (2).....	105
Abbildung 5-15 Klonierung des langen Arms (3).....	106
Abbildung 5-16 Darstellung des PCR-Fragments.....	107
Abbildung 5-17 Hilfsvektor pSP72_neu.....	108
Abbildung 5-18 Hilfsvektor pBluescriptKS+_neu.3.....	109

Abbildung 5-19 Strategie für Nachweis der 5'-Rekombination.....	111
Abbildung 5-20 Testung der 5'-Sonde.....	111
Abbildung 5-21 Strategie zum Nachweis der 3'-Rekombination.....	112
Abbildung 5-22 Testung der 3'-Sonde.....	112
Abbildung 5-23 Strategie zum Nachweis der Einfachintegration.....	113
Abbildung 5-24 Homologe Rekombination des Targetingkonstrukts	114
Abbildung 5-25 ES-Zellen auf Feederzellrasen	115
Abbildung 5-26 Screen mit 5'-Sonde.....	116
Abbildung 5-27 Southern-Blot-Ergebnisse des 1. Targetings	118
Abbildung 5-28 Rekombinationsereignisse beim 2.Targeting.....	119
Abbildung 5-29 Screen mit 5'-Sonde.....	120
Abbildung 5-30 Southern-Blot-Ergebnisse des 2. Targetings.....	121
Abbildung 5-31 Herstellung eines cDNA-Klons von slo2.1.....	124
Abbildung 6-1 Gewebespezifischer Knockout.....	127
Abbildung 6-2 <i>In-vivo</i> -Knockouts durch Verpaarung mit Cre-deleter-Maus.....	129

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Übersichtstabelle Slo-Kanäle	3
Tabelle 4-1 Verteilung der Zellen auf Kulturschalen	82
Tabelle 5-1 Ergebnisse des 1. Targetings	116
Tabelle 5-2 Ergebnisse des 2. Targetings	120
Tabelle 5-3 Ergebnisse der Blastozysteninjektionen	122

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
A	Absorption
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumine)
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
CO₂	Kohlendioxid
cpm	Counts per minute
CRE	Causes recombination
d	Tag (day)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP oder dTTP)
dNTPs	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP, äquimolar
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EF	Embryonal Fibroblasten, "Feeder"-Zellen
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FCS	Fötale Rinderserum (Fetal calf serum)
fw	Forward
g	Gramm
G418	Geneticin
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (G-protein-coupled receptor)
Gray	Energiedosis (1 J/kg)
h	Stunde (hour)
H₂O	Wasser
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosylpyranosid
J	Joule
K⁺	Kalium-Ion
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KO	Knockout
L	Liter
L1, L2, L3	Eine, zwei oder drei LoxP-Seiten
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
loxP	Erkennungssequenz der CRE-Rekombinase (Locus of crossing over in phage P1)
m	Masse, murin (Von der Maus stammend), Milli- (10 ⁻³)
M	Molare Masse
MCS	Klonierungsstelle (Multiple cloning site)
Milli-Q	Umkehrosiose-System (Fa. Millipore) zur Gewinnung von Reinstwasser

mL	Milliliter
mol	Stoffmenge
mRNS	Messenger RNS
N	Stoffmenge
n	Anzahl, Nano- (10^{-9})
Na	Natrium
Na₂HPO₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
Neo	Neomycin-Resistenzgen
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (Open reading frame)
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
p.c.	Post coitum
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
pH	Potentia hydrogenii, negativ dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionenkonzentration
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RCK	Regulator of conductance of K^+
RNS	Ribonukleinsäure
RPM	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
rRNS	Ribosomale RNS
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
rv	Reverse
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecylsulfate)
SLICK	Sequence like an intermediate conductance K^+ -channel
SLACK	Sequence like a Ca^{2+} -activated K^+ -channel
SSC	Standard Salz-Citrat-Puffer
ssDNS	Einzelstrang-DNS (Single strand-DNA), Lachssperma-DNS (Salmon sperm-DNA)
TAE	Tetraethylammoniumchlorid
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TK	Thymidinkinase
Tm	Schmelztemperatur
Tris	α, α, α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
tRNS	Transfer-RNS
U	Einheit (Unit)
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v/v	Volumen/ Volumen
w/v	Gewicht/ Volumen
w/w	Gewicht/ Gewicht
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Als Bestandteile der Zellmembran sind Ionenkanäle unerlässlich für die Funktion eines lebenden Organismus. In ihrer Form als porenbildende, membrandurchspannende Proteine steuern sie selektiv den Transport von Ionen durch die Zellmembran. Durch diese Ionenströme wird sowohl das Verhalten einer einzelnen Zelle gesteuert, als auch die Kommunikation der Zellen untereinander ermöglicht. Reize und Signale werden durch Änderung dieser Ströme weitergeleitet. Da Ionen als geladene Moleküle die unpolare Lipiddoppelschicht der Zellmembran nicht passieren können, war es lange Zeit unklar, wie der Ionenfluss zwischen dem Zellinneren und -äußeren vor sich geht. Neben der Theorie von wassergefüllten Poren existierte auch die Vorstellung von vesikulärem Transport der Ionen durch die Zellmembran. Elektrophysiologische Arbeiten an Riesen-Axonen von Tintenfischen lieferten erstmalig Hinweise auf das Vorhandensein ionenselektiver Poren in der Zellmembran (Armstrong 1971; Armstrong 1975). Die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik durch Neher und Sakmann 1975 (Neher & Sakmann 1976) ermöglichte schließlich die Messung selbst kleinster Ströme durch einzelne Kanäle. Damit konnte die Existenz von Ionenkanälen experimentell bewiesen werden. Im Laufe der Zeit wurden für nahezu alle für den Organismus relevanten Ionen (Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , K^+) entsprechende Kanäle entdeckt.

1.2 Kaliumkanäle

Unter all diesen verschiedenen Kanälen sind die kaliumselektiven Ionen-Kanäle besonders hervorzuheben. Kaliumkanäle sind weit verbreitet. Sie kommen in praktisch sämtlichen Zellen eines Organismus vor, unabhängig, ob es sich um Bakterien- oder Säugetierzellen handelt (Sigworth 2003). Kaliumkanäle leisten einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung und Stabilisierung des Ruhemembranpotentials einer Zelle. Das Ruhemembranpotential einer Zelle folgt dem Konzentrationsgradienten von Kalium und entspricht in etwa dessen Gleichgewichtspotential. Dieses lässt sich mittels der Gleichung nach Nernst berechnen. Eine genauere Berechnung erfolgt mit der Gleichung von Goldman-Hodgkin-Katz, welche neben Kalium sämtliche an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials beteiligten Ionen mit einbezieht (Goldman 1943).

Zwischenzeitlich wurde eine große, äußerst vielfältige Anzahl von Kaliumkanälen identifiziert. Eine grobe Einteilung erfolgt aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur

(Anzahl ihrer membrandurchspannenden Domänen), sowie der entwicklungs-genetischen Verwandtschaft (Ähnlichkeit der zu Grunde liegenden DNS-Sequenz). Dadurch lassen sich drei große Klassen von Kaliumkanälen unterscheiden. Zum einen jene, mit sechs Transmembransegmenten, und die, welche nur vier oder zwei Transmembransegmente besitzen. Sämtliche bekannten Kaliumkanäle lassen sich entweder der einen oder der anderen Klasse zuordnen. Eine weitere Unterteilung dieser Klassen erfolgt in Familien und Unterfamilien. Diese Einteilung spiegelt auch die unterschiedliche Funktionweise einzelner Gruppen von Kanälen wieder. So finden sich in der Klasse der Sechs-Transmembran-Kanäle eine Reihe von spannungsabhängigen oder kalziumgesteuerten Kaliumkanälen, während die Klasse der Zwei-Transmembran-Kanäle die einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle beinhaltet (Coetzee et al. 1999; Miller 2000a).

Allen diesen Kanälen gemeinsam ist ein hochkonserviertes Sequenzmotiv von Aminosäuren: TMxTVGYG (Heginbotham et al. 1994). Diese Abfolge von Aminosäuren befindet sich jeweils zwischen den beiden letzten Transmembransegmenten und stellt die eigentliche Kanalpore dar. Im Jahre 1998 gelang Doyle (Doyle et al. 1998) erstmalig durch Röntgenstrukturanalyse die räumliche Darstellung eines kristallisierten Kaliumkanal-Proteins (KcsA aus *Streptomyces lividans*). Die Einsicht in die molekulare Struktur machte es möglich, die bislang im Einzelnen ungeklärten Vorgänge bezüglich Ionenselektivität und Ionentransport besser zu verstehen. Die entscheidende Rolle für den selektiven Transport von Kalium-Ionen durch die Membran kommt der oben bereits erwähnten Porenregion zu. Die porenbildenden Aminosäuren ordnen sich räumlich so an, dass ein wassergefüllter „Tunnel“ durch die Membran entsteht. Im oberen, extrazellulären Bereich des Kanals befindet sich die als „Selektivitätsfilter“ bezeichnete Struktur. Hier werden Carbonyl-Sauerstoffe des Kanalproteins so angeordnet, dass eine Öffnung entsteht, die exakt der Größe eines dehydratisierten Kalium-Ions entspricht. Passiert ein (hydratisiertes) Kalium-Ion den Selektivitätsfilter, streift es seine Hydrathülle ab (wobei die Carbonyl-Sauerstoffe die Rolle der hydratisierenden Wassermoleküle übernehmen) und gelangt durch den Filter in den wassergefüllten Bereich der Pore, wo es umgehend rehydratisiert wird. Andere Ionen können diesen Filter nicht passieren, da sie entweder zu groß im Durchmesser sind, oder es, z.B. für das kleinere Natrium-Ion, energetisch ungünstiger ist, seine Hydrathülle abzustreifen (Miller 2000b).

Die Funktionweise der Kaliumkanäle unterliegt einem strengen Regulationsmechanismus, welcher schnell und empfindlich auf Veränderungen des Milieus innerhalb oder außerhalb der Zelle reagiert. Davon hängt ab, ob der Kanal geöffnet oder geschlossen wird. Signale für die Zustandsänderung eines Kanals können verschiedener Art sein: Konzentrationsänderungen bestimmter Ionen wie

Na^+ , Cl^- oder Ca^{2+} , regulatorische Moleküle wie z.B. ATP, aber auch Änderungen des Membranpotentials beeinflussen das Öffnen und Schließen des entsprechenden Kanals.

Im Folgenden soll besonderes Augenmerk auf die Kaliumkanäle der Slo-Familie gerichtet werden. Von speziellem Interesse für die vorliegende Arbeit ist der als Slo2.1 bezeichnete Kaliumkanal.

1.2.1 Die Slo-Genfamilie

Eine Unterfamilie von Kaliumkanälen hebt sich durch eine ungewöhnlich hohe Leitfähigkeit hervor. Es handelt sich um Kanäle, welche zur Gruppe der Sechs-Transmembran-Kanäle zählen. Außer von BK-Kanälen für „big potassium (K^+)-Channels“ spricht man in der Literatur auch von „Maxi-K-Kanälen“ oder SLO-Kanälen. Zunächst wurden in vielen Geweben große Kaliumströme gemessen, die sowohl abhängig von der Kalziumkonzentration als auch von der Membrandepolarisation waren. Exemplare der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, welche an einer bestimmten Stelle ihres Genoms eine Mutation trugen, zeigten auffällig verlangsamte und gestörte Bewegungsabläufe und wurden daher als „slowpoke“ (Trödler, Langweiler) bezeichnet. Zusätzlich fehlte in den Mutanten der große Ca^{2+} -abhängige Kaliumstrom (Elkins et al. 1986). Das entsprechende Gen wurde in Anlehnung an „slowpoke“ nun als *slo* bezeichnet und codiert, wie sich später herausstellte, für den Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit (Atkinson et al. 1991). Dieser wurde somit zum Namensgeber einer ganzen Familie von Kaliumkanälen.

1993 wurde erstmalig das homologe Gen in Säugetieren kloniert (Butler et al. 1993). Nach und nach konnten mithilfe molekularbiologischer Methoden drei weitere slo-Gene identifiziert und kloniert werden (Schreiber et al. 1998; Yuan et al. 2000; Bhattacharjee et al. 2003).

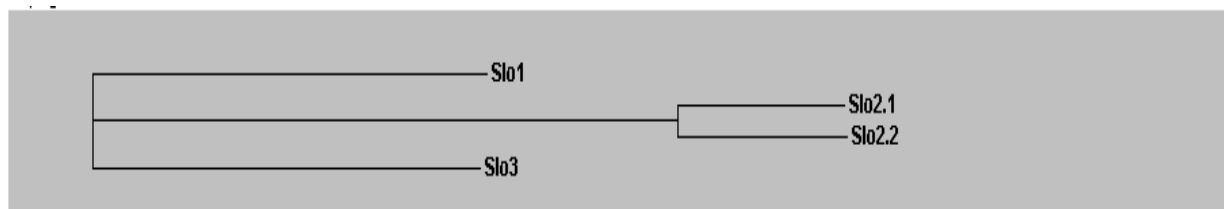


Abbildung 1-1 Phylogenetischer Stammbaum

Durch den jeweiligen Abstand der Gene wird ihr Verwandtschaftsgrad angezeigt: So sind Slo1 und Slo3 sich sehr ähnlich. Auch Slo2.1 und Slo2.2 zeigen große Ähnlichkeit, sind aber weiter entfernt von Slo1 und Slo3.

Die *slo*-Genfamilie besteht momentan aus vier Mitgliedern, welche im Anschluss genauer beschrieben werden sollen. Die Abbildung 1-1 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum der einzelnen Mitglieder und stellt ihre strukturelle Verwandtschaft dar. Je weiter die einzelnen Kanäle von einander entfernt sind, desto größer ist der Unterschied in deren Sequenz. Folglich sind Slo1 und Slo3 sich sehr ähnlich, unterscheiden sich aber von den beiden Slo2-Kanälen, die selbst wiederum eine große Ähnlichkeit zueinander aufweisen.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Slo-Kanäle mit verschiedenen Kenngrößen in einer Übersicht zusammengestellt:

Tabelle 1-1 Übersichtstabelle Slo-Kanäle (Salkoff et al. 2006)

Kanal	Alternativbezeichnung	Gensymbol	Leitfähigkeit	Kanalblocker	Kanalöffner
Slo1	BK _{Ca} , Maxi-K, KCa1.1	KCNMA1	100-270 pS	Iberiotoxin	NS004
				Charybdotoxin	NS1619
				(+)-Tubocurarin	DHS1
				Kaliotoxin	
				Penitrem A	
				TEA(Tetraethylammoniumchlorid)	
Slo2.1	Slick, K _{Na} , KCa4.1	KCNT2	60-140 pS	Intrazelluläres ATP	
				Chinidin	
				Ba ²⁺	
Slo2.2	Slack, K _{Na} , KCa4.2	KCNT1	100-180 pS		
Slo3	KCa5.1	KCNU1	70-100 pS		

1.2.1.1 Slo 1

Bei Slo1-Kanälen (BK, Maxi-K, KCNMA1) handelt es sich um die am besten untersuchten Kanäle aus der Slo-Kanalfamilie. Seit der Entdeckung in *Drosophila* (Elkins et al. 1986; Atkinson et al. 1991) und Klonierung des Mausehomologen (Butler et al. 1993) wurden ständig neue Erkenntnisse über Struktur, Verteilung und mögliche biologische Funktionen gewonnen.

Struktur des BK_{Ca}

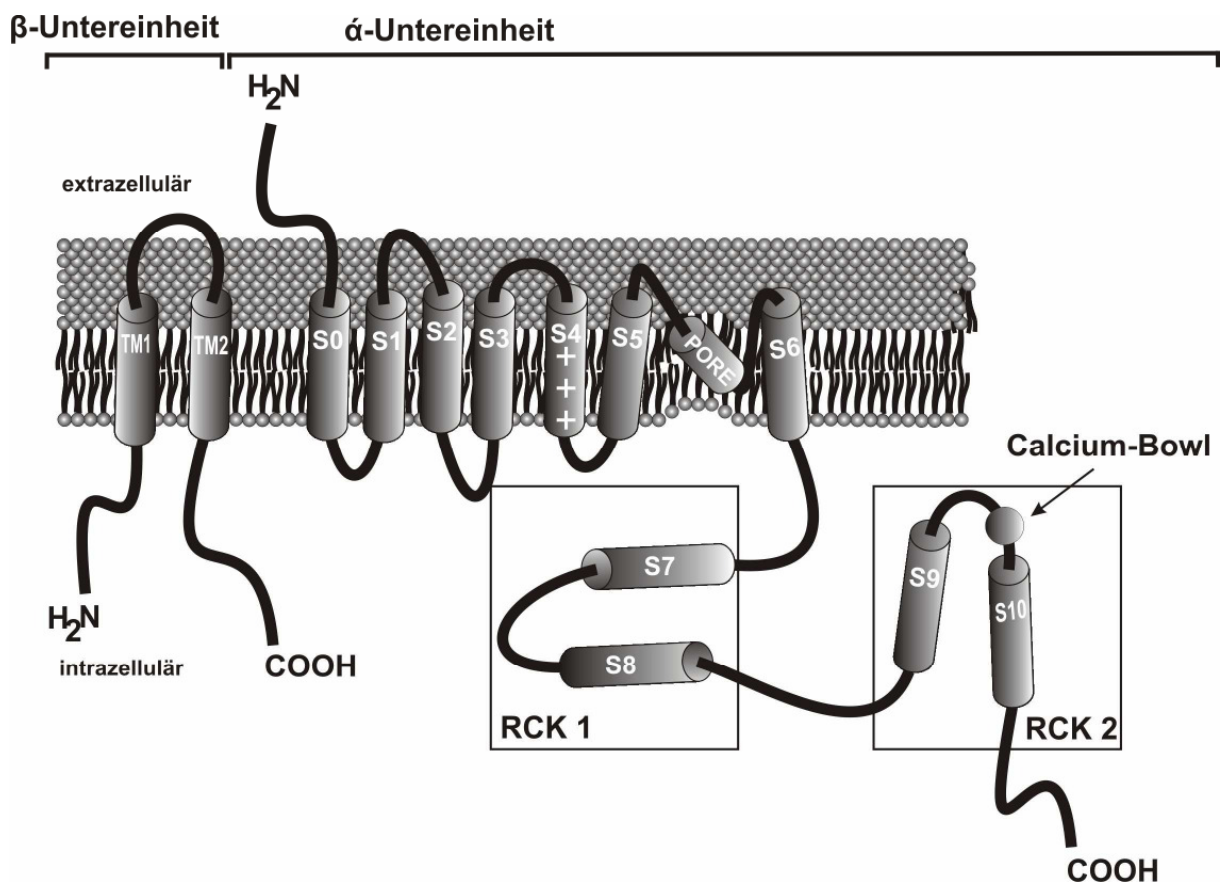


Abbildung 1-1 Struktur des BK_{Ca} mit α - und β -Untereinheit

Der BK_{Ca}-Kanal setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, die als α - beziehungsweise β -Untereinheit bezeichnet werden. Die α -Untereinheit besteht aus sieben Transmembransegmenten (S0-S6). Dies ist eine Besonderheit der Slo1 und Slo3 Kanäle, da die anderen Kanäle der Gruppe nur sechs Transmembrandomänen besitzen. Die Porenregion befindet sich zwischen S5 und S6. Das N-terminale Ende des Kanalproteins befindet sich außerhalb der Zelle, was durch die zusätzliche, als S0 bezeichnete Transmembrandomäne zustande kommt. Weitere hydrophobe Segmente (S7-S10) im C-Terminus sind beschrieben (Meera et al. 1997). Transmembransegment S4 fungiert bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen (K_v-

Kanäle) als sogenannter „Spannungssensor“. In diesem Segment befinden sich mehrere positiv geladene Arginine, welche auf Spannungsschwankungen reagieren und das Öffnungsverhalten des Kanals durch Konformationsänderung beeinflussen. Auch der BK_{Ca} besitzt dieses konservierte Arginin-Motiv und reagiert in bestimmtem Maße auf Spannungsänderungen (Aggarwal & MacKinnon 1996; Seoh et al. 1996; Diaz et al. 1998; Savalli et al. 2006).

Auffällig ist der für die Klasse der Slo-Kanäle charakteristische, extrem lange intrazelluläre C-Terminus. Dieser umfasst zwei Drittel des Gesamtproteins und enthält bestimmte Domänen, welche die Regulation des Kanals beeinflussen. Es finden sich zwei besondere Strukturen, die als „RCK“-Domänen bezeichnet werden. RCK steht hierbei für „regulators of conductance of K⁺“ (Regulatoren der Kaliumleitfähigkeit). Diese nehmen einen entscheidenden Einfluss auf den Öffnungsmechanismus des Kanals (Jiang et al. 2001).

Für die kalziumabhängige Regulation scheint eine Abfolge negativ geladener Aminosäuren im Endabschnitt des C-Terminus verantwortlich zu sein. Entsprechend wird diese Region als „Calcium bowl“ (Kalzium-Schale) bezeichnet (Schreiber & Salkoff 1997; Schreiber et al. 1999).

Die verschiedenen β -Untereinheiten bestehen aus zwei membrandurchspannenden Segmenten, wobei sich N- und C-Terminus des Proteins innerhalb der Zelle befinden. Bislang sind vier verschiedene β -Untereinheiten bekannt, die als β_1 - β_4 (KCNMB1-KCNMB4) bezeichnet werden. Die am besten untersuchte β -Untereinheit ist β_1 , welche 1994 zum ersten Mal beschrieben wurde (Knaus et al. 1994). Die Expression von β -Untereinheiten ist stark gewebeabhängig. So findet sich die β_1 -Untereinheit hauptsächlich in glatten Muskelzellen, den Haarzellen des Innenohrs und verschiedenen Neuronen (Orio et al. 2002). β_2 -Untereinheiten kommen im Gehirn und in chromaffinen Zellen vor (Xia et al. 1999), β_3 -Untereinheiten hingegen in Hoden, Pankreas und Milz (Xia et al. 2000). Die β_4 -Untereinheit scheint hauptsächlich im Gehirn exprimiert zu werden (Brenner et al. 2000).

Um einen funktionsfähigen Kanal zu bilden, lagern sich vier α -Untereinheiten zu einem porenbildenden Tetramer zusammen (Shen et al. 1994). Die β -Untereinheiten wirken sich hierbei modulierend auf die Funktionsweise des BK-Kanals aus. Interaktionen zwischen beiden Untereinheiten des BK_{Ca} sollen über den extrazellulären N-Terminus der α -Untereinheit und deren S0-Transmembransegment zustande kommen (Wallner et al. 1999).

Funktionsweise des BK_{Ca}

Mit einer Leitfähigkeit von 250 – 300 pS in symmetrischer KCl-Lösung besitzt der BK_{Ca} die größte Leitfähigkeit aller Kaliumkanäle. Dass dieser hohe Kaliumstrom von der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration abhängig ist, wurde schon bald festgestellt (Pallotta et al. 1981; Marty 1981) und durch viele Untersuchungen in verschiedenen Geweben immer wieder bestätigt (McManus & Magleby 1991; Tseng-Crank et al. 1994; Tseng-Crank et al. 1996; Wallner et al. 1999; Brenner et al. 2000). Später konnte zusätzlich gezeigt werden, dass selbst bei Abwesenheit von Ca²⁺-Ionen eine maximale, spannungsabhängige Aktivierung möglich ist (Horrigan et al. 1999; Horrigan & Aldrich 1999). Der BK_{Ca} verbindet also die Eigenschaften eines liganden- und spannungsgesteuerten Ionenkanals.

Unter „Ruhebedingungen“ in der Zelle, das heißt geringen intrazellulären Konzentrationen an freiem Ca²⁺ (nanomolarer Bereich), wird der Kanal nur durch extreme, unphysiologische Spannungsänderungen aktiviert. Steigt jedoch die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration an (z. B. durch die Öffnung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle, Anstieg der Ca²⁺-Konzentration in mikromolaren Bereich), kann der BK_{Ca} bereits durch geringe Änderungen des Membranpotentials aktiviert werden (Gribkoff et al. 2001). Auf diese Weise erfüllt der BK_{Ca} wichtige Aufgaben bei der Aufrechterhaltung des Membranpotentials und ist für die Zelle ein empfindliches Regulationsinstrument

Obwohl man mittlerweile immer besser versteht, wie das Öffnen und Schließen des Kanals vor sich geht, ist über seine biologische Funktion bislang noch wenig bekannt.

Biologische Funktion des BK_{Ca}

Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der biologischen Funktion des BK_{Ca} war die Entwicklung einer Maus, die, durch gezielte Inaktivierung des *slc1*-Gens, nicht mehr in der Lage ist, einen funktionsfähigen BK_{Ca}-Kanal zu bilden (BK-Knockout-Maus). Durch molekularbiologische Methoden wurde die Genregion, welche für die α -Untereinheit des BK_{Ca} codiert, derart mutiert, dass eine Expression des Ionenkanals nicht mehr möglich ist.

Diese Tiere besitzen eine Reihe physiologischer und anatomischer Auffälligkeiten (Phänotypen), durch deren Untersuchung sich Rückschlüsse auf die biologische Funktion des BK_{Ca} ziehen lassen.

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Gangunsicherheiten, welche bei den Tieren beobachtet werden, auf Störungen im Kleinhirn mit seinen Purkinje-Zellen

zurückzuführen sind. Diese Funktionsstörungen sind wiederum eine Folge des fehlenden BK_{Ca} (Sausbier et al. 2004).

Weiterhin tritt bei den BK-Knockout-Mäusen ein erhöhter Blutdruck auf. Dieser basiert auf einem primären Hyperaldosteronismus und darauf, dass die Mäuse eine verminderte Fähigkeit zur Vasodilatation besitzen (Sausbier et al. 2005).

Außerdem findet sich bei den Tieren eine überaktive Blase (Meredith et al. 2004), sie erfahren fortschreitenden Hörverlust (Ruttiger et al. 2004) und zeigen eine erektile Dysfunktion (Werner et al. 2005).

Zwischenzeitlich wurde auch beim Menschen eine Mutation im Gen des BK_{Ca}-Kanals entdeckt, die mit einer erhöhten Bereitschaft für epileptische Anfälle einhergeht (Du et al. 2005).

Dies sind nur einige Beispiele, die zeigen, welche biologische Rolle dem BK_{Ca}-Kanal im Säugetierorganismus zufällt.

1.2.1.2 Slo 2

Wie bei Slo1 lagen der Entdeckung von Slo2-Kanälen zunächst elektrophysiologische Beobachtungen zugrunde. In vielen Geweben wurden große Kaliumströme gemessen, die aber nicht, wie schon bekannt, durch Ca²⁺, sondern durch intrazelluläres Na⁺ aktiviert wurden. Zunächst wurden diese Ströme in Kardiomyozyten des Meerschweinchens (Kameyama et al. 1984; Luk & Carmeliet 1990) entdeckt, dann aber auch in verschiedenen Neuronen anderer Tierspezies (Huhn (Dryer et al. 1989; Dryer 1991); Katze (Schwindt et al. 1989); Ratte (Egan et al. 1992); Frosch (Dale 1993)) nachgewiesen.

Dass es sich bei diesen Kanälen um Mitglieder der *slo*-Genfamilie handelt, war vorerst nicht bekannt. Ebenso wenig, dass im Säugerorganismus zwei paraloge Gene (paralog= verwandte Gene, die auf ein gemeinsames Gen zurückzuführen sind) existieren, die als *slo2.1* und *slo2.2* bezeichnet werden.

Ein erster Schritt in Richtung der Identifizierung von Slo2 war die Klonierung und Charakterisierung von SLACK (Joiner et al. 1998). Aufgrund der Sequenzübereinstimmungen mit dem BK_{Ca} wurde der Kanal als SLACK (**s**equenc**e** **l**ike **a** **c**alcium-**a**ctivated **K**⁺-**c**hannel) bezeichnet.

Joiner et al. stießen durch Datenbankrecherche auf ein Gen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*, welches große Ähnlichkeit zum bekannten *slo1*-Gen besaß. Klonierung dieses Gens aus dem Gehirn der Ratte und Koexpression des Proteins mit Slo1 lieferte Kaliumströme mittlerer Leitfähigkeit. Aus dieser Beobachtung folgerten die Autoren, dass diese mittleren Ströme durch Zusammenlagerung von SLACK- und Slo-Einheiten zustande kommen.

Der erste tatsächlich als Slo2 bezeichnete Ionenkanal wurde 2001 aus *Caenorhabditis elegans* kloniert (Yuan et al. 2003). Auffällig an diesem Kanal war, dass seine Aktivierung außer von der Ca^{2+} -Konzentration zusätzlich von der Cl^- -Ionen-Konzentration abhängig war. Da dieser Kanal des Fadenwurms eine große Ähnlichkeit zum bereits früher beschriebenen SLACK aus der Ratte hatte, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei SLACK um das Slo2-Orthologe (ortholog=Verwandschaft von Genen in unterschiedlichen Spezies) bei Säugetieren handeln könnte.

Dieser Verdacht konnte bestätigt werden, als nämlich gezeigt wurde, dass es sich beim Na^+ -abhängige K^+ -Kanal, dessen Existenz schon mehrfach bewiesen worden war, um SLACK handelt, und dieser vom *slo2*-Gen codiert wird (Yuan et al. 2003). Dass in Säugern zusätzlich zu SLACK (jetzt als Slo2.2 oder KCNT1 bezeichnet) ein weiteres Gen vorhanden ist, welches für einen Na^+ -abhängigen K^+ -Kanal codiert, wurde 2003 von Bhattacharjee et al. (Bhattacharjee et al. 2003) gezeigt. Dabei handelt es sich um Slo2.1 (KCNT2), das jüngste Mitglied der *slo*-Genfamilie.

Da sich diese Arbeit mit der gezielten Inaktivierung von Slo2.1 befasst, soll dieser weiter unten genauer betrachtet werden.

1.2.1.3 Slo 3

Während die oben beschriebenen Ionenkanäle durch elektrophysiologische Messungen entdeckt worden waren, und die entsprechenden Gene im Nachhinein zugeordnet wurden, erfolgte die Identifizierung des *slo3*-Gens durch gezielten Vergleich der bekannten Sequenz des BK_{Ca} (Slo1) mit einer Computer-Datenbank.

Der Kanal, der dabei entdeckt wurde, konnte kloniert und exprimiert werden. Dabei handelt es sich um einen spannungsgesteuerten Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit. Ungewöhnlich ist, dass die Aktivität von Slo3, trotz seiner großen Ähnlichkeit zum BK_{Ca} , nicht durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bestimmt wird, sondern durch Änderungen des pH-Werts reguliert wird (Schreiber et al. 1998). Diese unterschiedliche Aktivierung hängt offensichtlich mit den zytosolischen Domänen der beiden Kanäle zusammen. In Mutationsstudien, bei welchen die C-Termini gegeneinander ausgetauscht wurden, konnte gezeigt werden, dass sich damit auch die Eigenschaften des jeweils anderen Kanals übertragen lassen. So war der mutierte Slo1 nun pH-abhängig, während die Slo3-Mutante auf Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration reagierte (Xia et al. 2004).

Über die biologische Funktion des Slo3 ist bislang nichts bekannt. Aufgrund seiner spezifischen Expression in Spermatozyten wird angenommen, dass er eine wichtige Aufgabe bei der Spermatozyten-Funktion erfüllt (Schreiber et al. 1998).

1.3 Slo 2.1 (Slick)

Das bislang letzte Mitglied der Slo-Genfamilie, der Na⁺- und Cl⁻-abhängige Kaliumkanal Slo2.1, wurde erstmals im Jahre 2003 charakterisiert (Bhattacharjee et al. 2003). Seither wird, in Anlehnung an den strukturell sehr ähnlichen SLACK (74 % Sequenzübereinstimmung), für Slo2.1 auch das Synonym SLICK gebraucht. SLICK steht hierbei für „sequence like an intermediate conductance K⁺-channel“.

Struktur des Slo2.1

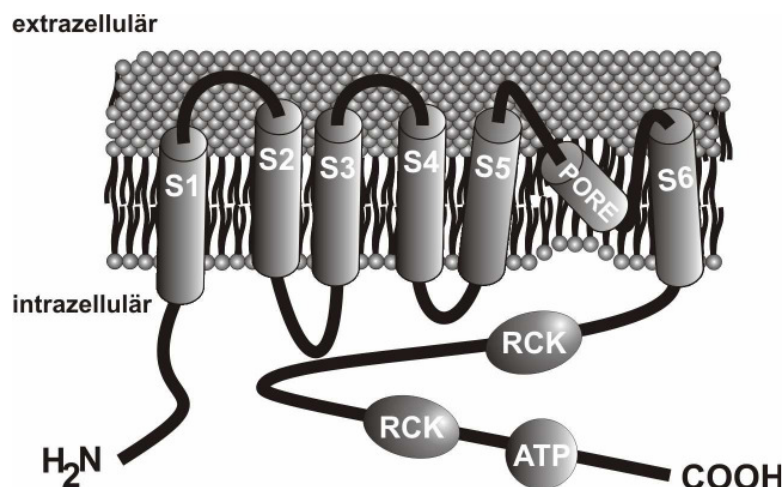


Abbildung 1-2 Struktur des Slo2.1 (SLICK)

Slo2.1 zählt wie auch Slo2.2 zur Klasse der Sechs-Transmembrankanäle. Die Porenregion befindet sich zwischen S5 und S6. Auch bei den Slo2 Paralogen findet sich der für die Slo-Genfamilie auffällig lange intrazelluläre C-Terminus. Durch Alignments mit dem in seiner Struktur genau bekannten BK_{Ca} (Slo1) wurden für Slo2.1 und Slo2.2 ebenfalls zwei RCK-Domänen ausfindig gemacht, über welche der Kaliumstrom reguliert wird. Nur bei Slo2.1, nicht hingegen bei Slo2.2, findet sich am distalen Ende des C-Terminus ein ATP-Bindungsmotiv (GXXXXGKT), was auf eine Regulierung des Kanals durch ATP schließen lässt.

Außerdem werden für den C-Terminus noch eine Reihe potentieller Phosphorylierungsstellen vorhergesagt (siehe Alignment in Abbildung 1-4).

Der ebenfalls intrazellulär gelegene N-Terminus ist bei Slo2.1 nur etwa halb so groß, wie bei Slo2.2.

Im Gegensatz zu ihren Verwandten Slo1 und Slo3 fehlt den beiden Slo2-Kanälen das als Spannungssensor fungierende Arginin-Motiv in S4. Demnach ist keine spannungsabhängige Regulation zu erwarten.

Abbildung 1-3 Alignment von SLICK und SLACK

```

mslick  mvdlesevpplppryrfrd11lgdqqgqnddr-----
mslack  maraklprspsegkagpgdtpagaaapeephglsp1lpargggsvgsdvgqrlhvedfsl
          ●
mslick  -----VQVEFYMNENTFKERLKLFFIKNQSSLRIRLNFSLKLLSCLLYIIRVLEKPE
mslack  dsslsqVQVEFYVNENTFKERLKLFFIKNQSSLRIRLNFSLKLLTCLLYIVRVLLDNP
          ● S1
mslick  SQGne-----WSHIFWVNRSLPLWGLQVSVLISLFETILLGYLSY
mslack  DQGigcwgctkynyftngsssefhWAPILWVERKMALWVIQVIVATISFLETMLIYLSY
          S2
mslick  KGNIEWEQILRIPFILEIINAVPFIISIFWPTLRNLFVPVFLNCWLAKHALENMINDLHRA
mslack  KGNIEWEQIFHVSFVLEMINTLPIITVFWPPLRNLFIPVFLNCWLAKHALENMINDFHRA
          S3 S4
mslick  IQRTQSAMFNQVLILISTLLCLIFTciCGIQHLERIGKLNLFDSLFCIVTFSTVGFQD
mslack  ILRTQSAMFNQVLILFCTLLCLVFTgtCGIQHLERAGGNLNLTSFYFCIVTFSTVGFQD
          S5 PORE
mslick  VTPETWSSKLFVVMICVALVVLPIQFEQLAYLWMERQKSGGNYSRHRAQTEKHVVLCVS
mslack  VTPKIWpSQLLVVILICVTLVVLPLQFEELVYLWMERQKSGGNYSRHRARTEKHVVLCVS
          ●
mslick  SLKIDLLMDFLNEFYAHPRLQDYVVVILCPTEMDVQVRRVLQIPMWSQRVIYVYLGSAKLD
mslack  SLKIDLLMDFLNEFYAHPRLQDYVVVILCPSEMDVQVRRVLQIPLWSQRVIYVYLGSAKLD
          ●
mslick  QDLLRAKMDNAEACFILSSRCEVDRTSSDHQTILRAWAVKDFAPNCPLYVQILKPENKFKH
mslack  QDLMRKMDNGEACFILSSRNEVDRTAADHQTILRAWAVKDFAPNCPLYVQILKPENKFKH
          ●
mslick  IKFADHVVCEEEFKYAMLALNCICPATSTLITLLVHTSRGQEGQOSPEQWQKTYGRCSGN
mslack  VKFADHVVCEEECKYAMLALNCICPATSTLITLLVHTSRGQEGQESPEQWQRTYGRCSGN
          ●
mslick  EVYHivleESTFFAEYEGKSFTYASFHAHKKFGVCLVGVRRDNKNILLNPGPRYIMNAS
mslack  EVYHirmgDSKFFREYEGKSFTYAAFHAHKKYGVCLIGLKREENKSILLNPGPRHILAAS
          ●
mslick  DICFYINITKEENSAFknqd---QQRKSNVSRSFYHGSPRLPVHSIIASMGTVAIDLQDT
mslack  DTCFYINITKEENSAFikqeeekQKRRGLAGQALYEGSPRLPVHSIIASMGTVAMDLOQT
          ●
mslick  SCRatsgptla-----LPSEGGKELRRPSIAPVLEVADTSSIQTCDLLSDQSEDE-TTP
mslack  DCRpsqgsggdgtkltlPTENGSGSRRPSIAPVLELADSSALLPCDLLSDQSEDEvTPS
          ●
mslick  DEETSSNLEYAKGYPPYSPYIGSSPTFCHLLqeKVPFCCLRLDKSCQHNYEDAKAYGFK
mslack  DDEGLSVVEYVKGYPPNSPYIGSSPTLCHLLpvKAPFCCLRLDKGCKHNSYEDAKAYGFK
          ●
mslick  NKLIIVaAETAGNGLYNFIVPLRAYRPPKELNPIVLLLDNPPdmHFLDAICWPFMYYM
mslack  NKLIIVsaAETAGNGLYNFIVPLRAYRSRRELNPIVLLLDNPKPDhHFLEAICCFMYYM
          ●
mslick  VGSIDNLDLRLCGVTFAANMVVDKESTMSAEEDYMADAKTIVNVQTLFRLFSSLSIIT
mslack  EGSVDNLDLQLCGIYADNLVVVDKESTMSAEEDYMADAKTIVNVQTMFRLFPSSLSITT
          ●
mslick  ELTHPaNMRFMQFRAKDCYSLALSLEKKEERERGSNLAFMFRLPFAAGRVSISMLDTLL
mslack  ELTHPsNMRFMQFRAKDSYSLALSLEKQERENGSNLAFMFRLPFAAGRVSISMLDTLL
          ●
mslick  YQSFVKDYMISITRLLGLDTPGSGFLCSMKITEDDLWIRTYARLYQKLCSSSTGDVPIG
mslack  YQSFVKDYMITITRLLGLDTPGSGYLCAMKVTEDDLWIRTYGRLFQKLCSSSAEIPIG
          ●
mslick  IYRTEsqkltt-----SESQISISVEEWEDTKDVKDPghhrslh-----RNSTSSDQS
mslack  IYRTEchvfsephdvrAQSQISVNMEDCEDTREAKGPwgtraasgsgsthGRHGGADPV
          ●
mslick  DHPLLRRKSMQWARRLSRKGPKHSgktaek---ITQQRNLNRYRRSERQELAEVKNRMKH
mslack  EHPLLRRKSLQWARKLSRKSTKQAGKapvatdwITQQRSLYRRSERQELSELVKNRMKH
          ●
mslick  LGLSTVGYDEMnd-----HQSTLSYILINPSPDTRLELNDVVY
mslack  LGLPTTGYEDVanltasdvnmrvnlgyldemndhHQNTLSYVLINPPDTRLEPNDIVY
          ●
mslick  LIRPDPLSYLPNSepsrknsicnaavq---DSREETQL
mslack  LIRSPLAHVASSsqsrksscsnklsscnpETREDETQL
    
```

- Phosphorylierung durch Proteinkinase C
- ▼ Phosphorylierung durch cAMP-abhängige Proteinkinasen
- ▬ Transmembrandomänen
- ATP-Bindungsmotiv

Alignment erstellt nach Bhattacharjee 2003 mit DIALIGN
 (B. Morgenstern 2004:DIALIGN: Multiple DNA and Protein
 Sequence Alignment at BiBiServ.Nucleic Acids Research 2, 33-W36)

Gewebeverteilung des Slo2.1

Durch erste Experimente, die auf dem Nachweis der entsprechenden mRNS mittels RT-PCR beruhten, konnte eine breite Gewebeverteilung von Slo2.1 gezeigt werden. So finden sich Transkripte der mRNS, die für Slo2.1 codiert, in Gewebeproben von Gehirn, Herz, Hoden, Leber, Lunge, Niere und Skelettmuskel. Slo2.2 hingegen findet sich wesentlich im Gehirn, z. T. auch in Hoden und Nieren (Yuan et al. 2003).

Die Verteilung der beiden Slo2-Kanäle über große Bereiche des Gehirns wurde daraufhin genauer analysiert. Dies geschah durch immunhistochemische Nachweise mit einem spezifischen Antikörper gegen SLICK bzw. SLACK. Detaillierte Informationen über die Verteilung der beiden Kanäle in bestimmten Bereichen des Gehirns finden sich bei Bhattacharjee et al. 2002 (SLACK) bzw. Bhattacharjee et al. 2005 (SLICK).

Funktionsweise des Slo2.1

Bei Slo2.1 handelt es sich um einen selektiven K^+ -Kanal mit einer Leitfähigkeit von 60 – 140 pS. Damit liegt diese zwischen den Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen mittlerer Leitfähigkeit (IK_{Ca} , 20-85 pS (Ishii et al. 1997)) und denen, mit großer Leitfähigkeit, wie sie weiter oben beschrieben wurden.

Das Öffnungsverhalten des Kanals wird, wie von Slo2.2 bereits bekannt (Joiner et al. 1998), von der intrazellulären Na^+ - und Cl^- -Konzentration bestimmt. Auch reagieren beide Kanäle aufgrund des fehlenden Spannungssensors kaum auf Änderung des Membranpotentials. Eine Eigenschaft, die Slo2.1 vom ansonsten sehr ähnlichen Slo2.2 unterscheidet, ist seine Empfindlichkeit gegenüber der ATP-Konzentration in der Zelle. Durch einen Anstieg der ATP-Konzentration wird die Offenwahrscheinlichkeit des Slo2.1 herunter gesetzt. ATP ist also ein endogener Blocker von Slo2.1 (Bhattacharjee et al. 2003).

In weiteren Tests mit bekannten Kaliumkanalblockern zeigten beide Slo2-Kanäle ein nahezu identisches Profil. So haben die spezifischen Inhibitoren des BK_{Ca} Charybdotoxin (Miller et al. 1985) und Iberiotoxin (Galvez et al. 1990), beides peptidische Skorpiongifte, keinen Effekt. Der unspezifischere Kaliumkanalblocker Tetraethylammonium (TEA) (Blatz & Magleby 1984) blockiert die Kanäle erst in unüblich hohen Konzentrationen (20mM, sonst: 1mM).

Durch Ba^{2+} hingegen, welches ein weiterer unspezifischer Blocker von Kaliumkanälen ist (Armstrong et al. 1982) lassen sich die Kaliumströme von Slo2.1 und Slo2.2 unterdrücken (Bhattacharjee et al. 2003).

In aktuellen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass beide Kanäle auch über die Aktivierung G_q-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR für G-protein-coupled receptors) moduliert werden (Santi et al. 2006). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind membranständige, aus sieben Transmembrandomänen bestehende Proteine. Palczewski et. al gelang es im Jahre 2000 erstmalig, die Struktur eines G-Protein-gekoppelten-Rezeptors darzustellen (Palczewski et al. 2000). Die Bindung spezifischer Liganden bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors. Durch diese Konformationsänderung werden im Zellinneren s.g. GTP-bindende Proteine (G-Proteine) aktiviert, welche daraufhin weitere Signalkaskaden in Gang setzen (Stryer & Bourne 1986). Unter anderem resultiert eine derartige Signalkaskade durch die Vermittlung sekundärer Botenstoffe (Phospholipase C, Inosit-1,4,5-triphosphat, Diacylglycerol) in der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (Exton 1996).

Da im C-terminalen Teil von Slo2.1 und Slo2.2 mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für die PKC vorhergesagt waren (Bhattacharjee et al. 2003), wurden beide Kanäle zunächst auf ihre Regulation durch Proteinkinasen untersucht (Santi et al. 2006). Hierfür wurden beide Slo2-Kanäle in Oozyten exprimiert und der starke PKC-Aktivator PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) zugesetzt. Das überraschende Ergebnis des Experiments war die gegensätzliche Regulation der Slo2-Kanäle: Während Slo2.2 durch die Proteinkinase C aktiviert wurde, ergab sich für Slo2.1 eine Inaktivierung.

In einem weiteren Experiment sollte die natürliche Aktivierung der PKC durch Signaltransduktion G_q-Protein-gekoppelter Rezeptoren und deren Einfluss auf die Slo2-Kanäle untersucht werden. Hierfür wurden verschiedene GPCRs, der metabotrope Glutamatrezeptor (mGluR1), der muskarinische Acetylcholin-Rezeptor (mAChR1) oder der Angiotensin-II-Rezeptor vom Typ 1 (AT₁-Rezeptor) mit dem jeweiligen Slo2-Paralogen koexprimiert. Die GPCRs wurden durch spezifische Liganden aktiviert und die Kanalaktivität gemessen. Die Ergebnisse dieses Versuchs bestätigten die gegensätzliche Regulation von Slo2.1 und Slo2.2 (Santi et al. 2006).

Dass die Hypothese der Modulation von Slo2-Kanälen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auch tatsächliche biologische Relevanz haben könnte, wurde dadurch gezeigt, dass mit Immunfluoreszenz eine Kolokalisation von Slo2.1 bzw. Slo2.2 und mAChR1 bzw. mGluR1 in bestimmten Gehirnregionen nachgewiesen werden konnte (Santi et al. 2006).

Biologische Funktion des Slo2.1

Da da bislang sämtliche von Slo2.1 bekannten Eigenschaften durch Expression im heterologen System, also *in vitro* Messungen, beschrieben wurden, kann über die biologische Funktion des Slo2.1 im Moment nur spekuliert werden.

Es wird angenommen, dass Na^+ -abhängige K^+ -Kanäle wie der Slo2.1 eine Art Schutzfunktion vor Zerstörung von Gewebe durch Minderdurchblutung (Ischämie) besitzen könnten. Eine Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff führt zur Nekrose (Absterben der Zellen) und geht mit einer Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration einher (Lazdunski et al. 1985). Am Herzen äußert sich dies im Myokardinfarkt. Da die Na^+ -abhängigen K^+ -Kanäle erstmals in Kardiomyozyten entdeckt wurden (Kameyama et al. 1984) und wegen ihrer Aktivierung durch intrazelluläres Na^+ , sollen sie eine protektive Rolle bei der Ischämie spielen.

Ihr gehäuftes Vorkommen im Gehirn (Bhattacharjee et al. 2002; Bhattacharjee et al. 2005) und ihre gegensätzliche Regulation durch bestimmte Neurotransmitter (Santi et al. 2006) erlaubt den Schluss, dass die Slo2-Kanäle die Erregbarkeit von Neuronen beeinflussen und diese entweder nach oben, oder nach unten regulieren können.

Die Rolle von Slo2.1 und Slo2.2 bei der Regulation und Koordination von Strömen in auditorischen Neuronen (Neurone, welche wichtig für den Hörprozess sind) wurde jüngst von Yang et al. beschrieben (Yang et al. 2007).

1.4 Knockout-Tiermodelle

In der Medizin dienen Tiere schon lange als Modellorganismen, an denen Symptome von Krankheiten, deren Auswirkungen auf den Körper und deren Behandlungsmöglichkeiten studiert werden. Immer in Hinblick darauf, die gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen.

Die rasanten Fortschritte auf dem Gebiet der Gentechnologie brachten ihrerseits eine Fülle neuer Anwendungen für die biomedizinische Forschung. Mithilfe molekularbiologischer Methoden ist es nun möglich, Nukleinsäuren, die als Träger der Erbinformation erkannt wurden (Avery et al. 1944), nahezu beliebig zu manipulieren. Seit Abschluss des Humangenomprojekts im Jahre 2001 (Venter et al. 2001) und des Mausgenomprojekts 2002 (Waterston et al. 2002) stehen die vollständig sequenzierten Genome dieser beiden Säuger-Organismus in Online-Datenbanken zur Verfügung. Die Kenntnis der Genomsequenz bildet die Grundlage der systematischen Untersuchung des Erbguts.

Ein überraschendes Ergebnis dieser beiden Projekte war, dass anstelle der erwarteten 100 000 nur etwa 30 000 proteincodierende Regionen (Gene) in der Gesamtheit des Genoms gefunden wurden. Folglich muss jedes Gen die Information für mehrere Proteine in sich tragen.

Welche Aufgabe jedoch die einzelnen Gene für den Gesamtorganismus erfüllen, ist zum jetzigen Zeitpunkt allenfalls ansatzweise bekannt. Eine Möglichkeit zur

Aufklärung seiner biologischen Funktion ist die gezielte Inaktivierung des jeweiligen Gens durch s.g. *Gene Targeting* (siehe Abbildung 1-5). Dabei kann das interessierende Gen gezielt ausgeschaltet werden, so dass kein funktionsfähiges Protein mehr gebildet wird (*Knock-out*). Wird hingegen eine bestimmte Mutation in das Genom eingefügt, verändert man damit auch das entsprechende Protein in der gewünschten Position. In diesem Fall spricht man von *Knock-in*.

Grundlegende Idee der Knockout-Technologie ist es, das Gen, dessen biologische Rolle aufgeklärt werden soll, zu zerstören, während alle anderen Gene intakt bleiben. Zeigt der entsprechende Organismus daraufhin mehr oder weniger auffällige Besonderheiten im Vergleich zum unveränderten Exemplar (*Wildtyp*), kann daraus geschlossen werden, dass dies eine Folge der künstlich durchgeführten Genveränderung (-zerstörung) ist.

Durch systematisches Ausschalten der einzelnen Gene eines Lebewesens lässt sich also deren Funktion nach und nach genau studieren. Ein großer Vorteil ist, dass diese Untersuchungen *in vivo*, das heißt am lebenden Objekt durchgeführt werden können.

Prinzipiell ist das *Gene Targeting* in jedem Organismus möglich. So wurden derartige Knockout-Experimente unter anderem an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Rong & Golic 2001) oder dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Plasterk & Groenen 1992) durchgeführt.

Das derzeit beste Tiermodell in der biomedizinischen Forschung ist allerdings die Maus (*Mus musculus*). Selbst ein Säugetier, ist sie dem Menschen ähnlicher, als sich auf den ersten Blick vermuten lässt: Die Maus besitzt ebenfalls etwa 30 000 Gene. Für über 90 % davon findet sich ein entsprechendes orthologes Gen beim Menschen. Nur für ca. 1 % der Gene gibt es kein entsprechendes Orthologon in der anderen Spezies (Waterston et al. 2002).

Diese hohe Übereinstimmung in der genetischen Ausstattung macht die Maus zum bevorzugten Studienobjekt für die Forschung auf den Gebieten der Physiologie, Pathophysiologie oder Pharmakologie. Hinzu kommt die relativ einfache Handhabung der Tiere die zudem eine kurze Generationszeit und eine hohe Reproduktionsrate besitzen.

Mit dem ersten erfolgreichen *Gene Targeting* in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus (Thomas & Capecchi 1987), war bereits vor 20 Jahren die Grundlage zur Entwicklung von Knockout-Mäusen geschaffen. Seither wurden unzählige verschiedene Knockout-Mauslinien etabliert. Da diese Mäuse oftmals Krankheitssymptome aufweisen, wie sie auch beim Menschen auftreten können, lassen sich durch die Knockout-Technologie Zusammenhänge zwischen (defekten) Genen und damit assoziierten Krankheiten herstellen. Knockout-Mausmodelle tragen somit zum besseren Verständnis der molekularen Ursachen von Krankheiten bei und

können einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung und Testung neuer, zielgerichteter Medikamente leisten.

1.5 Gene Targeting

Vorraussetzung für das erfolgreiche *Gene Targeting* ist die Herstellung eines entsprechenden Targetingkonstruktes (**B**). Bei der Zielstruktur, die verändert werden soll, handelt es sich meistens um ein Exon (**A**). Wichtig ist, dass die genaue Sequenz des Genorts (Genlocus) bekannt ist, weil nur dann ein exaktes Konstrukt hergestellt werden kann.

Prinzipiell gliedert sich ein Targeting-Konstrukt in vier Bereiche: Einen Homologiebereich, der sich 5´ des zu verändernden (auszuschaltenden) Exons befindet (**I**), der Abschnitt, der die Veränderung beinhaltet (**II**), einen 3´ Homologiebereich (**III**) und das Vektor-Rückgrat („Vector-backbone“, **IV**). Beim Vektor-Rückgrat handelt es sich in der Regel um ein klassisches Plasmid mit hoher Kopienzahl. Als Mutation (**II**) wird meist ein positiver Selektionsmarker, z.B. die Neomycinresistenz eingeführt, womit hinterher eine Selektion der korrekt rekombinierten Stammzellklone durchgeführt werden kann (siehe hierzu Kapitel 3.3.15.3 Homologe Rekombination in ES-Zellen bzw. 3.3.15.4 1. Targeting). Die beiden Homologiebereiche werden oftmals auch als „Arme“ bezeichnet. Funktionell sollen sich die homologen Arme nach Linearisierung (hier Linearisierung auf der 5´-Seite) (**C**) an ihren Zielort anlagern (Heteroduplex-Bildung), worauf es anschließend zum Austausch der entsprechenden DNS-Abschnitte, dem *Crossing over*, kommt (**D**) (Thomas et al. 1986).

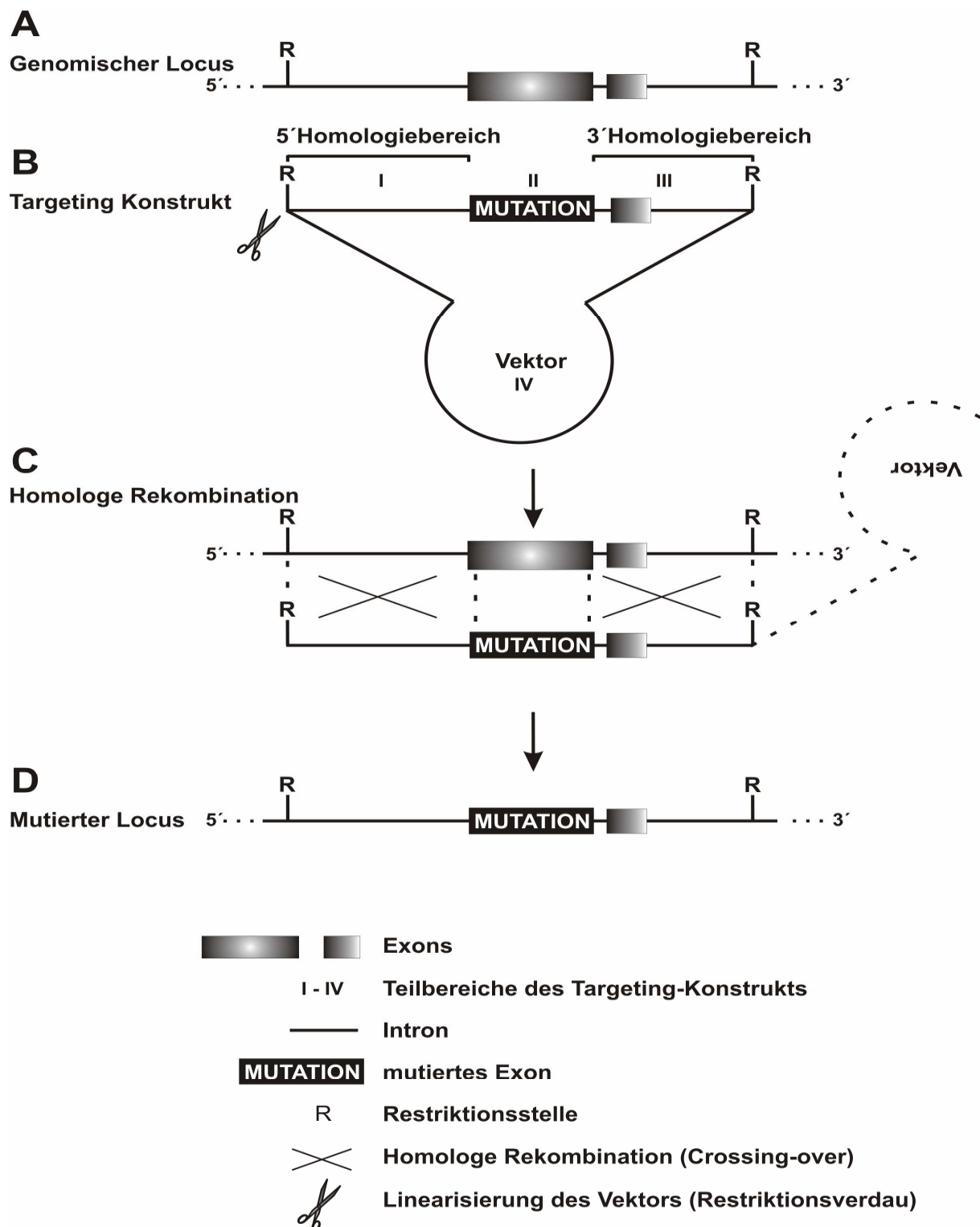
Je länger die homologen Abschnitte sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit der Rekombination (Hasty et al. 1991). Optimale Längen liegen zwischen 5 und 10 kb, so dass das Gesamtkonstrukt eine Größe von ca. 20 kb besitzt. Größere Homologiebereiche würden die Rekombinationseffizienz zwar erhöhen, in ihrer Handhabung sind derartig lange Fragmente aus genomischer DNS aber für die ohnehin schon aufwändigen Klonierungsarbeiten des Targeting-Konstruktes nicht praktikabel.

Nur etwa 1 von 1000 Zellen nimmt das Konstrukt auf und von 1000 transfizierten Zellen kommt es bei nur einer Zelle zur korrekten homologen Rekombination (Thomas et al. 1986).

Ein weiterer Faktor, der die Rekombinationseffizienz beeinflusst, ist unter anderem die Zugänglichkeit des Genortes (Hasty et al. 1991). Ist der anvisierte Zielort im Genom leicht für das Konstrukt zugänglich, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für die korrekte Rekombination.

Widererwarten hat die Anzahl der in die Zelle eingebrachten DNS-Moleküle keinen Einfluss auf die Rekombinationsrate. Daraus resultiert der Schluss, dass die Kapazität der zelleigenen „Rekombinationsmaschinerie“ der limitierende Schritt für die Häufigkeit des Rekombinationsereignisses darstellt (Thomas et al. 1986).

Abbildung 1-4 „Gene Targeting“ (Erklärungen im Text)



1.5.1 Doppelte Selektion

Zusätzlich zur Homologen Rekombination, bei der das Konstrukt an der richtigen Stelle im Genom integriert (**A**), kommt es häufig auch zur nicht homologen, zufälligen Integration in das Genom (**B**).

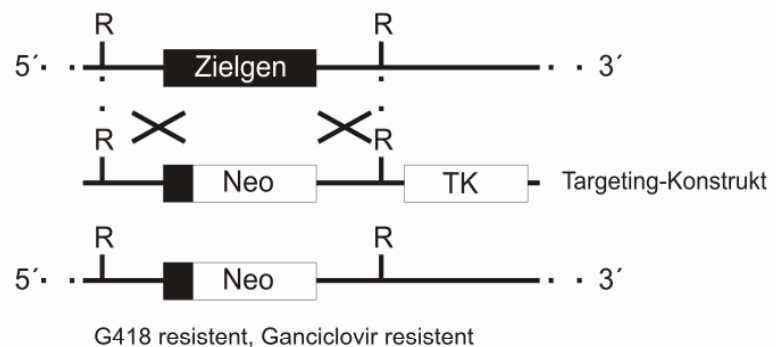
Wird zusätzlich zum positiven Selektionsmarker (positiv= alle Zellen die diesen Selektionsmarker tragen, überleben die Selektion) noch ein weiterer, negativer Selektionsmarker (negativ= alle Zellen, die diesen Selektionsmarker **nicht** tragen, überleben die Selektion) verwendet, erhöht die Ausbeute an richtig rekombinierten Klonen beträchtlich (Mansour et al. 1988). Als negativer Selektionsmarker dient das Thymidinkinase-Gen, welches für die Herpes-simplex-Thymidinkinase codiert.

Bei Rekombination am richtigen Genort, fällt das auf der 3'-Seite, außerhalb des rekombinanten

Bereichs angebrachte Thymidinkinase-Gen weg, während dies bei zufälliger Integration im Genom oftmals mit eingebaut wird.

Diese Zellen exprimieren also die Thymidinkinase. Bei Anwesenheit des Nukleosid-Analogons Ganciclovir im Medium wird dieses durch die Thymidinkinase aktiviert und die entsprechenden ES-Zellklone sterben ab.

A Homologe Rekombination



B Zufällige Integration

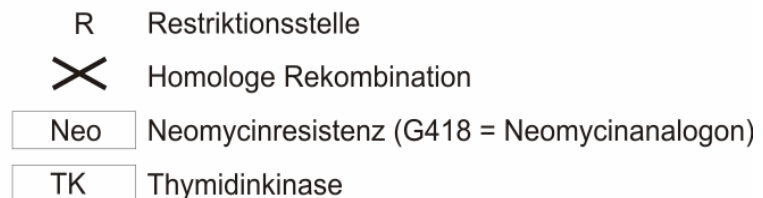
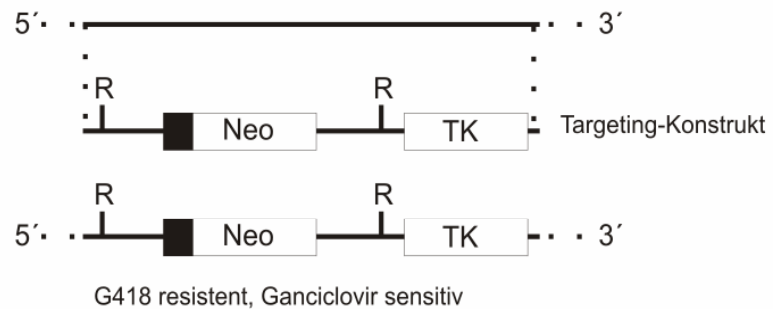


Abbildung 1-5 Positiv-/ Negativselektion

Doppelte Selektion durch Verwendung der Neo/ TK-Kassette. (Nach Capecchi 2005)

1.6 Das Cre/ LoxP-System

Zur Erzeugung eines Knockouts genügt es nicht in jedem Fall, das entsprechende Gen durch Zerstörung des Leserasters zu inaktivieren. Der dabei entstehende „totale Knockout“ kann bei überlebenswichtigen Genen bereits im Embryonalstadium tödlich sein. Daher ist es nötig, ein System zu benutzen, das einen Knockout des Gens zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht. Ein solches System ist das s.g. Cre/ LoxP-System (Abremski et al. 1983). Hierbei handelt es sich um ein Rekombinase-System, bei dem ein Enzym, die Cre-Rekombinase (Cre= causes recombination) eine spezifische Sequenz erkennt, schneidet und die Fragmente neu zusammensetzt. Die Erkennungssequenz wird als LoxP-Sequenz („loxP-site“, locus of crossing-over (x) des Phagen P1) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine Abfolge von 34 bp wobei je 13 palindromisch angeordnete Basen eine

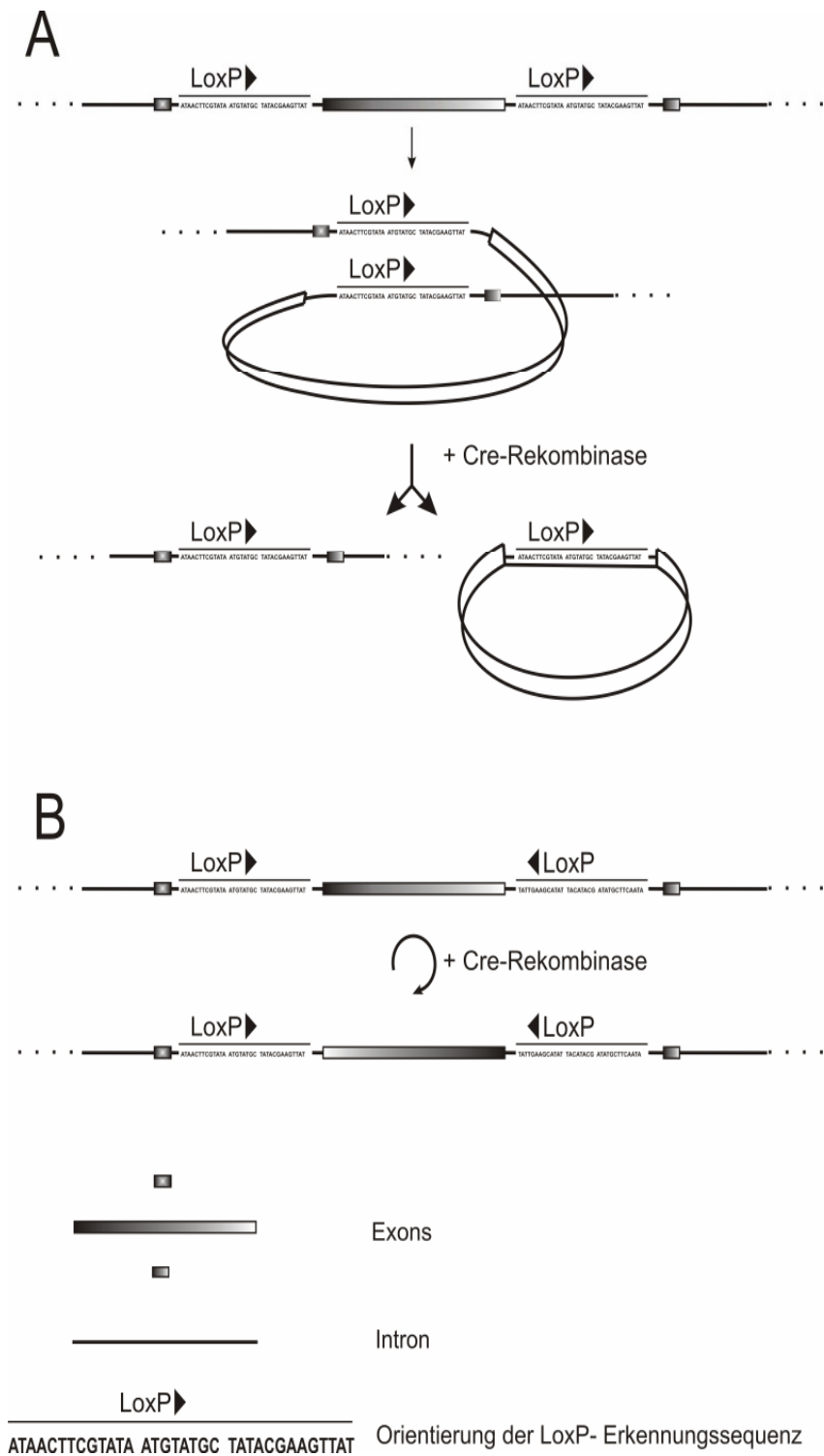


Abbildung 1-6 Cre-LoxP-System (Erklärung im Text)

unsymmetrische Sequenz aus 8 Basen flankieren. Daraus ergibt sich eine Orientierung, welche die Art der Rekombination beeinflusst (siehe Abbildung 1-7). Befinden sich zwei LoxP-Sequenzen in der gleichen Orientierung, wird das, was sich zwischen den beiden Sequenzen befindet, unter Zyklisierung herausgeschnitten wobei eine LoxP-Sequenz erhalten bleibt (**A**). Sind die LoxP-Sequenzen entgegengesetzt orientiert, kommt es zu einer Inversion der flankierten Sequenz (**B**). Die Ver-

wendung dieses Systems bei der gezielten Inaktivierung von Genen ermöglicht es, in einem Schritt sowohl „generelle“ Knockout-Mäuse, bei denen das Gen in sämtlichen Zellen zerstört ist, als auch „konditionale“ Knockout-Mäuse zu erzeugen. Diese besitzen eine intakte Version des Gens. Allerdings ist ein Exon, das für eine essentielle Struktur des jeweiligen Proteins codiert, von zwei LoxP-Sequenzen flankiert („floxed“). Bis auf diese zwei kurzen DNS-Sequenzen sind gefloxtes und Wildtyp-Gen also identisch. Bei den „gefloxten“ Tieren ist es möglich, das Gen zu einem späteren Zeitpunkt und auch spezifisch in einem oder mehreren Geweben auszuschalten. Auf diese Weise kann das Problem des embryonal letalen Knockouts elegant umgangen werden. Konditionale Knock-

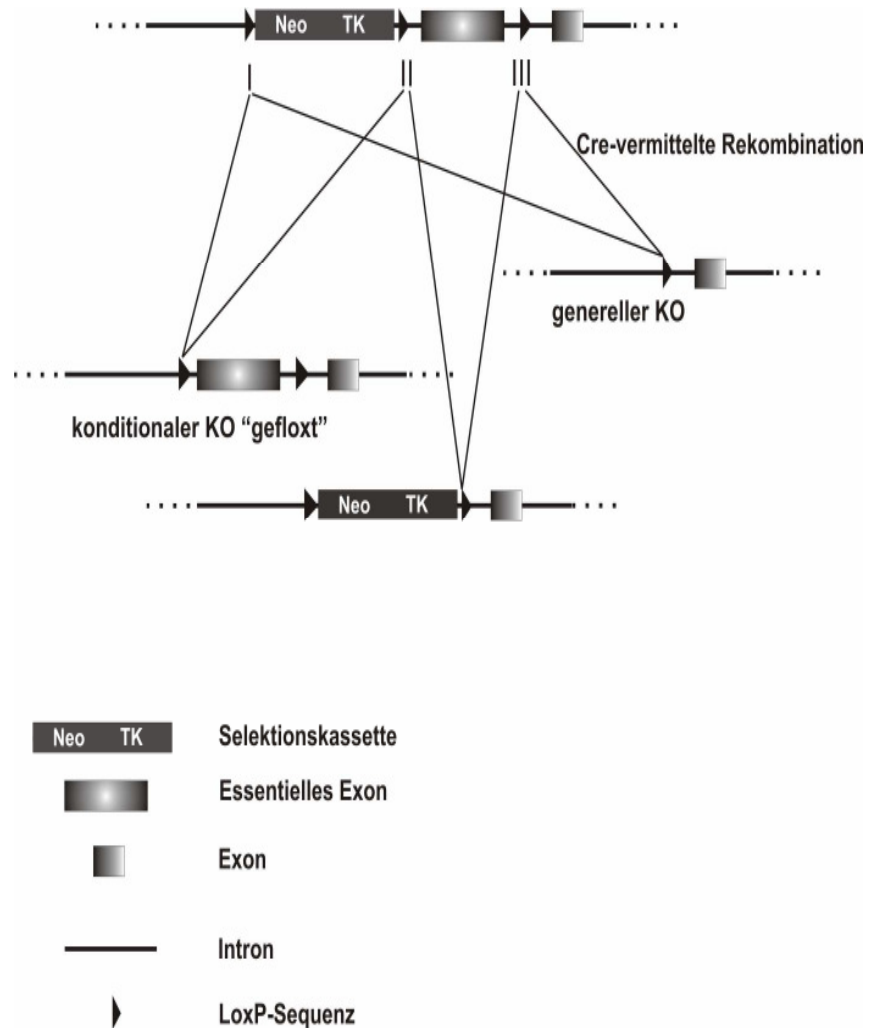


Abbildung 1-7 Cre-vermittelte Rekombination

Bei Verwendung von drei LoxP-Sequenzen entstehen durch Cre-vermittelte Rekombination drei mögliche Konstrukte, abhängig davon, welche LoxP-Sequenzen rekombinieren:

- LoxP I+III: Genereller Knockout
- LoxP I+II : Konditionaler Knockout („gefloxt“)
- LoxP II+III: Genereller Knockout + Selektionsmarker

out-Mäuse erlauben ferner, eine bessere Korrelation zwischen inaktiviertem Gen, Gewebe und Phänotyp herzustellen. Zur Etablierung dieser Mauslinien werden s.g. Cre-Mäuse benötigt, welche die Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines gewebe- oder zelltypspezifischen Promotors exprimieren. Durch Verpaarung von Cre-Mäusen und geflochten Mäusen erreicht man eine zielgerichtete Deletion des Gens im Cre-exprimierenden Gewebe (Gu et al. 1994), (siehe hierzu auch Kapitel 6, Diskussion, Abbildung 6-1). Obwohl sich der Selektionsmarker im Intronbereich des Gens befindet, kann seine Anwesenheit die Expression beeinflussen. Mit Hilfe der Cre-Rekombinase kann die Resistenzkassette wieder aus dem Genom entfernt werden. Dies kann bereits in den ES-Zellen, durch transiente Expression der Cre-Rekombinase, oder erst im Tier, durch Kreuzung mit E1a-Cre-Mäusen (Expression von Cre-Rekombinase im frühen Embryonalstadium) erfolgen (Lakso et al. 1996; Holzenberger et al. 2000; Xu et al. 2001) (siehe Kapitel 6, Diskussion, Abbildung 6-2). Hierfür wird ein Targeting-Konstrukt mit drei LoxP-Sequenzen benötigt (siehe Abbildung 1-8). Bei der Cre-vermittelten Rekombination können, je nachdem, welche LoxP-Sequenzen rekombinieren, drei verschiedene Ereignisse eintreten. Erfolgt die Rekombination zwischen LoxP-Sequenz I und III resultiert daraus der generelle Knockout mit totalem Funktionsverlust des Gens in sämtlichen Zellen. Rekombination zwischen LoxP-Sequenz I und II entfernt die Selektionskassette, die entsprechende Genregion ist „gefloxt“, behält aber ihre Funktion. Das dritte Ereignis, Rekombination zwischen LoxP-Sequenz II und III, liefert ein Konstrukt, bei dem die Selektionskassette noch vorhanden ist. Durch Selektion mit dem Nukleosidanalogon Ganciclovir (siehe 4.3.15.5 2. Targeting) werden derartig veränderte Zellen allerdings eliminiert, so dass letztendlich nur genereller und konditionaler Knockout entstehen. Der Generelle Knockout wird nach der Anzahl der vorhandenen LoxP-Sequenzen auch als „L1“, der konditionale Knockout entsprechend als „L2“ bezeichnet.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Wie zu Anfang bereits beschrieben wurde, spielen Ionenkanäle, speziell Kaliumkanäle, eine wichtige Rolle für den zellulären Ionenaustausch und die interzelluläre Kommunikation. Bei einer so großen Anzahl von bekannten Ionenkanälen ist es schwierig zu beurteilen, welche Aufgabe jeder einzelne dieser Kanäle für sich erfüllt.

Als sehr gutes Modell für die Erforschung der biologischen Funktion eines Proteins hat sich die Knockout-Maus erwiesen. Die gezielte Inaktivierung des Gens, welches für das gewünschte Protein codiert, erlaubt es, Tiere zu generieren, denen nur dieses eine Protein fehlt. Durch Vergleich der Knockout-Mäuse mit ihren unveränderten Geschwistern (Wildtyp-Mäuse) lassen sich Verbindungen zwischen Genen und ihrer biologischer Funktion herstellen. Neben dem Vorteil, die Physiologie der Knockout-Mäuse *in vivo* studieren zu können, bieten sie darüber hinaus die Möglichkeit, die Effektivität neuartiger Behandlungsmethoden oder neu entwickelter Pharmaka zu testen, bevor diese zur Anwendung am Menschen kommen.

Die bereits früher in unserem Labor entwickelte BK_{Ca}-Knockout-Maus ist ein Beispiel dafür, wie anhand dieses Tiermodells Einblicke in die biologische Funktion dieses Kaliumkanals gewonnen werden konnten (Sausbier et al. 2004; Sausbier et al. 2005).

Mit dem Ziel, die biologische Funktion des Na⁺- und Cl⁻-abhängigen Kaliumkanals Slo2.1 aufklären zu können, sollte in der vorliegenden Arbeit das hierfür nötige Knockout-Tiermodell entwickelt werden.

Da über dieses junge Mitglied der *slo*-Genfamilie zu Beginn der Arbeit nur sehr wenig, weder Genstruktur noch Aminosäuresequenz, bekannt war, stellte sich zunächst die Aufgabe, diese zu ermitteln.

Daraufhin sollte zur näheren Charakterisierung des Slo2.1 die cDNS der murinen Variante dieses Kanals kloniert und exprimiert werden.

Die genaue Kenntnis des *slo2.1*-Genortes diene als Grundlage für die Konstruktion eines Targeting-Vektors, der sowohl die Herstellung des generellen Knockouts, bei dem der Kanal im ganzen Organismus ausgeschaltet ist, als auch des gewebespezifischen (konditionalen) Knockouts ermöglicht.

Unter Verwendung des Cre/LoxP-Systems sollten durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen die entsprechenden Mauslinien etabliert und ihrer phänotypischen Untersuchung zugänglich gemacht werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Agar	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hess.Oldendorf
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	SERVA, Heidelberg
BSA V (Rinderserumalbumin)	Paesel+Lorei, Duisburg
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ficoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat(KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat(NaH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
RNase away	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-Aminoethan	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Trypton	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	SERVA, Heidelberg

Radiochemikalien	Bezugsquelle
α - ^{32}P -dCTP	GE-Healthcare, Freiburg

3.2 Kit-Systeme

3.2.1 DNS/ RNS Isolierung

Kit	Bestellnummer	Bezugsquelle
GFX PCR High Pure PCR Template Preparation Kit	27 9602 01	GE-Healthcare, Freiburg
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	11 769 828 001	Roche Diagnostics, Mannheim
MinElute Gel Extraction Kit	12662	Qiagen, Hilden
Perfectprep Plasmid Mini	28604	Qiagen, Hilden
Oligotex direct mRNA Midi/Maxi Kit	0032 005 454	Eppendorf, Hamburg
	70041	Qiagen, Hilden

3.2.2 Klonierung

Kit	Bestellnummer	Bezugsquelle
TOPO TA Cloning Kit	K450001	Invitrogen, Karlsruhe

3.2.3 PCR

Kit	Bestellnummer	Bezugsquelle
Expand High Fidelity PCR System	1732641	Roche Diagnostics, Mannheim
SuperScript OneStep RT-PCR-System	11922010	Invitrogen, Karlsruhe

3.2.4 Southern Blotting

Kit	Bestellnummer	Bezugsquelle
NEBlot Kit	N1500L	New England Biolabs, Frankfurt

3.3 Enzyme

3.3.1 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungssequenz (5' → 3')	Bezugsquelle
Ava II	G/GWCC	New England Biolabs, Frankfurt
BamH I	G/GATCC	New England Biolabs, Frankfurt
Bsu36 I	CC/TNAGG	New England Biolabs, Frankfurt
Cla I	AT/CGAT	New England Biolabs, Frankfurt
EcoR I	G/AATTC	New England Biolabs, Frankfurt
Hind III	A/AGCTT	New England Biolabs, Frankfurt
Hpa I	GTT/AAC	New England Biolabs, Frankfurt
Kpn I	GGTAC/C	New England Biolabs, Frankfurt
Nar I	GG/CGCC	Roche Diagnostics, Mannheim
Nco I	C/CATGG	New England Biolabs, Frankfurt
Not I	GC/GGCCGC	New England Biolabs, Frankfurt
Pst I	CTGCA/G	New England Biolabs, Frankfurt
Sbf I	CCTGCA/GG	New England Biolabs, Frankfurt
Xho I	C/TCGAG	New England Biolabs, Frankfurt

W=A oder T, N=A, C, G oder T, /= Schnittstelle

3.3.2 Polymerasen

Polymerasen	Bestellnummer	Bezugsquelle
Platinum Pfx	11708-013	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNS Polymerase	11 435 094 001	Roche Diagnostics, Mannheim

3.3.3 DNS modifizierende Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
CIP (Calf Intestinal Phosphatase)	New England Biolabs, Frankfurt
T4 DNS Ligase	New England Biolabs, Frankfurt

3.3.4 Sonstige Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim

3.3.5 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide, PCR-, sowie Sequenzierungsprimer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Verwendete Primer

Name	Sequenz (5'→3')	T _m (°C)	Verwendung
porex_fw	TGT GGG ATT CAG CAT CTA GAA	55,9	Sequenzierung von mslick; Cosmidbank-Screening
porex_rv	ACT ACA AGG GCA ACG CAG A	56,7	Sequenzierung von mslick; Cosmidbank-Screening
seqbst-1_fw	ATG AAG AGG TTG AAG AAC ACG A	56,5	Sequenzierung von mslick
seqbst-1_rv	CTG AGC TCT GTG TCG ACT GTA GT	62,4	Sequenzierung von mslick
seqbst-2_fw	TCT TTG TCG TTG CTA TGA TCT G	56,5	Sequenzierung von mslick
seqbst-2_rv	GCT AAC ATG GCG TAC TTA AAC T	56,5	Sequenzierung von mslick
seqbst-3_fw	CTG CGA AGT GGA TAG AAC CTC	59,8	Sequenzierung von mslick
seqbst-3_rv	AAC ATA TGT CTG AAG CAT TC	51,2	Sequenzierung von mslick
seqbst-4_fw	TGA ATC CAG GTC CTC GAT ACA	57,9	Sequenzierung von mslick
seqbst-4_rv	TGA AGA TGT TTC TTC ATC TGG T	54,7	Sequenzierung von mslick
seqbst-5_fw	TGC GAT CTC CTA AGT GAC CAG	59,8	Sequenzierung von mslick
seqbst-5_rv	AGT CTG CAC ATT CAC AAT CGT C	58,4	Sequenzierung von mslick
seqbst-6_fw	AGA GGA AGA CTA CAT GGC AGA T	58,4	Sequenzierung von mslick
seqbst-6_rv	AGA GGT TCA GTC GCT GTT GAG	58,8	Sequenzierung von mslick
seqbst-7_fw	AGG GCC GAA GCA CTC TGG TA	61,4	Sequenzierung von mslick
seqbst-7_rv	AAT GTC TCT TAT TTT TCT TTT CA	50	Sequenzierung von mslick
seqbbst-7.2_rv	GCA AGA TCC CTG CAA GGA CTA C	62,1	Sequenzierung von mslick;
mslick_fw	ATG GTT GAT TTG GAG AGC GAA GT	58,9	Generierung der mslick cDNA
pBSKS+_fw.1	GGC CGC AAT ACC ATG GGT ATG GCG CCT CGC AG		Neue Klonierungsstelle für Hilfsvektor
pBSKS+_rv.1	GAT CCT GCG AGG CGC CAT ACC CAT GGT ATT GC		Neue Klonierungsstelle für Hilfsvektor
pBSKS+_fw.3	GAT CCC TAG GCT AGC ATG TCA GAT CTA TGA AT		Neue Klonierungsstelle für Hilfsvektor
pBSKS+_rv.3	CGA TTC ATA GAT CTG ACA TGC TAG CCT AGG		Neue Klonierungsstelle für Hilfsvektor
pSP72_fw	TCG AGC CAG CCT GCA GGT ATG GAG CTA GCG GGC AT		Neue Klonierungsstelle für Hilfsvektor
pSP72_rv	GCA TGC CCG CTA GCT CCA TAC CTG CAG GCT GGC		Neue Klonierungsstelle für Hilfsvektor
PCR-Fr_fw	CAC TGT CAT ACC TAG CTC CCA G		Generierung des PCR-Fragments mit LoxP und Bsu36I Schnittstelle
PCR-Fr_rv	CCT GCA GGC CTT AGG ATA ACT TCG TAT AGC ATA CAT TAT ACG AAG TTA TAA GGG CTT GGAT GGA GCC CAA CT		Generierung des PCR-Fragments mit LoxP und Bsu36I Schnittstelle
KA_fw	AGC CTA GTA TAC CAC AAA TCT GTG	59,3	Generierung des kurzen Arms
KA_rv	CTA TAA AGC ATT AAG TCC ATG AC	55,3	Generierung des kurzen Arms
PCR-Fr.2_fw	GAG CTA AAGG TTA TTG TGG ACA TA	57,1	Generierung des PCR-Fragments als Rest des langen Arms
PCR-FR.2_rv	ACT GTT GCT GCC AAA ACA CTA	58,4	Generierung des PCR-Fragments als Rest des langen Arms
KO-Fragment_1	TGT ACA TCT TAG CAT TCA GTT	52	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_2	AAG CAG TCT AGC AGC TCG CCT	61,8	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_3	TTG AAC TTA CTC GTG GAT AG	53,2	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_4	TGA GTC CAA GTG CAA GAC TAC A	58,4	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_5	CTA TAA AGC ATT AAG TCC ATG AC	55,3	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_6	TGA GGA TAC CCA CTC TTA TGA CAG	61	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_7	CAT TTA CAG ATA GCA CCT GGT AC	58,9	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_8	ACT GTT GCT GCC AAA ACA CTA G	58,4	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_9	TAA CCA CAT AAA TTT AGA TGT G	50,9	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_10	GAT CTG TGC ATC TCT CCA AAT CC	60,6	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_11	GTA AGA TTC AAG GAC AGT GAG TC	58,9	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_12	AGT CCA TCT GCT TTG TAT CCA GG	60,6	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_13	ACA TGC TTC TCT GTC TGA GCT CT	60,6	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_14	CCT TTC TAA CAA TAA CAA GTC AT	53,5	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_15	CTG AAT GGT CTA ACT CAG GAC TT	58,9	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_16	ATA ATA TGC ATT TCT GAT ATT AC	50	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_17	TTA ATA GTA TGT TAT GAA CAG TA	50	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_18	AGA GCC TTG AAG GTA GAT CAC TC	60,6	Sequenzierung des Knockout-Fragments

KO-Fragment_19	GAA TTG AGA AAT TAG GAG ATA TC	53,5	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_20.1	AAG GTG ATG CTG AGG AAT GT	55,3	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_21.1	TGA ATG GTA AAT GTT GGA AAT	50	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_22	GAA CAG TGA GAG CTG GAC AAC AG	62,4	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_23.1	GTA TTA GCA ATA ATT GTG TCA G	52,8	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_24	GAG CTT GCC TAC ACT TGC AGT AT	60,6	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_25	ACG CTT AGA TGT AGT GCA AAC GT	58,9	Sequenzierung des Knockout-Fragments
KO-Fragment_26	ACT CTC TTA GAC GAT GAA GTC AT	57,1	Sequenzierung des Knockout-Fragments
3'Probr2_fw	AGG CTC CTG TCT GTA AGC ACA CAA	64,6	Generierung der 3'Sonde
3'Probe2_rv	TGG CCC AAC TTG GGA TAC ATC TC	62,4	Generierung der 3'Sonde
3'intern2_fw	ATG CCT AGG TAC CAA GTA ATG ATG	57,6	Generierung der 3'Sonde (intern)
KO-Fragment_21	GTG TTT AAC AGA GGT ATA CGC TA	57,1	Generierung der 3'Sonde (intern)
5'Probe2_fw	CCT GAC AAT GAG AGC AAA	54,5	Generierung der 5'Sonde
5'Probe2_rv	TAG TAA ATA TTA CAA TAC TGA ATT G	51,5	Generierung der 5'Sonde
Gen1 (Fr8Cla2)_fw	TCT GGA GTG ATT TCA GGA TCT GT	58,9	Genotypisierungs-PCR
Gen2 (TK-2)_fw	GAT CAG AAG CCG TCG ACT AG	59,4	Genotypisierungs-PCR
Gen3 (KOFr_5)_rv	CTA TAA AGC ATT AAG TCC ATG AC	55,3	Genotypisierungs-PCR
Gen4 (KOFr_12)_rv	AGT CCA TCT GCT TTG TAT CCA GG	60,6	Genotypisierungs-PCR

3.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.4.1 Geräte

Gerät		Hersteller
Brutschränke		Hera Cell, Heraeus
DNS Konzentrator		Concentrator, Eppendorf
Drehofen		OV 1, Biometra
Elektroporator		Gene Pulser II, Biorad
FIGE		FIGE Mapper, Biorad
Gasbrenner		Gasprofi 1 Wild-Tec, Göttingen
Geldokumentationssystem		BioDocAnalyse, Biometra
Gelelektrophorese		Subcell Systems, Biorad
		i-Mupid, Cosmo Bio
Handmonitor		LB122, Berthold, Bad Wildbad
Heizblock		ThermomixerCompact, Eppendorf
Mikroskop		Hund Wilovert 30, Hund Wetzlar
PCR Maschinen		Mastercycler, Eppendorf
		MastercyclerGradient, Eppendorf
Phosphoimager		BAS-1500, Fuji
Phosphoimagerplatten		BAS-MP 2040s, Fuji
Photometer		BioPhotometer, Eppendorf
Pipetten	1-Kanal	Pipetman 10, 20, 200, 1000 µL Gilson
	8-Kanal	ResearchPro 20-300 µL, 50-1200 µL, Eppendorf
Pipettierhilfe		Accu-Jet, Brand, Wertheim
Rotor		A6.9, Kontron Hermle, Gosheim
Schüttelinkubator		Edmund Bühler KS-10/ TH 10
Spannungsquelle		Standard Power Pack P25, Biometra
Sterilwerkbank		Herasafe, Heraeus
Szintillationszähler		Liquid Scintillation Analyzer 2500 TR, Packard, Frankfurt
Trockenschrank		Binder FD, Binder, Tuttlingen
Ultraturrax		T8, IKA, Staufen
UV-Crosslinker		Biolink DNA Crosslinker, Biometra
Vakuumpumpe		KNF Laboport, KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Vortex		MS1 Minishaker, IKA, Staufen
Wasseraufbereitungsanlage		Milli-Q Biocel, Millipore GmbH, Schwalbach
Wasserbad		C 10, Thermo Haake, Karlsruhe
Zentrifugen		Centrifuge 5415 D, Eppendorf
		Centrifuge 5810 R, Eppendorf
		Centrifuge 5804, Eppendorf
		RC 5C Plus, Sorvall

3.4.2 Verbrauchsmaterial

3.4.2.1 Material Molekularbiologie

Material		Bestellnummer	Bezugsquelle
Chromatographiesäulen		17 0855 02	NICK COLUMNS, GE Healthcare, Freiburg
Einmalpipetten	2 mL	4486	Sarstedt, Nümbrecht
	5 mL	4487	Sarstedt, Nümbrecht
	10 mL	4488	Sarstedt, Nümbrecht
	25 mL	4489	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier		GB 002	Schleicher & Schuell/ Whatman
Kryoröhrchen		368632	Nunc
Nylon-Membran		RPN303B	Highbond N+, GE Healthcare, Freiburg
Parafilm		H666.1	Roth
Pasteurpipetten	Ungestopft	4522	Roth
	Gestopft	E327.1	Roth
Petrischalen		821472	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Ungestopft		
	200 µL	70760002	Sarstedt, Nümbrecht
	1000 µL	70762200	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	1.5 mL	4182.1	Roth
	1.5 mL (safelock)	0030 120 086	Eppendorf
	2.0 mL (safelock)	0030 120 094	Eppendorf
	12 mL	352059	Falcon
	15 mL	430766	Corning
	50 mL	430897	Corning
	PCR	0030 124 502	Eppendorf
Saran-Folie		9068.1	Roth
UV-Küvetten		0030 106 300	Eppendorf

3.4.2.2 Material Zellkultur

Material		Bestellnummer	Bezugsquelle
Elektroporationsküvetten		165-2081	Bio-Rad
Kulturflaschen	25 cm ²	430639	Corning
	75 cm ²	430641	Corning
	175 cm ²	431080	Corning
Kulturschalen	10 cm	430167	Corning
	6-Loch	3516	Corning
	24-Loch	3526	Corning
	96-Loch	3599	Corning
Pipettenspitzen (Etips)	300 µL	0030 000 897	Eppendorf
	1200 µL	0030 000 935	Eppendorf
Reagenzien-Trog (Tip-Tub)		0030 058 607	Eppendorf

3.4.2.3 Sonstiges Material

Material	Bestellnummer	Bezugsquelle
Cosmid-Bank	Nr. 121 (129/ola)	RZPD, Berlin
Salmon Sperm DNA	201190	Stratagene, Amsterdam
2-Log DNA Ladder	N3200S	New England Biolabs

3.5 Bakterien

Bakterienstamm	Bestellnummer	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> XL2-Blue MRF'	200151	Stratagene
<i>E. coli</i> XL10-Gold	200315	Stratagene
<i>E. coli</i> SCS110	200247	Stratagene

3.6 Wasser

Sämtliche Lösungen, Reagenzien und Puffer wurden mit autoklaviertem Milli-Q-Wasser hergestellt.

4 Methoden

4.1 Bakterienkultur

4.1.1 Medien

Medium	Zusammensetzung	
LB (Luria-Bertani)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O	ad 1 L
NZY ⁺	Casein Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1 L
	→autoklavieren	
	→pH auf 7,5 mit NaOH	
	1 M MgCl ₂	12,5 mL
	1 M MgSO ₄	12,5 mL
	Glucose 20 %(w/v)	20 mL
	→Diese Zusätze vorher sterilfiltrieren	
SOC	Trypton	2 %(w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glucose	20 mM

Soweit nicht anders beschrieben, wurde zur Kultivierung der Bakterien autoklaviertes (121° C, 2 bar, 20 min) LB-Medium (Luria-Bertani) verwendet. Lagerung bei RT im Dunkeln. Die positive Selektion plasmidtragender Bakterien erfolgte durch Beifügung eines geeigneten Antibiotikums.

Durch Zugabe von Agar zum Medium vor dem Autoklavieren wurde Festmedium (LB-Agar) hergestellt. Dazu wurde das autoklavierte Medium auf ca. 50° C abgekühlt, das sterilfiltrierte Antibiotikum in der richtigen Menge zugefügt und die Lösung in Petrischalen ausgegossen. Nach Abkühlen auf RT wurden die Schalen bei 4° C im Dunkeln gelagert.

Medium	Zusammensetzung
LB-Agar	Agar 13,5 g LB-Medium ad 1 L

Die Antibiotika wurden in entsprechender Menge in H₂O gelöst, sterilfiltriert und in 1 mL-Aliquots bei -20° C aufbewahrt.

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ mL in H ₂ O	100 µg/ mL
Kanamycin	10 mg/ mL in H ₂ O	50 µg/ mL

4.1.2 Kultivierung

Flüssigkultur

Die entsprechende Menge LB-Medium (3 mL in Plastikröhrchen für Minikulturen, 200-300 mL in Erlenmeyerkolben für Maxikulturen) wurde mit der richtigen Menge des Antibiotikums versetzt und mit dem gewünschten Bakterium angeimpft (Impföse oder Zahnstocher). Bei 37° C und 225 rpm wurde 8-12 h inkubiert.

Plattenkultur

Um einzelne Bakterienkolonien zu erhalten, wurde die flüssige Bakteriensuspension auf antibiotikumhaltigen Agar-Platten ausgestrichen (Drigalskispatel) und bei 37° C aerob 12-16 h inkubiert. Die bewachsenen Platten konnten mit Parafilm verschlossen bis zu 8 Wochen bei 4° C gelagert werden.

4.1.3 Langzeitlagerung

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterien wurden 300 μL Bakteriensuspension, im logarithmischen Wachstum befindlich, mit 600 μL Glycerol_{autoklav.} gemischt und bei -80°C eingefroren.

4.2 Plasmide

Unter Plasmiden versteht man ringförmige, doppelsträngige DNS-Moleküle, die neben dem bakteriellen Genom innerhalb eines Bakteriums vorliegen und sich dort vermehren können. Für die Klonierung von DNS-Fragmenten wurden verschiedene Vektoren benutzt.

Die Klonierungsstellen der kommerziellen Vektoren wurden zum Teil gegen eigene mit anderer Schnittstellenanordnung ausgetauscht.

4.2.1 Kommerzielle Plasmidvektoren

Plasmid	Eigenschaften	Resistenz	Bezugsquelle
pBluescript II KS+	Standard Klonierungsvektor mit E. coli Replikationsursprung für eine hohe Kopienzahl	<i>Amp^r</i> , <i>Kan^r</i>	Stratagene
pBSloxPneotkloxP	Abgeleitet von pBluescript, enthält zwei <i>loxP</i> Erkennungssequenzen, das HSV-1 Thymidinkinasegen (<i>tk</i>) und das Neomycinresistenzgen (<i>neo</i>), jeweils unter der Kontrolle von PGK Promotoren	<i>Amp^r</i>	
pcDNA3.1 –	Expressionsvektor für Säugerzellen, enthält CMV-Promotor für hohe Expressions-Raten	<i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i>	Invitrogen
pCR 2.1 TOPO	Vektor für direkte PCR Klonierung, Topoisomerase I aktivierter Vektor	<i>Amp^r</i> , <i>Kan^r</i>	Invitrogen
pSP 72	Standard Klonierungsvektor, enthält SP6 und T7 Promotoren für in-vitro RNS-Transkription	<i>Amp^r</i>	Promega

4.2.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Vektoren

Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmidvektoren		
Name	neue Klonierungsstelle	Sequenz
pBSKS+neu.1	NotI-NcoI-NarI-BamHI	5'- <u>GGCCGC</u> AAATACCATGGGTAT <u>GGCGCC</u> TCGCAG-3'
pBSKS+neu.2	BamHI-NheI-BglII-Clal	5'-GATCCCTAG <u>GCTAGC</u> ATGTC <u>AGATCT</u> ATGAAT- 3'
pSP72neu.2	Clal-NheI-SbfI-XhoI	5'- <u>TCGAGCCAGCCTGCAGG</u> TATGGAG <u>GCTAGCGGGCAT</u> -3'

Fett/ Unterstrichen=Erkennungssequenzen der Enzyme aus Spalte 2
Normal=Spacer-Nukleotide für bessere Schnitt-Effizienz der Enzyme

Die Sequenzen der neuen Klonierungsstellen wurden als Sense- und Antisense-Oligos bestellt, durch Erhitzen auf 95° C und anschließendes abkühlen lassen zusammengelagert und in den entsprechend geöffneten Vektor einkloniert.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Isolierung von Plasmid-DNS

Die Isolierung von Plasmid-DNS basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly 1979). Dazu werden die Bakterien in einem ersten Schritt alkalisch mit NaOH/ SDS lysiert. Hierbei denaturieren DNS, RNS und Proteine. Zugewetzte RNase-A verdaut die RNS. Im zweiten Schritt, der Neutralisation mit Kaliumacetat, bleibt die jetzt renaturierte kleine Plasmid-DNS in Lösung, während die große genomische Bakterien-DNS denaturiert bleibt und zusammen mit Proteinen, präzipitierten Zellbestandteilen und SDS abgetrennt werden kann.

4.3.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNS

Über-Nacht-Kulturen von einzelnen Kolonien in 3 mL LB mit entsprechender Antibiotikum-Konzentration wurden bei 4000 rpm 5 min pelletiert und die Plasmide nach Vorschrift des PerfectPrep Plasmid Mini Kits (Eppendorf) isoliert. Das Reinigungsprinzip beruht auf darauf, die Plasmid-DNS an Silica-Gel zu binden und nach Waschen wieder zu eluieren.

Vorgehensweise

- Abgießen des Überstandes
- Resuspendieren der Bakterien in ca. 1 mL LB
- Überführen in 1,5 mL Eppendorf, Zentrifugieren 30 s bei 13000 rpm
- Überstand abnehmen
- Resuspendieren in 100 μ L P1 (Kit)
- Zugabe von 100 μ L P2 (Kit), Mischen
- Zugabe von 100 μ L P3 (Kit), Mischen
- Zentrifugieren 1,5 min bei 13000 rpm
- Überführen des Überstandes auf Säule (Kit)
- Zugabe von 400 μ L Binding-Matrix (Kit), 30 s bei 13000 rpm zentrifugieren
- Zugabe von 400 μ L Wasch-Puffer (Kit), 1 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Säule auf neues 1,5 mL Eppendorf transferieren
- Zugabe von 50 μ L Elutions-Puffer (oder Wasser), 1 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren

4.3.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNS

Einzelkolonien wurden für ca. 8 h in 3 mL antibiotikumhaltigem LB-Medium angezogen, die Minikultur anschließend in 300 mL antibiotikumhaltiges LB-Medium (Erlenmeyerkolben) überführt und über Nacht bei 37°C und 225 rpm kultiviert. Die anschließende Maxipräparation wurde nach Vorschrift des HiSpeed Plasmid Maxi Kits (Qiagen) durchgeführt.

4.3.2 Isolierung von genomischer DNS

Die Isolierung genomischer DNS aus eukaryotischem Zellmaterial gestaltet sich aufgrund der enormen Größe der Moleküle ungleich schwieriger, als die Isolierung von Plasmid-DNS. Die großen Moleküle zerbrechen durch Scherkräfte (Pipettieren, Schütteln, Zentrifugieren) leicht in kleinere Fragmente. Deshalb muss zur Isolation genomischer DNS mit äußerster Sorgfalt vorgegangen werden, um letztendlich Fragmente in der Größenordnung von etwa 100 kb aufzureinigen zu können.

Der Lysepuffer enthält ein Detergens (N-Laurylsarcosin) um die Zellmembranen zu solubilisieren. Weiterhin werden Proteine denaturiert und durch den Zusatz von Proteinase-K abgebaut. EDTA komplexiert mehrwertige Kationen und unterbindet

dadurch die Aktivität der vorhandenen DNAsen. Anschließend wird die DNS über Alkoholfällung oder eine Säule aufgereinigt.

4.3.2.1 Isolierung von genomischer DNS aus ES-Zellen

ES-Zellen wurden in 96-well-Platten bis zur Konfluenz und Gelbwerden des Mediums kultiviert. Nach Lyse der Zellen wurde die genomische DNS mit 100 % Ethanol gefällt, getrocknet und anschließend direkt bei -20°C gelagert oder im entsprechenden Restriktionsenzym-Mix gelöst, verdaut und bis zum Gelauftrag eingefroren.

Lysepuffer

10 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl pH 7,5
10 mM	EDTA
0,50%	N-Laurylsarcosin
0,25 mg/ mL	Proteinase K (Immer frisch zugeben!)

Proteinase K (20 mg/ mL) in 80 μL Aliquots bei -20°C Lagern

Pro 96-well-Platte werden 6 mL Lysepuffer und 75 μL Proteinase K (20 mg/ mL) gemischt

75 mM NaCl in Ethanol 100%

150 μL	5M	NaCl
10 mL	100%	Ethanol

Vorgehensweise

- Medium vorsichtig über eine Ecke abkippen
- 2 x mit je 180 μL PBS waschen
- Zugabe von 50 μL Lysepuffer pro well
- Platte mit Parafilm verschließen, in Frischhaltefolie verpacken
- Platte in dicht verschließbarer Plastikschißel in feuchte Tücher verpacken
- Über Nacht bei 55°C inkubieren
- Nach abkühlen auf RT Zugabe von 100 μL Ethanol/ NaCl
- 1 h bei RT inkubieren, vorsichtig über eine Ecke abgießen
- 3 x mit Ethanol 70 % waschen, vorsichtig über eine Ecke abgießen
- Platte auf Papiertüchern abklopfen und ca. 30 min bei RT trocknen lassen
- Platte mit Parafilm verschließen, bei -20°C einfrieren

Alternativ:

- Zugabe von 40 μL Restriktionsenzym-Mix pro well, Mischen
- Platte mit Parafilm verschließen, in Frischhaltefolie verpacken
- Über Nacht bei 37° C inkubieren
- Zugabe von 8 μL 6 x Dye pro well
- Platte mit Parafilm verschließen
- Bis zum Gelauftrag bei -20° C lagern

4.3.2.2 Isolierung von genomischer DNS aus Mausgewebe

Zur bestimmung des Genotyps junger Mäuse wurde genomische DNS aus Gewebebiopsien der Maus (z.B. Schwanzspitze) nach Vorschrift des High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) gewonnen. Die DNS wurde direkt für die Genotypisierungs-PCR verwendet.

Vorgehensweise

- Gewebeprobe in steriles, nukleasefreies 1,5 mL Eppendorf geben
- Zugabe von 200 μL Lysepuffer (Kit)
- Zugabe von 40 μL Proteinase-K-Lösung (Kit, frisch zubereitet)
- 3 Stunden oder über Nacht bei 55° C verdauen
- Gewebe mit 10 μL PCR-Spitze oder Injektionsnadel im Eppendorfgefäß „zerreiben“
- Zugabe von 200 μL Bindungspuffer
- Zugabe von 100 μL Isopropanol
- 5 min bei 13000 RPM zentrifugieren
- Überstand auf Säule transferieren, 1 min bei 800 RPM zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Zugabe von 500 μL Inhibitor-Removal Puffer
- 1 min bei 8000 RPM zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Zugabe von 500 μL Wasch-Puffer
- 1 min bei 8000 RPM zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 10 s bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugieren
- Säule auf neues 1,5 mL Eppendorf transferieren
- Zugabe von 200 μL erhitztem (70° C) Elutionspuffer
- 1 min bei 8000 RPM zentrifugieren
- Direkter Einsatz für PCR oder Lagerung der DNS-Lösung bei – 20° C

4.3.3 Isolierung von mRNS aus Mausgewebe

Die Isolierung von mRNS aus dem Maus-Gehirn erfolgte nach Vorschrift des Oligotex direct mRNS Midi/Maxi Kits (Qiagen). Die Gesamt-RNS des Gewebes ist ein Gemisch aus tRNS, rRNS und mRNS. Im Unterschied zu anderen RNS besitzt mRNS einen „Poly-A⁺-Schwanz“, eine Sequenz von 100- 200 Adenin-Nukleotiden, die 3' an das Ende eukaryotischer oder viraler mRNS angeknüpft wird. Dadurch lässt sich die mRNS selektiv von den anderen abtrennen.

Werden nun Oligo-desoxy-Thymidin-Nukleotide (Oligo-dT-Nukleotide) an eine feste Matrix gekoppelt, hybridisiert der Poly-A⁺-Schwanz der mRNS mit den Oligo-dTs und bleibt an die Matrix gebunden, während andere RNS in der Lösung verbleiben.

Im Anschluss lässt sich die mRNS mit geeignetem Puffer wieder von der Oligo-dT-Matrix eluieren. Bei Oligotex handelt es sich um Polystyrol-Latex-Partikel, an deren Oberfläche die Oligo-dT-nukleotide gekoppelt sind.

Alle verwendeten Geräte wurden vor Gebrauch mit RNase away gespült.

Vorgehensweise

- Das frisch präparierte Organ sofort in ein Gefäß mit 3 mL OL1-Puffer überführen und mittels Ultra-Turrax homogenisieren
- Zugabe von 6 mL ODB-Puffer, mischen
- 3 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand in neues Gefäß überführen
- Zugabe von 250 µL Oligotex-Suspension, mischen (Vortex), 10 min bei RT inkubieren
- 5 min bei 13000rpm zentrifugieren, Überstand abpipettieren und verwerfen
- Pellet in 300 µL OL1 resuspendieren
- Zugabe von 1200 µL ODB-Puffer, 3 min bei 70° C inkubieren, dann 10 min auf RT abkühlen lassen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand abpipettieren und verwerfen
- Pellet in 1 mL OW1-Puffer resuspendieren
- Suspension in 2 mL Eppendorf überführen, 5 min bei 13000rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet 2 x mit je 1 mL OW2-Puffer waschen
- Pellet in 500 µL OEB-Puffer (70° C) resuspendieren
- Suspension auf große Säule in 2 mL Eppendorf überführen, 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Säule nochmals mit 500 µL OEB-Puffer (70° C) eluieren und Eluat (1 mL) bei -20° C lagern

4.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

4.3.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Über folgende Formel lässt sich die Konzentration errechnen:

$$c \text{ [}\mu\text{g/ mL]} = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

c= Konzentration der Ausgangslösung

OD₂₆₀= Optische Dichte, gemessen bei 260 nm

V= Verdünnungsfaktor

F= Multiplikationsfaktor: 50 für dsDNS

40 für RNS

33 für esDNS

20 für Oligonukleotide

Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ erlaubt zudem eine Aussage über die Reinheit der Lösung. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 ist die Proteinverunreinigung der Lösung als gering anzusehen.

4.3.4.2 Konzentrationsbestimmung über Agarosegelelektrophorese

Neben der Photometrischen Bestimmung lässt sich die Konzentration von DNS-Lösungen auch über eine Agarosegelelektrophorese (s.u.) bestimmen. Trägt man den Probenansatz zusammen mit einer Verdünnungsreihe aus DNS bekannter Konzentrationen auf, lässt sich die Konzentration der Probe über einen Vergleich der Bandenintensität bestimmen. Als interner Standard lassen sich auch kommerziell erwerbliche Größenmarker verwenden, bei welchen neben der Fragmentlänge auch die zur Bande gehörige DNS-Menge definiert ist. Der Vorteil gegenüber der Photometrie besteht darin, dass zur Konzentrationsbestimmung nur relativ kleine DNS-Mengen nötig sind.

4.3.5 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

4.3.5.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen vom Typ II (Restriktionsenzyme) sind Enzyme, die bestimmte Sequenzen doppelsträngiger DNS erkennen und diese spezifisch schneiden. Bei den Erkennungsstellen handelt es sich um vier bis acht palindromisch angeordnete Basenpaare. Durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zwischen zwei benachbarten Basen entstehen DNS-Fragmente mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxyl-Ende. Dies ermöglicht später eine enzymvermittelte Neuverknüpfung kompatibler Enden. Sind die Enden „glatt“, d.h. in beiden Strängen an der gleichen Stelle geschnitten, spricht man von *blunt-end*, produziert das Enzym einen Basen-Überhang, wird dies als *sticky-end* bezeichnet.

Die Aktivität von Enzymen wird in Einheiten (Units, U) angegeben. 1U entspricht der Enzymmenge, die nötig ist, um 1 µg definierter DNS unter optimalen Bedingungen in einer Stunde vollständig zu verdauen. In der Regel wurden für den Restriktionsverdau von Plasmiden 2-5 U Enzym pro µg DNS eingesetzt, genomische DNS wurde mit 10 U Enzym pro µg verdaut. Dabei sollte die Enzymmenge wegen des Glycerolgehalts nicht mehr als 10 % des Ansatzvolumens betragen, da sonst die Restriktions-Effizienz beeinträchtigt werden kann.

Ansatz für Standardverdau

DNS-Lösung	x µL
10 x Enzympuffer	2 µL
100 x BSA (wenn erforderlich)	0,2 µL
Enzym	2-5 U
H ₂ O	ad 20 µL

Der Ansatz wurde zwischen 1 Stunde (analytischer Ansatz) und 3-8 Stunden (präparativer Ansatz) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (zumeist 37° C) verdaut. Genomische DNS wurde in größeren Ansätzen (bis zu 50 µL) und über Nacht verdaut.

4.3.5.2 Dephosphorylierung von DNS

Linearisierte Vektoren mit kompatiblen Enden neigen zur Selbstligation, was die Klonierungsrate von DNS-Fragmenten drastisch verringert. Aus diesem Grund wurden diese Vektoren nach Linearisierung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, Calf Intestinal Phosphatase) behandelt, welche 5'-Phosphat-Gruppen abspalten kann und somit die Selbstligation verhindert. Die für eine

erfolgreiche Ligation nötigen Phosphat-Gruppen liefert jetzt allein das zu klonierende DNS Fragment. Für die Dephosphorylierung wurde dem verdauten Ansatz 1 μL CIP zugesetzt und für mindestens eine Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 65° C 10 min inaktiviert und eine Phenol/ Chloroform Extraktion durchgeführt.

4.3.5.3 Ligation von DNS-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNS-Fragmenten erfolgte mit T4-Ligase. Dabei handelt es sich um ein Enzym aus dem Phagen T4, welches ATP-abhängig die Bildung neuer Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Gruppen katalysiert. Mit T4-Ligase können sowohl glatte, als auch überhängende Enden verknüpft werden.

Ansatz für Standardligation

DNS (Insert)	x μL
DNS (Vektor)	y μL
10 x Ligase-Puffer	2 μL
T4-Ligase	1 μL
H ₂ O	ad 20 μL

Das molare Verhältnis Vektor:Insert betrug 1:3-5. Generell wird bei 16° C für eine bis mehrere Stunden ligiert. Wegen der besseren Effizienz bei der Klonierung großer Fragmente wurden die Ligationen bei 4° C über Nacht durchgeführt.

Molare Masse von DNS

Die molare Masse eines Basenpaares beträgt 660 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$. Daher berechnet sich die molare Masse eines DNS-Fragments folgendermaßen:

$$\text{Molare Masse}_{\text{DNS-Fragment}} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] = \text{Länge}_{\text{DNS}} [\text{bp}] \times 660 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

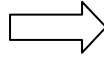
Berechnung der nötigen Mengen an Vektor und Insert

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} = \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] \times \text{Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \Big/ \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Beispiel:

$$\text{Masse}_{\text{Vektor}} = 50 \text{ ng}$$

Länge_{Fragment} = 3000 bp



Masse_{Insert} = 150 ng

Verhältnis $\frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = 3:1$

Länge_{Vektor} = 3000 bp

4.3.6 Reinigung von Nukleinsäuren

4.3.6.1 Alkoholfällung

DNS ist wegen ihrer Säure-Struktur in leicht alkalisch gepufferten Lösungen besser löslich, als im Sauren oder in reinem Wasser. Bei ~ pH 8 liegen die Phosphatgruppen deprotoniert und die DNS als gut lösliches Säure-Anion vor. Bestimmte enzymatische Reaktionen (Restriktionsverdau, Ligation, PCR) erfordern jedoch definierte, für das jeweilige Enzym optimale Reaktionsbedingungen. Daher ist es gelegentlich nötig, die DNS von den enthaltenen Salzen zu reinigen und in Wasser zu lösen. Als schonende Methode eignet sich dazudie Präzipitation der DNS in Ethanol oder Isopropanol. DNS ist schlecht löslich in organischen Lösungsmitteln. Diese Eigenschaft wird bei der Alkoholfällung ausgenutzt. Die Anwesenheit einwertiger Ionen verstärkt diesen Effekt. Bei der Zugabe von Natriumacetat werden die negativ geladenen Phosphat-Gruppen durch die Na⁺-Ionen abgefangen, wodurch die DNS, jetzt ungeladen, schwerer löslich ist. Der zugefügte Alkohol entzieht dem Molekül Wasser, so dass die DNS letztendlich ausfällt während die störenden Salze im Überstand gelöst bleiben. Nach Waschen mit Ethanol 70 %, Zentrifugation und Trocknung bei RT kann das DNS-Pellet in H₂O aufgenommen und für anschließende Reaktionen verwendet werden.

Vorgehensweise

Ethanol-fällung

- Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,5 zur DNS Lösung, mischen
- Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol_{absolut} (entspricht einer Endkonzentration von ca. 70 % (v/v))
- 20 min bei -80° C inkubieren
- 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand vorsichtig abgießen
- Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol 70 %

- 10 min bei 13000 rpm Zentrifugieren, Überstand vorsichtig abpipettieren
- Pellet ca. 10 min bei RT trocknen lassen und in geeignetem Volumen H₂O aufnehmen.

Isopropanolfällung

- Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol, mischen
- 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand abgießen
- Zugabe von 0,7 Volumen Ethanol 70 %
- 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abpipettieren
- Pellet ca. 10 min bei RT trocknen lassen und in geeignetem Volumen H₂O aufnehmen

4.3.6.2 Phenol-Chloroform Extraktion

Eine weitere Form DNS von unerwünschten Begleitstoffen wie Proteine zu reinigen, ist die Extraktion der wässrigen Phase mit Phenol und Chloroform. Beide Substanzen sind nicht mit H₂O mischbar. Bei der Ausschüttelung denaturieren die Verunreinigungen und sammeln sich in der organischen Phase bzw. bilden eine Interphase an der Grenzschicht. Die beiden Phasen können jetzt separiert und die DNS aus der wässrigen Phase über eine Alkoholfällung präzipitiert werden.

Vorgehensweise

- Zugabe von 1 Volumen Phenol zur wässrigen DNS-Lösung, mischen (Vortex)
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- Wässrige (obere) Phase vorsichtig abpipettieren und in neues 1,5 mL Eppendorf überführen
- Zugabe von 1 Volumen Chloroform, mischen
- 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- Wässrige (obere) Phase vorsichtig abpipettieren und in neues 1,5 mL Eppendorf überführen
- Alkoholfällung s.o.

4.3.7 Transformation von Bakterien

4.3.7.1 Standard-Transformation

Als Transformation, besser Transfektion, bezeichnet man das Einschleusen von Fremd-DNS in eine Wirtszelle. Bakterienzellen werden mit Plasmiden transfiziert, die dort neben dem Bakteriengenom vermehrt werden. Hierfür ist es nötig, die Zellen für die DNS leichter durchgängig zu machen. Dies geschieht durch chemische Vorbehandlung der zu transformierenden Bakterien und anschließenden Hitzeschock. Für die Klonierungsarbeiten wurden chemisch vorbehandelte (*chemically competent*) kommerzielle *E. coli* Stämme (siehe 3.4) verwendet. Die Transformationseffizienz ist hierbei u.a. von der Plasmidgröße abhängig. Große Plasmide lassen sich generell schwieriger transformieren, als kleine. Auch die Transformation von Ligationsansätzen ist weniger effizient, als diejenige von bereits zirkulär vorliegender DNS. Das folgende Transformationsprotokoll orientiert sich an der Arbeitsvorschrift für chemisch kompetente Zellen der Firma Stratagene:

- Zellen auf Eis auftauen
- 1,2 μL β -Mercaptoethanol zu 60 μL Zellsuspension in vorgekühltes 12 mL Falcon-Gefäß geben
- 10 min auf Eis inkubieren, alle 2 min vorsichtig schütteln
- Ligationsansatz zugeben, vorsichtig durch Antippen mit dem Finger mischen
- 30 min auf Eis inkubieren
- Ansatz genau 30 s bei 42° C im Wasserbad ohne zu schütteln inkubieren (Hitzeschock)
- 2 min auf Eis
- Zugabe von 900 μL auf 42° C erwärmtes NZY-Medium
- 1 h bei 37° C und 225 rpm im Schüttler inkubieren
- 5 min bei 4000 rpm zentrifugieren, Überstand größtenteils abgießen
- Bakterienpellet in verbliebenem Medium (ca. 200 μL) resuspendieren
- Suspension mit Drigalskispatel auf antibiotikumhaltiger Agarplatte ausplattieren
- Über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubieren

Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen) kloniert. Der im Kit enthaltene Vektor pCR2.1 besitzt 3'-Thymidin-Überhänge und liegt bereits in linearisierter Form vor. Taq-amplifizierte Produkte können aufgrund ihres Adenosin-Überhanges direkt in den offenen Vektor ligiert werden. Für die Ligationsreaktion ist keine zusätzliche Ligase erforderlich, da der Vektor über die Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus aktiviert ist. Das Enzym erkennt und schneidet spezifisch die Sequenz 5'-(C/T)CCTT-3' und bindet kovalent an eine Phosphatgruppe des endständigen 3'-Thymidins. Dadurch wird die Selbstligation des Vektors verhindert. Bei Anwesenheit eines kompatiblen DNS Fragments wird dieses innerhalb 5 min bei RT in den Vektor ligiert und die Topoisomerase I diffundiert vom Molekül ab.

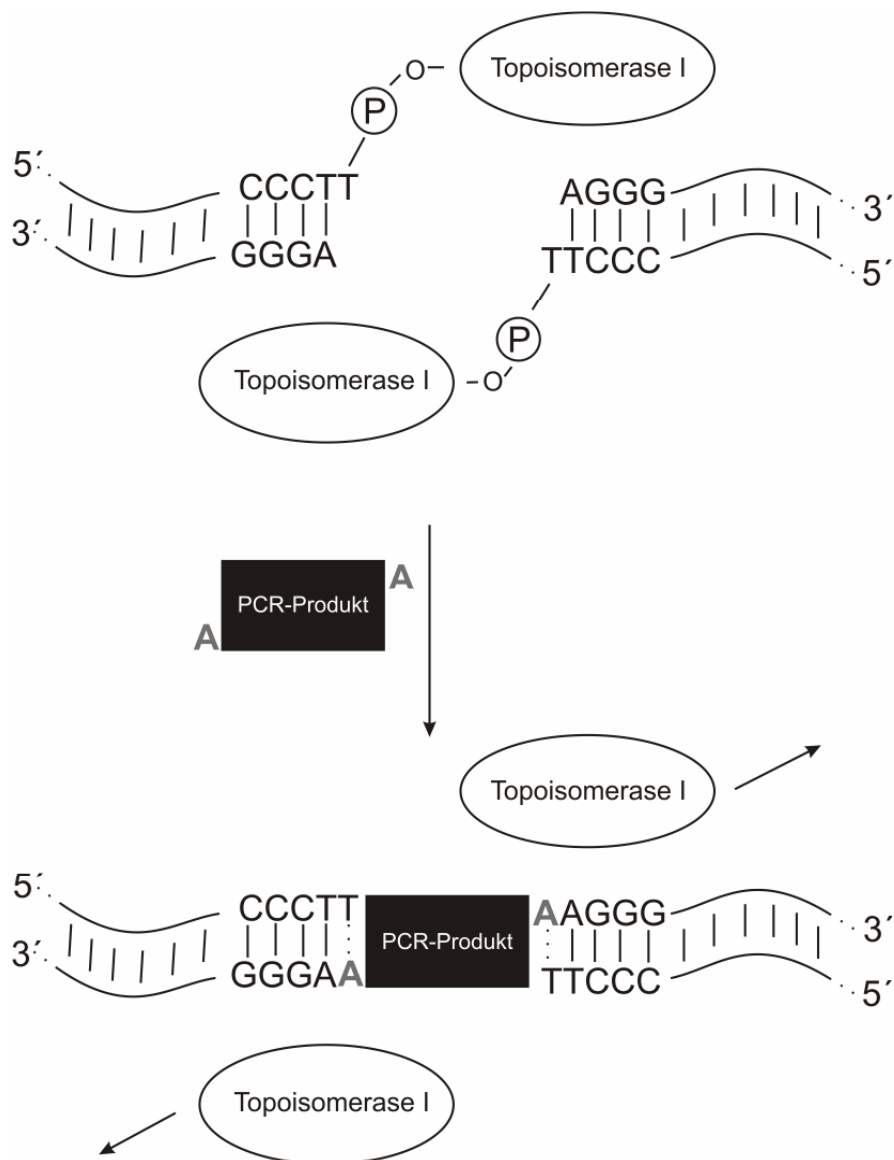


Abbildung 4-1 TOPO-Reaktion

Vorgehensweise

Topo Cloning Reaktion

Ansatz für TOPO Cloning

Frisches PCR-Produkt oder Eluat aus Gelextraktion	0,25-2 µL
Salzlösung (Kit)	0,5 µL
TOPO Vektor (Kit)	0,5 µL
H ₂ O	ad 3 µL

- Ansatz vorsichtig mischen
- 20 min bei RT inkubieren
- Bis zur Transformation auf Eis Lagern oder -20° C über Nacht

Transformation

- Pro Transformation ein 1,5 mL Röhrchen mit TOP 10 One Shot chemisch kompetente Zellen (Kit) auf Eis auftauen
- 2 µL der TOPO Cloning Reaktion hinzugeben, vorsichtig durch Antippen mit dem Finger mischen
- 30 min auf Eis inkubieren
- Ansatz genau 30 s bei 42° C im Wasserbad ohne zu schütteln inkubieren (Hitzeschock)
- 2 min auf Eis stellen
- 250 µL auf RT erwärmtes SOC-Medium (Kit) dazugeben
- 1 h bei 37° C und 225 rpm im Schüttler inkubieren, Gefäße hierzu horizontal befestigen (Klebeband)
- 100- 200 µL mit Drigalskispatel auf Kanamycinhaltiger Agarplatte ausplattieren
- Über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubieren

4.3.8 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine geeignete Methode, um DNS-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und zu identifizieren (Vogelstein & Gillespie 1979). Abhängig von Größe und Ladung wandern die Moleküle mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die als Molekularsieb wirkende Agarose-Matrix. Der notwendige Elektrophorese-Puffer ermöglicht die Ladungswanderung und hält das einen pH-Wert von 8. Bei diesem pH liegt die DNS als negativ (Phosphatgruppen)

geladenes Molekül (Anion) vor wandert im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Dabei durchlaufen kleine Fragmente die Agarose schneller als große. Die Laufstrecke ist hierbei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Allerdings ist diese Beziehung nur für Fragmente mit einer Länge bis zu etwa 20 kb gültig. Größere Fragmente müssen sich stark verformen um durch das Gitter zu kommen und richten sich nach einer gewissen Zeit längs des elektrischen Feldes aus. Jetzt durchwandern sie die Porenstruktur der Agarose mehr oder weniger ungehindert auf gleicher Höhe, so dass eine Auftrennung großer Fragmente nicht mehr möglich ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt außerdem von der Konzentration des Agarosegels ab. Üblich sind Konzentrationen von 0,5-2%, wobei große Fragmente besser in niedrigprozentigen, kleine Fragmente besser in hochprozentigen Gelen aufzutrennen sind. Der Fortschritt der Elektrophorese lässt sich durch den Zusatz von Farbstoffen zur Probelösung optisch verfolgen. Durch Ethidiumbromid können die gelelektrophoretisch aufgetrennten Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid interkaliert in die DNS-Helix und verändert sein Anregungsspektrum dahingehend, dass die Fluoreszenzeigenschaften dieser Substanz verstärkt werden. Die Anregungswellenlängen liegen bei 302 nm und 366 nm. Unter UV-Licht erscheinen die DNS-Fragmente auf dem Gel rötlich, während der übrige Bereich dunkel bleibt. Das Bandenmuster wird anschließend fotografisch dokumentiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wird parallel zu den Proben in einer Gelspur ein Größenmarker aufgetragen, der DNS-Bruchstücke definierter Länge enthält. Durch Vergleich der Banden kann die DNS-Größe bestimmt werden. Als Größenmarker wurde 2-Log DNA ladder (NEB) mit einem Fragmentbereich von 0,1- 10 kb verwendet.

Verwendete Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
10x TBE	0,9 M Tris-HCl 0,9 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8
6x Auftragspuffer	18% Ficoll 0,12 mM EDTA pH 8 6x TBE 0,10% Bromphenolblau 0,10% Xylencyanol
Ethidiumbromidlösung	1 % (w/v) Ethidiumbromid
0,5 M EDTA pH 8	0,5 M EDTA

Vorgehensweise

- 0,5-2 % (w/v) Agarose in 1x TBE aufkochen (Mikrowelle)
- Unter Rühren auf ca. 50° C („handwarm“) abkühlen lassen
- Zugabe von Ethidiumbromidlösung (finale Konzentration im Gel 1 µg/ mL)
- Gel auf Gelschlitten mit entsprechenden Kämmen ausgießen und erstarren lassen
- Gel samt Schlitten in geeignete Kammer geben und mit 1 x TBE überschichten
- DNS-Proben 5:1 mit 6x Auftragspuffer mischen und , je nach Taschengröße, zwischen 6 und 50 µL in die Taschen pipettieren
- Abhängig von Gelgröße und gewünschter Trenn-Effizienz, eine Spannung zwischen 30 und 140 V anlegen
- Verlauf der Gelelektrophorese optisch verfolgen (im 1 % Gel wandert Xylencyanol bei ca. 3 kb, Bromphenolblau bei ca. 300 bp)
- Wenn gewünschte Trennung erreicht, Beenden der Elektrophorese
- Gel unter UV-Licht (312 nm, BioDocAnalyse) betrachten und dokumentieren

4.3.8.1 Präparatives Agarosegel

Zur Aufreinigung von DNS für präparative Zwecke wurde eine Gelelektrophorese (s.o.) durchgeführt, die interessierende Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und nach Vorschrift des MinElute Gel-Extraction Kits (Qiagen) aufgearbeitet. Hierbei wird die DNS samt Gel gelöst, ausgefällt und an die Silica-Membran einer Säule gebunden und durch mehrere Waschschriffe von störendem Begleitmaterial (Agarose, Enzyme, Salze, PCR-Primer) gereinigt. Anschließend kann die DNS mit Elutions-Puffer wieder von der Säule eluiert werden.

Vorgehensweise

- Bande unter UV-Licht mit Skalpell aus Gel ausschneiden und in 2 mL Eppendorf überführen
- Pro 100 mg Gel werden 300 µL QG –Puffer (Kit) hinzugefügt
- Bei 50° C solange im Thermomixer (500 rpm) schütteln, bis das Gel vollständig gelöst ist
- Zugabe von einem Gelvolumen Isopropanol, mischen
- In 700 µL Aliquots auf die Säule geben und 30 s bei 13000 rpm zentrifugieren
- Durchfluss jeweils verwerfen
- 500 µL QG-Puffer auf die Säule geben

- 30 s bei 13000 rpm zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- Zugabe von 700 μ L ethanolischem PE-Puffer (Kit)
- 5 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen und nochmals 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Säule auf 1,5 mL Eppendorf transferieren
- 30 μ L EB-Puffer (Kit) oder H₂O auf die Säule geben
- 1 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Lagerung bei -20° C

4.3.8.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Wie bereits erwähnt ist die gelelektrophoretische Auftrennung von großen DNS-Bruchstücken (>20kb) schwierig, da diese die Gelmatrix aufgrund ihrer Längsausrichtung alle auf ungefähr gleicher Höhe durchlaufen. Die von (Schwartz & Cantor 1984) beschriebene Pulsfeldgelelektrophorese PFGE bietet die Möglichkeit, selbst Fragmente von bis zu 2000 kb noch in ausreichender Schärfe aufzulösen. Durch ständigen Wechsel des elektrischen Feldes müssen sich die DNS-Moleküle immer wieder neu in der Gelstruktur ausrichten. Die einfachste Art der PFGE ist die *field inversion gelelectrophoresis FIGE* (Carle et al. 1986). Dabei wird der Wechselstrom so eingestellt, dass sich die Laufrichtung immer um 180° ändert, aber letztendlich eine Wanderung Richtung Anode resultiert. Über die lange Laufzeit hinweg addieren sich diese Wechsel der Wanderungsrichtung, so dass nun auch eine Auftrennung von großen Fragmenten nach ihrer Größe möglich wird.

Feldinversionsgelelektrophoresen wurden mit dem FIGE Mapper System (Bio-Rad) durchgeführt. Dieses besteht aus programmierbarer Spannungsquelle, Elektrophoresekammer und Vakuum-Pumpe, welche eine kontinuierliche Umwälzung des Puffers ermöglicht. Die ständige Rezirkulation und Durchführung bei 4° C verhindert, dass sich der Puffer während der langen Laufzeit so stark erhitzt, dass es zum Schmelzen des Gels kommt.

Vorgehensweise

- 0,7 % (w/v) Gel samt Schlitten in Kammer geben und mit 0,5 x TBE überschichten
- Proben 5:1 mit 6x Auuftragspuffer mischen und in Taschen pipettieren

- 10-15 min bei 120 V normale Elektrophorese bei DNS 1-2 cm ins Gel eingelaufen ist (DNS könnte sonst durch den Wechselstrom aus dem Gel laufen)
- Wechselstrom anlegen (Voreingestelltes Programm 1; Vorwärtsspannung 190 V, Rückwärtsspannung 120 V) und Laufzeit (ca. 12-20 h) einstellen

4.3.9 Sequenzierung von DNS

Die Bestimmung der Nukleotidfolge innerhalb eines DNS-Stranges (DNS-Sequenz) erfolgte nach der von (Sanger et al. 1992) erstmals beschriebenen Kettenabbruch-Methode. Dabei handelt es sich um eine enzymatisch katalysierte Polymerisation von Nukleotiden. Die Polymerase produziert anhand der zu bestimmenden DNS-Vorlage (Template), Desoxynukleotiden (dNTPs) und eines geeigneten Start-Oligomers (Primer) neue DNS Stränge. Die Verknüpfung der einzelnen Nukleotide erfolgt dabei immer vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende, d.h. das neue dNTP wird mit seinem 5'-Phosphatrest an die 3'-Hydroxygruppe des vorangehenden Moleküls angeknüpft. Für die Sequenzierung nach Sanger werden zusätzlich zu den vier 2'-Desoxynukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) noch 2',3'-Didesoxynukletide (ddNTPs) zum Reaktionsansatz zugefügt. Die Polymerase baut nun nach statistischen Regeln gelegentlich auch diese ddNTPs in die wachsende DNS-Kette ein. Durch die fehlende 3'-Hydroxyfunktion kann nun keine weitere Kettenverlängerung mehr stattfinden, es kommt zum Kettenabbruch. Hierbei entsteht ein Gemisch von unterschiedlichen Fragmenten die nun nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Bei der ursprünglichen Methode wurden parallel vier Ansätze gemacht, wobei jedem Ansatz zusätzlich eines der vier ddNTPs in radioaktiv markierter Form zugesetzt wurde. Die vier Reaktionsansätze wurden in einer anschließenden Gelelektrophorese parallel nebeneinander aufgetragen und die DNS-Sequenz kann aufgrund der Bandenverteilung direkt abgelesen werden. Anstelle der radiokativen Markierung werden die ddNTPs heute meist an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt und mittels Kapillarelektrophorese (Jorgenson et al. 1983) aufgetrennt. Dadurch, dass jedes ddNTP an einen anderen Farbstoff gekoppelt wird, kann die Reaktion in einem Ansatz durchgeführt werden. Der Fluoreszenz-Detektor am Ende der Kapillare erkennt die verschiedenen Farbstoffe und liefert eine vierfarbige DNS-Sequenz.

Die DNS-Sequenzierungen wurden von Frau Monika Papke und Herrn Jochen Scholl, Molekulargenetisches Labor der Universitätsaugenklinik Tübingen, durchgeführt.

4.3.10 Amplifizierung von DNS durch Polymerasekettenreaktion

4.3.10.1 Standard Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis & Faloona 1987) ermöglicht eine Amplifikation von DNS-Abschnitten *in vitro*. Dabei nutzt man das Prinzip, dass DNS-Polymerasen Einzelstrang-DNS als Matrize zur Synthese eines Komplementärstranges verwenden und dadurch viele Kopien einer bestimmten DNS-Sequenz entstehen. Als Vorlage dient meist doppelsträngige DNS. Diese wird in einem ersten Schritt hitzedenaturiert. Hierbei trennt sich der Doppelstrang in die beiden komplementären Einzelstränge. In einem weiteren Schritt wird der Ansatz soweit abgekühlt, dass in ihrer Sequenz definierte Starteroligomere (Primer), welche das zu amplifizierende Stück 5' und 3' flankieren, an die getrennten Stränge binden können (Annealing). Jetzt wird auf die optimale Arbeitstemperatur der thermostabilen Polymerase erhitzt, welche nun die gebundenen Primer verlängert und die Komplementärstränge synthetisiert (Elongation). Die Folge aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird zwischen 30 und 40 mal wiederholt, wobei die Menge des gewünschten DNS-Fragments im Ansatz exponentiell ansteigt.

Ansatz für Standard PCR

Reaktionsansatz	Endkonzentration
Matrizen DNS	ca. 10000-100000 Moleküle
1 µL Vorwärts-Primer (20 pmol/ µL)	0,4 pmol
1 µL Rückwärts-Primer (20 pmol/ µL)	0,4 pmol
5 µL 10 x PCR-Puffer	1 x
1 µL dNTPs (10 mM)	0,2 mM
0,2 µL Polymerase	1 U
ad 50 µL H ₂ O	

Die Ansätze wurden in 500 µL Eppendorf PCR-Gefäßen im Eppendorf Mastercycler amplifiziert.

Matrizen DNS

Auch als Template bezeichnet. Diese DNS dient als Vorlage für die Amplifikation. Die optimale Templatemenge wurde durch Parallelversuche mit ansteigender DNS-Menge ermittelt. Gute Ergebnisse wurden bei Templatemengen von 10000-100000 Molekülen (entspricht etwa 0,1-1 pg eines 1000 bp DNS-Fragments) erzielt.

Primer

Oligonukleotide mit einer Länge von jeweils 18 – 30 bp. Der Vorwärtsprimer liegt 5´, der Rückwärtsprimer 3´ der zu amplifizierenden Sequenz. Die Primer wurden so ausgewählt, dass die Schmelztemperaturen bei 50° C- 65° C lagen und der Guanosin+Cytosin Anteil etwa 60 % betrug. Weiterhin wurden die Primer mittels Computer auf Selbstannealing und Ausbildung von Haarnadelstrukturen überprüft. Die optimalen Annealingtemperaturen wurden in einem Vorversuch über eine Gradienten-PCR (s.u.) ermittelt.

10 x PCR-Puffer

Jede Polymerase benötigt eine in Salzkonzentration und pH-Wert optimale Pufferzusammensetzung. Essentiell für die Aktivität ist u.a. die Anwesenheit freier Mg²⁺-Ionen. Für die Reaktionen wurden der vom Enzym-Hersteller beigelegte 10 x konzentrierte Puffer verwendet.

dNTPs

Es wurde ein äquimolares Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP verwendet.


Polymerasen

Erst die Entdeckung des hitzestabilen Bakteriums *Thermus aquaticus* und seiner DNS-Polymerase (Taq-Polymerase), machte eine effiziente Polymerasekettenreaktion überhaupt möglich (Saiki et al. 1988). Die Taq-Polymerase ist ein Enzym mit hoher DNS-Syntheserate. Dem Vorteil der hohen Effizienz steht der Nachteil der großen Fehlerrate (etwa ein falscher Baseneinbau pro 1000 Nukleotiden) gegenüber. Taq-amplifizierte Produkte enthalten zusätzlich an den Enden einen Basenüberhang von einem Adenosin (Clark 1988;Hu 1993).

Als weitere thermostabile DNS-Polymerase wurde die aus *Thermococcus spec.* isolierte Pfx-DNS-Polymerase verwendet. Diese besitzt im Vergleich zur Taq-Polymerase eine geringere DNS-Syntheserate, dafür aber eine 3´5´-Exonukleaseaktivität, welche eine Korrektur falsch eingebauter Nukleotide erlaubt (proofreading).

In der Regel wurden die Amplifikationen mit Taq-Polymerase der Firma Roche durchgeführt. Kleinere Fragmente, bei denen eine hohe Sequenz-Genauigkeit des Amplikons wichtig war (Sonden, Targeting Konstrukt) wurden mit Pfx (Invitrogen) amplifiziert.

Protokoll für Standard Amplifizierung

94 °C	3 min	Initiale Denaturierung	
94 °C	1 min	Denaturierung	 30- 40 Zyklen
50 °C- 65 °C	30 s	Annealing	
72 °C (Taq) bzw. 68 °C (Pfx)	1 min pro 1000bp (Taq) bzw. 2 min pro 1000bp (Pfx)	Elongation	
72 °C (Taq) bzw. 68 °C (Pfx)	3 min	Finale Elongation	

4.3.10.2 PCR-Anwendungen**Gradienten- Polymerasekettenreaktion**

Bestimmte PCR-Maschinen erlauben es, unter jede Reihe ihres Heizblocks eine andere Temperatur anzulegen. Dadurch wird es möglich, in einem Anlauf PCRs bei verschiedenen Annealing-Temperaturen durchzuführen. Dies ermöglicht eine äußerst schnelle und effiziente Optimierung der Reaktionsbedingungen für jeweils ein bestimmtes Primer-Paar. Dabei wurden bis zu 10 Ansätze parallel über einen Temperaturbereich von errechneter Annealing-Temperatur $\pm 10^\circ \text{C}$ amplifiziert, wobei jedem Ansatz eine definierte Temperatur zuzuordnen war. Die Temperatur, bei welcher die Amplifikation bezüglich Menge und Spezifität am besten war, wurde für die weiteren Experimente als Annealingtemperatur verwendet. Gradienten-PCRs wurden im MastercyclerGradient der Firma Eppendorf durchgeführt.

Reverse-Transkription- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Bei dieser Anwendung wird aus RNS durch reverse Transkription cDNS synthetisiert und diese im nächsten Schritt über PCR amplifiziert. Normalerweise dient die DNS eines Organismus als Matrize für die Synthese der komplementären RNS. Das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase ermöglicht es, den umgekehrten Weg zu gehen und RNS als Matrize für die Synthese eines komplementären einzelnen DNS-Stranges zu verwenden. Diese als „erster Strang“ („first-strand“) bezeichnete cDNS dient nun als Template für die anschließende PCR. Dabei ist es möglich reverse Transkription und PCR in einem Reaktionsansatz durchzuführen.

In dieser Arbeit wurde mRNA aus Maus-Gehirn als Template verwendet, und die Reaktion nach Vorschrift des SuperScript OneStep RT-PCR Systems (Invitrogen) durchgeführt.

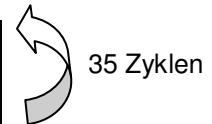
Protokoll für RT-PCR

Reverse Transkription

50 °C	30 min	cDNS-Synthese
94 °C	2 min	Initiale Denaturierung

PCR-Amplifikation

94 °C	30 s	Denaturierung
58 °C	30 s	Annealing
68 °C	1 min pro 1000bp	Elongation



35 Zyklen

72 °C	5min	Finale Elongation
-------	------	-------------------

4.3.11 Analyse von DNS durch Southern-Blot

Die nach ihrem Erfinder Ed Southern (Southern 1992) benannte Methode wird zur Analyse von genomischer DNS eingesetzt. Hierbei wird die genomische DNS nach der Gelelektrophorese auf eine Membran übertragen (Southern-Blot) und das gesuchte DNS-Fragment mit einer radioaktiv markierten DNS-Sonde aufgespürt (Southern-Hybridisierung). Zunächst wird die genomische DNS einem Restriktionsverdau mit einem oder mehreren bestimmten Enzymen unterworfen. Aufgrund ihrer Größe wird die DNS in sehr viele Fragmente zerschnitten, was bei der Auftrennung im Agarosegel als „Schmier“ („smear“) über den gesamten Größenbereich sichtbar wird. Um auf das Vorhandensein eines Fragments bestimmter Länge zu prüfen, wird die DNS im Gel in Einzelstränge denaturiert und über den eigentlichen Blotting-Vorgang auf einer Nitrocellulose oder Nylon-Membran fixiert. Die Membran wird dabei auf das Gel aufgelegt und Pufferlösung durch Gel und Membran gesaugt. Der Puffer nimmt die DNS aus dem Gel mit, so dass diese an der Membran haften bleibt. Das Auftrennungsmuster des Gels überträgt direkt auf die Membran. Die radioaktiv markierte Sonde kann spezifisch mit der immobilisierten DNS auf der Membran hybridisieren und schließlich aufgrund ihrer Strahlung auf einem geeigneten Medium sichtbar gemacht werden (Röntgenfilm, Phosphorimagerplatte).

4.3.11.1 Southern Blot

Verwendete Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Depurinierung	0,2 M HCl
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat
Neutralisierungslösung	3,0 M NaCl 0,5 M Tris
Hybridisierungspuffer (Church-Puffer)	1 % (w/v) BSA 0,5 M Na-Phosphat Puffer pH 7,4 7 % (w/v) SDS 1mM EDTA (pH 8)
Na-Phosphat Puffer pH 7,4	387 mL 1 M Na ₂ HPO ₄ 113 mL 1 M NaH ₂ PO ₄
TE pH 8	10 m M Tris-HCl pH 8 1 mM EDTA pH8
SDS 20 %	20 % (w/v) SDS

Probenvorbereitung

Ansatz für den Verdau von genomischer DNS	Pro Vertiefung
DNS	In der Vertiefung
10 x Enzypuffer	4 µL
100 x BSA (wenn erforderlich)	0,4 µL
Enzym	40-50U
H ₂ O	ad 40 µL

Sollten mehrere Vertiefungen pro Platte verdaut werden wurde ein Ansatz für x+ 10% Vertiefungen im Reagenzien-Trog hergestellt und mit der 8-Kanal-Pipette jeweils 40 µL in jede Vertiefung pipettiert. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen, in Frischhaltefolie eingepackt und bei 37° C über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 8 µL 6 x Dye pro Loch wurde der Ansatz direkt auf ein Gel aufgebracht oder bis zum Gelauftrag eingefroren.

Agarosegel

Die Gele hatten bei einer Grundfläche von $477,75 \text{ cm}^2$ ($l= 24,5 \text{ cm}$, $b= 19,5 \text{ cm}$) eine Dicke von $0,85 \text{ cm}$, die Agarosekonzentration betrug $0,7 \%$. Auf ein Gel wurden bis zu 50 Proben in zwei Reihen aufgetragen, wobei jeweils $48 \mu\text{L}$ Ansatz in eine Tasche pipettiert wurden. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 125 V durchgeführt und nach einer Laufstrecke von $10\text{-}12 \text{ cm}$, abhängig von den nachzuweisenden Fragmentgrößen, beendet. Die Gele wurden unter UV-Licht unter Zuhilfenahme eines Längenstandards (Lineal) dokumentiert, durch Abschneiden der Ecken gekennzeichnet und der DNS-Größenmarker abgetrennt. Dies ist nötig, weil während der Hybridisierung sehr viel markierte Sonde unspezifisch an den Größenmarker bindet. Dadurch entstehen sehr starke Signale, welche andere, schwächere unter Umständen überlagern.

Übertragung der DNS auf die Membran und Immobilisierung

Damit der Transfer der DNS vom Gel auf die Membran möglich ist, muss diese einer Vorbehandlung unterzogen werden. Die folgenden Schritte wurden in einer Fotowanne auf einem Kreisschüttler durchgeführt. Es ist darauf zu achten, dass das Gel ständig von Pufferlösung bedeckt ist (schwimmend), um eine ausreichende Diffusion in das Gel zu gewährleisten.

- 10 min in $0,2 \text{ N HCl}$
 - ⇒ Durch HCl wird die DNS teilweise depurinieren und zerbricht in kleinere Fragmente. Die Depurinierung ist nötig um Fragmente $>5 \text{ kb}$ effizient auf die Membran zu übertragen.
- Mit H_2O waschen (Puffer mit Wasserstrahlpumpe absaugen)
- 45 min in $0,5 \text{ M NaOH} / 1,5 \text{ M NaCl}$
 - ⇒ Denaturierung (auftrennung in Einzelstränge) der DNS
- Mit H_2O waschen
- 30 min in $0,5 \text{ M Tris} / 3 \text{ M NaCl pH } 7,5$
 - ⇒ Neutralisation
- 2 x mit H_2O waschen

Aufbau des Kapillarblots

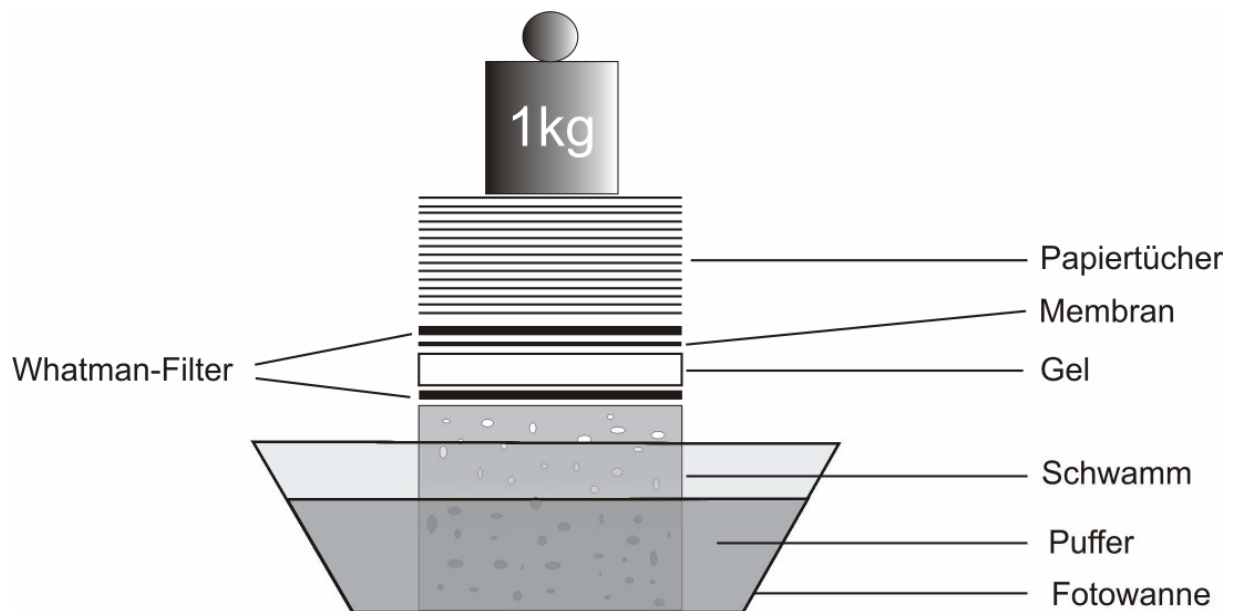


Abbildung 4-2 Southern Blot

Ein mit 10 x SSC- Puffer getränktes Filterpapier wird blasenfrei auf den vollgesogenen Schwamm aufgelegt. Das Gel wird jetzt mit der Oberseite nach unten auf das Filterpapier gelegt und Luftblasen mit dem stumpfen Ende einer sterilen Pipette herausgestrichen. Um das Gel herum wird eine „Maske“ aus Parafilm positioniert, um ein Vorbeisaugen des Transfer-Puffers neben dem Gel zu verhindern. Die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Nylon-Membran (Highbond N+, Amersham) wird ebenfalls in 10 x SSC getränkt und mit einer flachen Pinzette ohne Luftblasen auf das Gel transferiert. Darauf werden ein weiteres Filterpapier, ein Stapel Papiertücher und ein Gewicht von ca. 1 kg geschichtet. Über Kapillarkräfte wird der Hochsalzpuffer kontinuierlich aus der Wanne in die Papiertücher gesaugt wobei die DNS aus dem Gel mitwandert und an der Membran haften bleibt. Nach etwa 12 – 16 Stunden ist der Transfer abgeschlossen. Zur späteren Orientierung werden die Geltaschen auf der Membran mit Kugelschreiber markiert. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (120mJ) bindet die DNS kovalent an die Membran. Zusätzlich Fixierung erfolgt durch Backen im Trockenschrank, 2 h bei 80° C.

4.3.11.2 Southern Hybridisierung

Herstellung von ^{32}P -markierten Sonden

Die radioaktive Markierung der DNS-Sonden beruht auf dem Prinzip der DNS-Verlängerung von zufällig an den Einzelstrang gebundenen Oligomer-Primern (hier: Octanukleotide) mit Hilfe des Klenow-Fragments (Feinberg & Vogelstein 1983; Feinberg & Vogelstein 1984). Das Klenow-Fragment ist die größere Untereinheit der DNS-Polymerase I aus *E.coli* und besitzt eine 5'-3'-Polymeraseaktivität (Auffüllen von Komplementärsträngen) und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Abbau von überstehenden 3'-Enden). Die in ihrer Sequenz beliebigen Octanukleotide binden zufällig an den DNS-Einzelstrang der Sonde und die Polymerase baut die beigefügten dNTPs, wobei dCTP ausschließlich als [α - ^{32}P]-dCTP zugegeben wird, in den Komplementärstrang ein. Die Reaktionen wurden mit dem NEBlot-Kit (New England Biolabs) durchgeführt. Beim Klenow-Fragment des Kits handelt es sich um eine 3'-5'-exo⁻ Variante.

Vorgehensweise

Markierung der Sonde

- 25-100 ng DNS-Sonde mit H₂O auf 33 μL auffüllen
- 5 min bei 95 ° C im Heizblock erhitzen (Denaturierung)
- 2 min auf Eis stellen, anzentrifugieren
- Mischen des Reaktionsansatzes:

Reaktionsansatz

DNS-Sonde	33 μL
10 x Markierungs-Puffer (inkl. Primer)	5 μL
dNTP- Mix (je 2 μL dATP, dGTP, dTTP)	6 μL
α - ^{32}P -dCTP (6000 Ci/ mmol)	5 μL
Klenow	1 μL
	<hr/>
	50 μL

- 1h bei 37 ° C inkubieren

Aufreinigung der Sonde

Freies, nichtgebundenes dCTP wird durch Gelchromatographie über NICK-Säulen (GE Helthcare) abgetrennt.

- Aufbewahrungspuffer von der Säule entfernen, mit TE pH 8 waschen
- Säule mit TE pH auffüllen, durchlaufen lassen
- Pro Säule 3 Eppendorf-Gefäße 1,5 mL vorbereiten, beschriften
- 30 µL TE zum Ansatz geben und diesen auf die Säule transferieren
- Mit unterschiedlichen Volumina TE pH 8 eluieren und Fraktionen sammeln:
 - 320 µL → Fraktion 1
 - 500 µL → Fraktion 2
 - 800 µL → Fraktion 3
- Je 1 µL jeder Fraktion in Szintillations-Gefäß geben und Cherenkov-Messung am Szintillationsmessgerät durchführen
- Die Sonde befindet sich in Fraktion 2
- Einzusetzende Probenmenge: Ca. $2,5 \times 10^6$ cpm/ mL Hybridisierungspuffer

Prähybridisierung

Um unspezifisches Binden der radioaktiv markierten Sonde an die Membran zu verhindern, muss diese vorhybridisiert werden. Dabei werden nicht mit DNS besetzte Stellen auf der Membran durch Lachsspermien-DNS blockiert.

- Membran in Hybridisierungsröhre geben
- Zugabe von Hybridisierungspuffer (10 mL / 100 cm² Membran)
- Lachsspermien-DNS (Sonicated ssDNA, Stratagene) 5 min bei 95° C im Thermomixer inkubieren und 100 µL in die Röhre pipettieren
- 1 h bei 60 ° C im Drehofen hybridisieren

Hybridisierung

- Nötige Sondenmenge 5 min bei 95° C im Thermomixer inkubieren (Denaturierung)
- 2 min auf Eis
- Prähybridisierungspuffer verwerfen
- Neuen Hybridisierungspuffer einfüllen, Sonde dazupipettieren
- Über Nacht im Drehofen bei 60 ° C hybridisieren

Entfernen nicht-spezifisch gebundener Sonde

Unspezifisch an der Membran anhaftende Sonde wird durch mehrfaches Waschen in Puffern mit abnehmender Salzkonzentration entfernt. Eine abnehmende Salzkonzentration verringert schrittweise die Bindung der Sonde an die Komplementär-DNS. Negativ geladene Phosphatgruppen werden durch die Salze abgeschirmt, was die Abstoßung verringert und somit die Bindung verstärkt. Durch stufenweise Verringerung der Salzkonzentration wird die Bindung der Sonde an die Komplementär-DNS immer schwächer. Falsch hybridisierte Sonde wird dadurch leichter zu entfernen während die an der richtigen Stelle gebundene Probe haften bleibt.

Waschlösung	Zusammensetzung	
2 x SSC, 0,1 % SDS	20 x SSC	100 mL
	20 % SDS	5 mL
	H ₂ O	ad 1 L
0,4 x SSC, 0,1 % SDS	20 x SSC	100 mL
	20 % SDS	5 mL
	H ₂ O	ad 1 L

- 2 x 10 min mit 2 x SSC, 0,1 % SDS bei 60° C im Drehofen waschen
- 2 x 10 min mit 0,4 x SSC, 0,1 % SDS bei 60° C im Drehofen waschen
- Die Röhren werden dazu halb mit Puffer befüllt
- Strahlung mit Hand-Sonde überprüfen
- Bei mehr als 30– 40 IPS noch 1- 3 x 10 min mit 0,4 x SSC, 0,1 % SDS bei 60° C waschen
- Membranen trocknen lassen, in Frischhaltefolie einpacken und auf Phosphorimagerplatte auflegen

Die Blots wurden 1 - 14 Tage exponiert und anschließend ausgewertet.

Autoradiographie - Storage Phosphor

Die Auswertung der Blots über Phosphorimager-Platten hat gegenüber klassischen Röntgenfolien den Vorteil der bis zu 100-fach höheren Sensitivität. Zusätzlich können die Signale durch Weißlicht von der Imager Platte gelöscht werden, so dass eine Mehrfachverwendung möglich ist. Die Imager Platte ist ein mit BaFBr:Eu²⁺-Kristallen

beschichteter Schirm. Durch ionisierende Strahlung wie UV-, Röntgen, β - oder γ -Strahlung wird ein Elektron des Eu^{2+} angeregt wodurch dieses zu Eu^{3+} oxidiert wird und ein BaFBr^- -Komplex entsteht. Der BaFBr^- -Komplex ist in seinem angeregten Zustand stabil und „speichert“ (storage) somit die durch Membranexposition übertragene Information. Bei Laser-Anregung fallen die Elektronen wieder auf Ausgangsniveau zurück, Eu^{3+} wird zu angeregtem Eu^{2+*} reduziert und dieses geht durch Abgabe eines Photons wieder in den Grundzustand Eu^{2+} über. Das abgestrahlte Licht kann nun vermessen und der Blot am Bildschirm sichtbar gemacht werden. (Johnston et al. 1990)

4.3.12 Methoden zur Erzeugung gentechnisch veränderter Mäuse durch *Gene-Targeting* in embryonalen Stammzellen

Voraussetzung für die Entwicklung gentechnisch veränderter Mäuse war die Entdeckung pluripotenter embryonaler Stammzellen. Diese wurden von Evans und Kaufman (Evans & Kaufman 1981) und Martin (Martin 1981) erstmals erfolgreich aus Mausembryonen isoliert und kultiviert. Die Stammzelltechnologie eröffnete somit die Möglichkeit, gezielte Veränderungen so in das Genom einzuführen, dass sie im ganzen Organismus vorhanden sind und aufgrund der Keimbahngängigkeit (*Germline transmission*) auch von einer Generation zur nächsten weitergegeben werden. Dies schließlich gelang Koller (Koller et al. 1989), als erstmalig über homologe Rekombination in ES-Zellen eine gezielte Veränderung in das Genom der Maus eingeführt werden konnte.

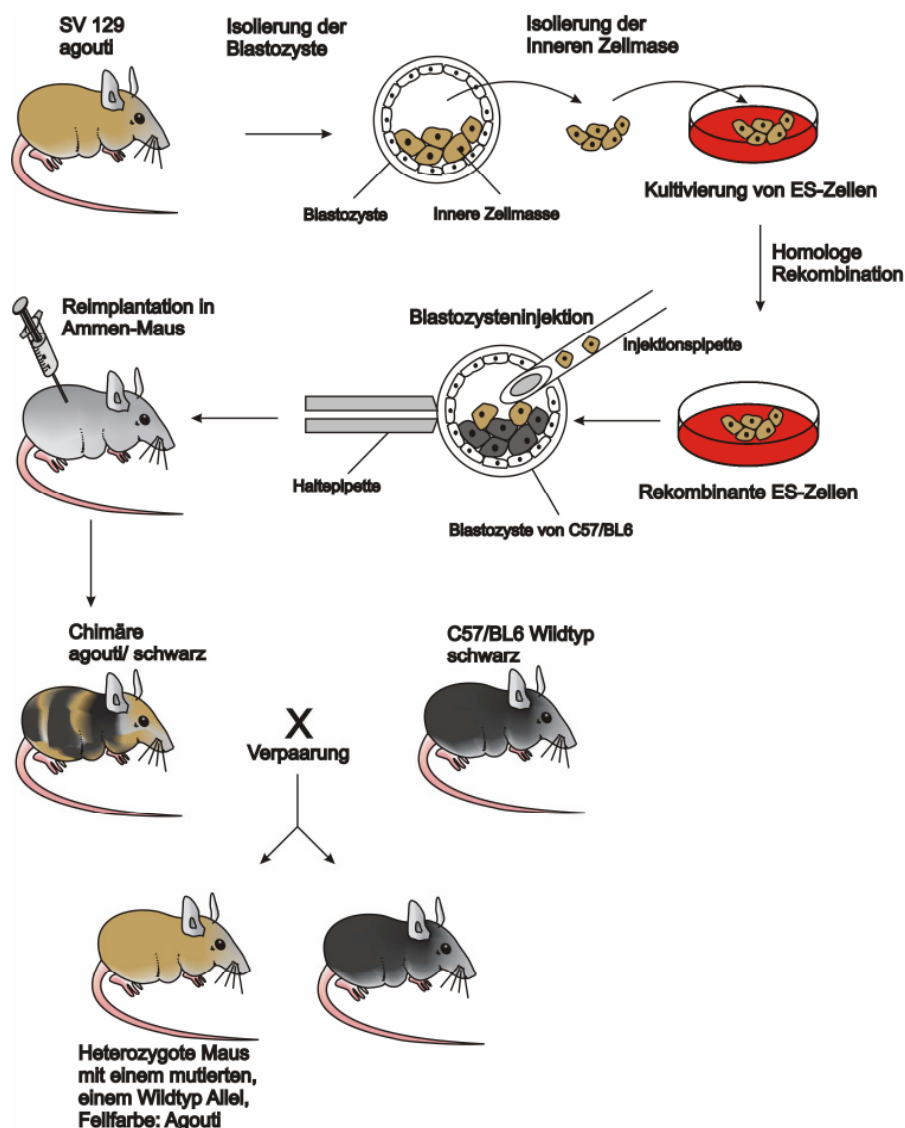


Abbildung 4-3 Schema zur Erzeugung gentechnisch veränderter Mäuse

4.3.13 Kultivierung embryonaler Stammzellen

Generell versteht man unter Stammzellen Körperzellen, die noch nicht ausdifferenziert, das heißt auf ihre spätere Funktion spezialisiert sind. Aus Stammzellen können sämtliche Zellarten, Gewebe und Organe entstehen. Aufgrund ihrer Herkunft werden Stammzellen, die aus dem Embryo isoliert werden, als embryonale Stammzellen bezeichnet (im Unterschied zu adulten oder hämatopoetischen Stammzellen). Eine weitere Einteilung erfolgt nach den Differenzierungseigenschaften (totipotent, pluripotent, multipotent, unipotent). In der Regel werden der Maus pluripotente Stammzellen aus der inneren Zellmasse (Embryoblast) des im Blastozystenstadium befindlichen Embryos (dies post coitum 3,5) entnommen. Diese können *in vitro* (Zellkultur) beliebig vermehrt und in Blastozysten reimplantiert werden. Es wurde gezeigt, dass diese Zellen nach Reimplantation zur Entstehung aller Gewebe dieser durch Embryotransfer generierten Maus beitragen können (Beddington & Robertson 1989). Da die Zellen der inneren Zellmasse entnommen wurden, können sie sich nicht zu Geweben differenzieren, die aus der äußeren Zellmasse des Blastozysten (Trophoblast) hervorgehen (Nabelschnur, Plazenta). Daher ist nur noch Pluripotenz, aber keine Totipotenz der Stammzellen mehr vorhanden.

Um die Pluripotenz der Stammzellen *ex vivo* in Zellkultur aufrechtzuerhalten ist es notwendig, durch optimale Kulturbedingungen eine Differenzierung zu verhindern. Dies geschieht durch Aussäen der embryonalen Stammzellen auf einen Rasen s.g. Feederzellen. Hierbei handelt es sich um Fibroblasten, die aus Mäuseembryonen gewonnen und durch ionisierende Strahlung teilungsunfähig gemacht werden. Diese bilden auf dem Boden des Kulturgefäßes eine Ein-Zell-Schicht (Monolayer), und geben neben bestimmten Wachstumsfaktoren und Nährstoffen den Leukämie inhibierenden Faktor (Leukemia Inhibitory Factor, LIF) in das Medium ab. LIF, ein Polypeptid-Zytokin, wurde als der essentielle Faktor erkannt, der ein Ausdifferenzieren der pluripotenten Stammzellen in andere Zelltypen verhindert (Smith et al. 1988; Williams et al. 1988). LIF fungiert als Ligand am LIF-Rezeptorkomplex (LIF bindendes Protein und gp130 [Interleukin-6 Signaltransduktion])(Gearing et al. 1991; Davis et al. 1993). Wird dem Medium neben den notwendigen Nährstoffen auch LIF zugesetzt, ist eine Kultur auch ohne Feederzellschicht, z.B. auf Agar, möglich. Desweiteren ist sorgfältig darauf zu achten, dass die einzelnen Zellkolonien sich gegenseitig nicht berühren, da die Zellen auch dabei differenzieren.

Generell wurde die Kultur in DMEM (*Dulbeccos's modified eagle medium*) durchgeführt. Das Medium enthält neben Aminosäuren, Mineralsalzen und Vitaminen zusätzlich Glucose und den pH-Indikator Phenolrot. Die Aufrechterhaltung eines konstanten pH ist für optimales Zellwachstum unumgänglich. Die Einstellung erfolgt

über eine Hydrogencarbonatpufferung, die in Anwesenheit von 5 % CO₂ einen pH von 7,2 – 7,4 gewährleistet. Dem Medium wird weiterhin Fötale Kälberserum (FCS) zugesetzt. Die neben vielen anderen Substanzen enthaltenen Wachstumsfaktoren fördern zusätzlich das Zellwachstum. Verschiedene Chargen an FCS unterliegen natürlichen Schwankungen in ihrer Zusammensetzung. Daher ist es nötig, bei guter Kompatibilität mit den ES-Zellen, möglichst viel dieser Charge zu erwerben. Der Zusatz von β -Mercaptoethanol zum Medium verhindert eine Oxidation und damit Inaktivierung des LIF.

4.3.13.1 Medien und Substanzen

Die Herstellung aller für die Zellkultur erforderlichen Medien und Lösungen erfolgte unter aseptischen Bedingungen.

Substanz	Bestellnummer	Bezugsquelle
DMEM (Dulbeccos modified eagle medium)	FG 0445	Biochrom
FCS (Fötale Kälberserum) für ES-Zellen	Charge: 40F4674K	Biochrom
Ganciclovir-Natrium (Cymeven [®])		Roche
Geneticinlösung (G418)	345810	Calbiochem
LIF (ESGRO [®])	ESG1106	Chemicon
PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ mit EDTA	L1825	Biochrom
10 x Trypsin/ EDTA	L 2153	Biochrom
β -Mercaptoethanol	4227.3	Roth

4.3.13.2 Zusammensetzung der Medien

Medium	Zusammensetzung	mg/ L
DMEM (Nach Dulbecco, Freeman 1959)	Calciumchlorid	200
	Eisen(III)-nitrat · 9 H ₂ O	0,1
	Kaliumchlorid	400
	Magnesiumsulfat	97,7
	Natriumbicarbonat	3700
	Natriumchlorid	6400
	Natriumdihydrogensulfat · H ₂ O	125
	L-Arginin · HCl	84
	L-Cystein	48
	Glycin	30
	L-Histidin · HCl · H ₂ O	42
	Isoleucin	105
	L-Leucin	105
	L-Lysin · HCl	146
L-Methionin	30	

	L-Phenylalanin	66
	L-Serin	42
	L-Threonin	95
	L-Tryptophan	16
	L-Tyrosin	72
	L-Valin	94
	D-Calcium-Pantothenat	4
	Cholinchlorid	4
	Folsäure	4
	myo-Inositol	7,2
	Nicotinamid	4
	Pyridoxin · HCl	4
	Riboflavin	0,4
	Thiamin · HCl	4
	D-Glucose	1000
	Phenolrot	15
	Natriumpyruvat	110
	L-Glutamin	584
ES-Medium (Kultur der ES-Zellen)	DMEM	398 mL
	FCS ¹⁾	100 mL
	LIF (100 U/ mL)	1 mL
	β-Mercaptoethanol (3,5μL/ mL PBS)	1 mL
EF-Medium (Kultur der Feederzellen)	DMEM	450 mL
	FCS ¹⁾	50 mL
G 418-Selektionsmedium	ES-Medium	496 mL
	Geneticinlösung (50 mg/ mL)	4 mL
	Endkonzentration 0,4 mg/ mL Geneticin	
Ganciclovir- Selektionsmedium	ES-Medium	500 mL
	Ganciclovirlösung (0,2 M) ²⁾	100 μL
	Endkonzentration 2 μmol Ganciclovir	
Medium zur Kryokonservierung	Feederzellen	EF-Medium/ 20 % (v/v) DMSO
	ES-Zellen	ES-Medium/ 20 % (v/v) DMSO
1 x Trypsin/ EDTA	10 x Trypsin/ EDTA	5 mL
	H ₂ O	45 mL
	In 5 mL Aliquots bei -20° C lagern	

¹⁾ Das bei -80° C gelagerte FCS wurde stufenweise (24 h bei -20° C) aufgetaut, für 30 min bei 56° C hitzeinaktiviert (evtl. vorhandene Viren) und in 50 mL Aliquots bei -20° C gelagert.

²⁾ Eine Ampulle Ganciclovir-Na-Salz = 543 mg (Cymeven, Roche) in 10,1 mL H₂O lösen c= 0,2 M, Lagerung bei -20° C.

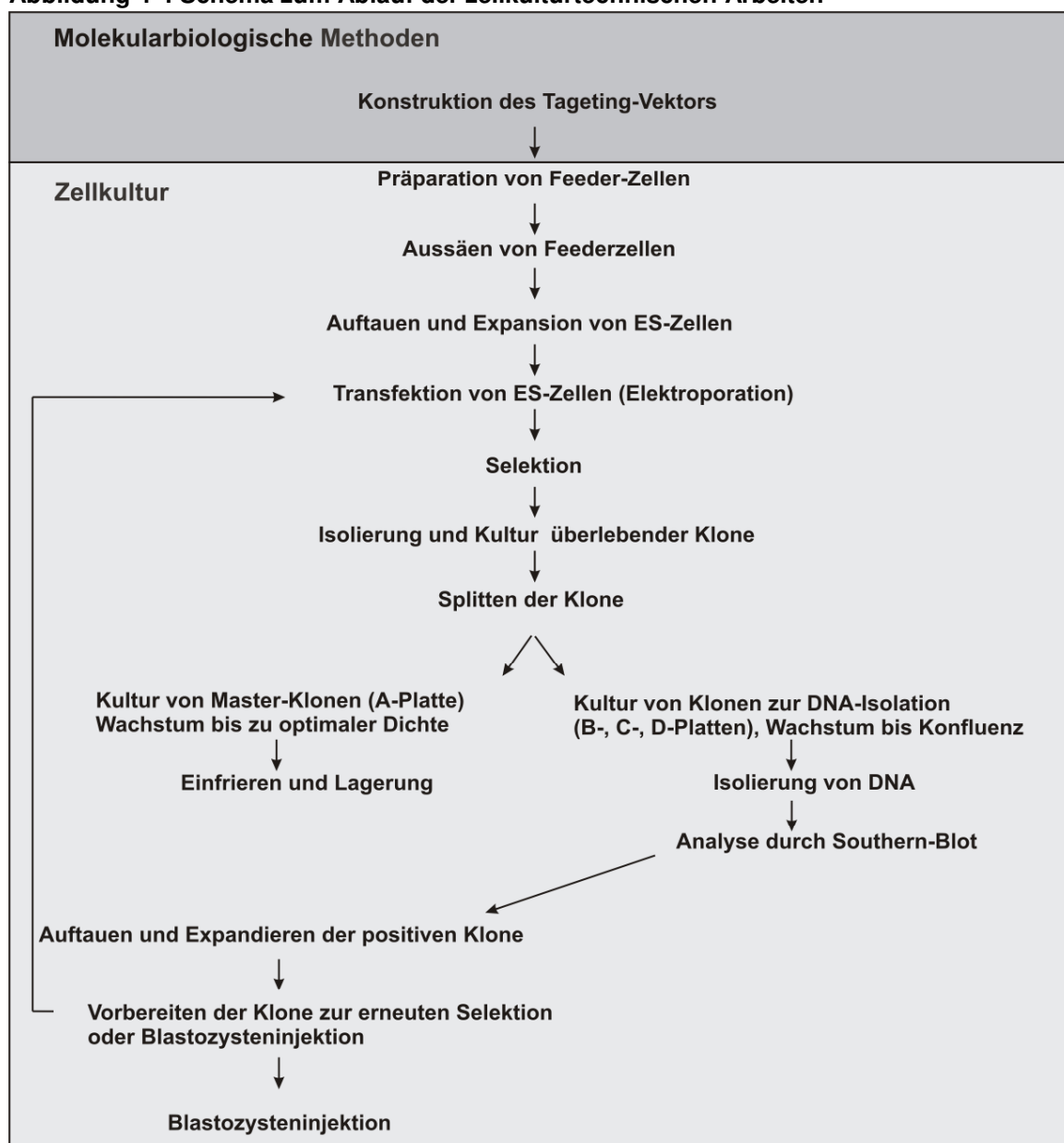
Gebrauchsverdünnung: 50 μL [0,2M] + 950 μL H₂O; zu 100 μL aliquotieren [c= 10 mM];

Lagerung bei -20° C

Gefäße für die Zellkultur

Gefäß	Fläche	Volumen
Flasche	175 cm ²	20 mL
Flasche	75 cm ²	15 mL
Flasche	25 cm ²	5 mL
Petrischale	55 cm ²	10 mL
6 Loch Platte	6 x 9,5 cm ² = 57 cm ²	3 mL/ Loch
24 Loch Platte	24 x 1,9 cm ² = 45,6 cm ²	1 mL/ Loch
96 Loch Platte	96 x 0,32 cm ² = 30,72 cm ²	200 µL/ Loch

Abbildung 4-4 Schema zum Ablauf der zellkulturtechnischen Arbeiten



4.3.14 Feederzellen

4.3.14.1 Gewinnung von Feederzellen

Die als Feederzellen bezeichneten Fibroblasten wurden am Tag 14,5 *post coitum* aus Mäuseembryonen gewonnen. Da die Selektion der rekombianten ES-Zellen in genitocininhaltigem (G 418) Medium durchgeführt wird, ist es nötig, dass auch die Feederzellen die entsprechende Resistenz besitzen. Aus diesem Grund wurden männliche CNG3^{-/-}-Mäuse (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Martin Biel, München), welche des Neo-Resistenzgens homozygot besitzen, mit weiblichen Wildtypmäusen verpaart. Die Embryonen sind somit heterozygot bezüglich des Neo-Resistenzgens. Dazu werden am Abend in mehreren Käfigen je ein Männchen mit zwei Weibchen zusammengesetzt. Am nächsten Morgen werden die Paare wieder separiert und die Weibchen auf Vorhandensein eines Vaginalplugs geprüft. Der Vaginalplug aus koaguliertem Sperma ist Indiz für erfolgte Kopulation. Der Morgen des „Plug-Checks“ wird als Tag 0,5 p.c. definiert. Am Tag 14,5 p.c. werden die Embryonen isoliert und zur Feederzell-Präparation verwendet. Die bereits gebildeten Organe (Leber, Herz, Niere, s.g. „rote Gewebe“) eignen sich nicht zur Fibroblasten-Gewinnung und müssen entfernt werden. Der verbleibende Rumpf wird mit Trypsin behandelt, welches die Zellverbände auflöst, so dass vereinzelt Zellen resultieren. Damit die Feederzellen später nicht die ES-Zellen überwuchern, werden sie durch Bestrahlung mit γ -Strahlung teilungsunfähig gemacht.

Vorgehensweise

- Am Tag 14,5 p.c.: Töten der schwangeren Maus durch zervikale Dislokation
- Maus komplett in 80 % Ethanol baden
- Maus fixieren, Bauchraum eröffnen, den Uterus entnehmen und in eine Schale mit PBS legen
- Embryonen aus dem Uterus freipräparieren und in frisches PBS überführen
- Köpfe abschneiden und Corpus in frisches PBS überführen
- „rote Gewebe“ (Herz, Leber, Lunge) entfernen
- Rest des Corpus in frisches PBS überführen
- Pro Embryo 1 mL 1 x Trypsin/ EDTA in 50 mL Falcon-Gefäß vorlegen
- Embryos über dem Gefäß mit Pinzette kleinrupfen und in die Lösung fallen lassen
- 5 – 10 min bei 37° C im Brutschrank trypsinieren
- Gut und lange mit Pipetten resuspendieren (absteigend: erst 25 mL-, dann 10mL-, dann 5 mL-Stripette), bis Lösung homogen ist
- Mit EF-Medium auf 25 mL auffüllen

- Mit 5 mL-Pipette intensiv resuspendieren (ca. 5 – 10 min)
- Zelltrümmer 5-10 min absinken lassen
- Je 1 mL Zellsuspension plus 19 mL EF-Medium in eine 175 cm²-Flasche geben (pro Embryo ca. 5 Flaschen)
- Zellen bei 37° C und 5 % CO₂ inkubieren
- Mediumwechsel (EF-Medium) am Tag nach der Präparation, dann alle zwei Tage bis zur Konfluenz (ca. 5-6 Tage)

Expandieren der Zellen (1. Passage)

- je nach Zelldichte 1 Flasche auf 3 neue Flaschen expandieren
- Medium absaugen
- Mit 6 mL PBS/ Flasche waschen, absaugen
- Pro Flasche 3 mL 1 x Trypsin zugeben, Trypsin gleichmäßig verteilen
- 5 min bei 37° C inkubieren
- Zellen durch Abklopfen (Handfläche, Tisch) ablösen, möglichst vereinzelte Zellen
- 6 mL EF-Medium zugeben
- Mit 10 mL-Pipette resuspendieren
- Die jetzt insgesamt 9 mL Suspension auf 3 neue Flaschen verteilen (3 mL/ Flasche) und auf 20 mL mit EF-Medium auffüllen
- Bis zur Konfluenz wachsen lassen

Ernten der Zellen u. Vorbereiten zur Bestrahlung (2. Passage)

- wie 1. Passage
- Nach Resuspension werden je 5 Flaschen in einem 50 mL Falcon vereinigt (insgesamt dann 45 mL Suspension)
- 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Pellet in jeweils 10 mL EF-Medium resuspendieren
- Je zwei Falcons vereinigen und mit EF-Medium auf 40 mL auffüllen

Bestrahlung

- Zellen im Falcon in horizontaler Lage über die Transportzeit absetzen lassen
- Bestrahlung in Radioonkologie, Universitätsklinikum Tübingen
- Zellen so ausrichten, dass Bestrahlungsebene in der Mitte der Zellsuspension liegt

- 5 x 3 min mit je 10 Gray (Gesamtstrahlendosis: 50 Gray)

Einfrieren

- 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Die Falcons nacheinander Bearbeiten
- Benötigte Menge an EF/ DMSO 10 % herstellen (aus 1 geernteten 175cm² Flasche werden 3 Kryostocks hergestellt)
- Zellen immer mit 5 mL-Pipette gut resuspendieren (gleichbleibende Zelldichte)
- Je 1 mL in ein Nunc-Kryovial aliquotieren
- Stufenweise einfrieren (1 Tag -20° C, 1 Tag -80° C, dann in flüssigen Stickstoff -183° C überführen)
- Die Effizienz der Feederzellen muss durch eine Test-Aussaat bestimmt werden. Bei gelungener Präparation entspricht die Feederzahl eines Kryoröhrchens (1 Stock) ca. 100 cm². Für den Test 0,5 und 1 Stock aussäen.

4.3.14.2 Aussäen von Feederzellen

Generell wird die nötige Menge an Feederzellplatten am Tag vor Beginn der geplanten ES-Zellkultur vorbereitet. Nach dem Auftauen werden die Zellen vom Kryomedium befreit und auf auf Flaschen, Platten oder Schalen ausgesät.

- Gefrierstocks bei 37° C im Wasserbad auftauen
- Inhalt von zwei Kryo-Röhrchen in 5 mL EF-Medium suspendieren (15 mL Falcon-Röhrchen)
- 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Pellet in geeigneter Menge EF-Medium resuspendieren
- Bei 37° C und 5 % CO₂ inkubieren
- Mediumwechsel nach 24 h; weitere Mediumwechsel ist nicht notwendig, da die Feederzellen sich nicht mehr teilen und damit kein Medium verbrauchen.

4.3.15 Embryonale Stammzellen

4.3.15.1 Gewinnung Embryonaler Stammzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden R1 ES-Zellen (Nagy et al. 1993) verwendet. Diese wurden aus Blastozysten von agoutifarbenen Mäusen gewonnen, expandiert und nach der 13. Passage als gebrauchsfertige Gefrierstocks in flüssigem Stickstoff

gelagert. Zum Zeitpunkt der Transfektion befanden sich die Zellen in der 15. Passage.

4.3.15.2 Aussäen Embryonaler Stammzellen

Auftauen der ES-Zellen

- Gefrierstocks bei 37° C im Wasserbad auftauen
- In 15 mL Falcon-Röhrchen mit 5 mL ES/ LIF-Medium geben
- 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Überstand absaugen; in 5 mL ES/ LIF-Medium resuspendieren
- Waschen wiederholen
- Die 5 mL Zellsuspension in 25 cm²-Flasche mit Feeder-Zellen überführen
- Bei 37° C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubieren
- Wachstum bis 70 % Konfluenz (ca. 3 Tage); Täglich Mediumwechsel

Expandieren (1. Passage)

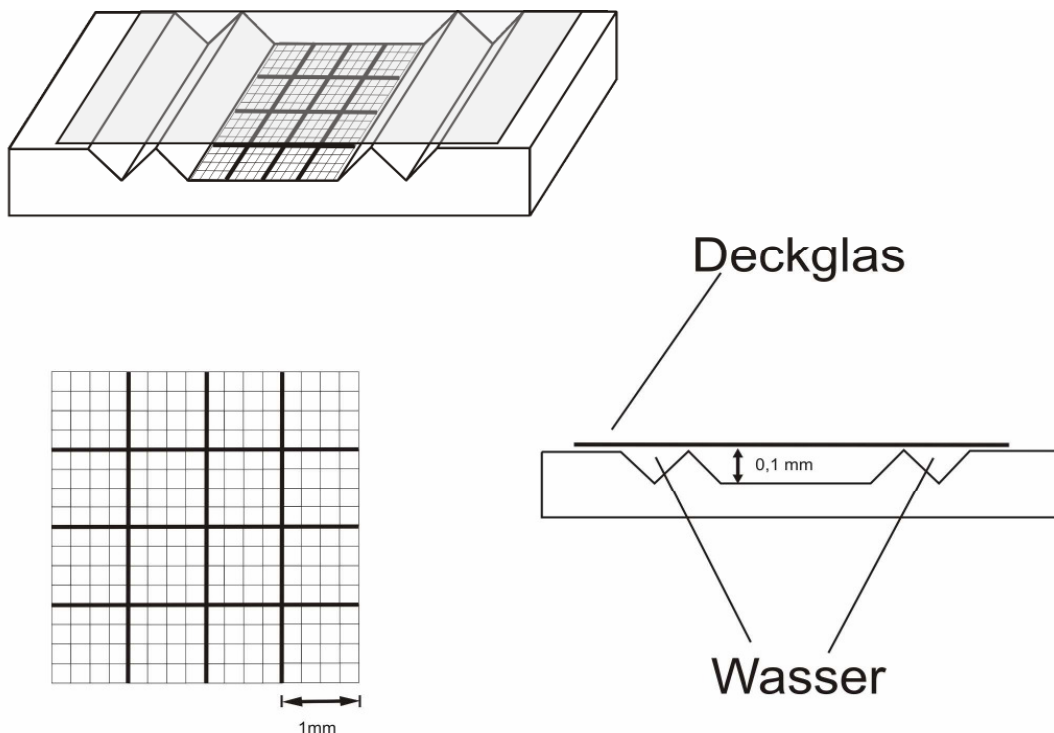
Um genügend Zellmaterial für die Elektroporation zu erhalten, werden die Stammzellen von einer 25 cm²-Flasche auf eine 75 cm²-Flasche expandiert. Dazu werden die Zellverbände von Feeder- und Stammzellen mit Trypsin aufgelöst. Zu lange Trypsineinwirkung schadet den Zellen allerdings, so dass eine Inaktivierung durch Zugabe von Medium und den darin enthaltenen Kationen vorgenommen wird.

- Medium absaugen
- Zweimal mit 5 mL PBS waschen
- 1 mL 1 x Trypsin/ EDTA zugeben
- 5 min bei 37° C inkubieren, Zellen durch Auf-und Ab-Pipettieren mit 5 mL Pipette vereinzeln
- Zugabe von 5 mL ES/ LIF, resuspendieren
- In 15 mL Falcon-Röhrchen überführen
- 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren, absaugen
- Nochmals in 5 mL ES/ LIF suspendieren, zentrifugieren, absaugen
- Zellen in 5 mL ES/ LIF-Medium resuspendieren
- In vorbereitete 75 cm²-Flasche mit Feeder-Zellen und 10 mL ES/ LIF überführen (Endvolumen 15 mL)
- Zellen durch „Achterbewegung“ gleichmäßig in der Flasche verteilen
- Bei 37° C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubieren
- Wachstum bis 50 % Konfluenz, kein interzellulärer Kontakt (ca. 2-3 Tage); Täglich Mediumwechsel

Vorbereitung zur Elektroporation (2. Passage)

- Medium absaugen
- 2 x mit 15 mL PBS waschen
- Zugabe von 3 mL 1 x Trypsin/ EDTA
- 5 min bei 37° C im Brutschrank inkubieren, Zellen mit 5 mL Pipette vereinzeln (evtl. mikroskopische Kontrolle)
- Zugabe von 7 mL ES/ LIF, resuspendieren
- In 15 mL Falcon-Röhrchen überführen
- 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Pellet in 10 mL PBS suspendieren
- 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Pellet in 800 μ L PBS aufnehmen
- Ca. 6×10^6 Zellen; Zellzählung mit 1 μ L Zellsuspension (siehe Abbildung 4-5)

Abbildung 4-5 Bestimmung der Zellzahl mit Neubauer Zellzählkammer



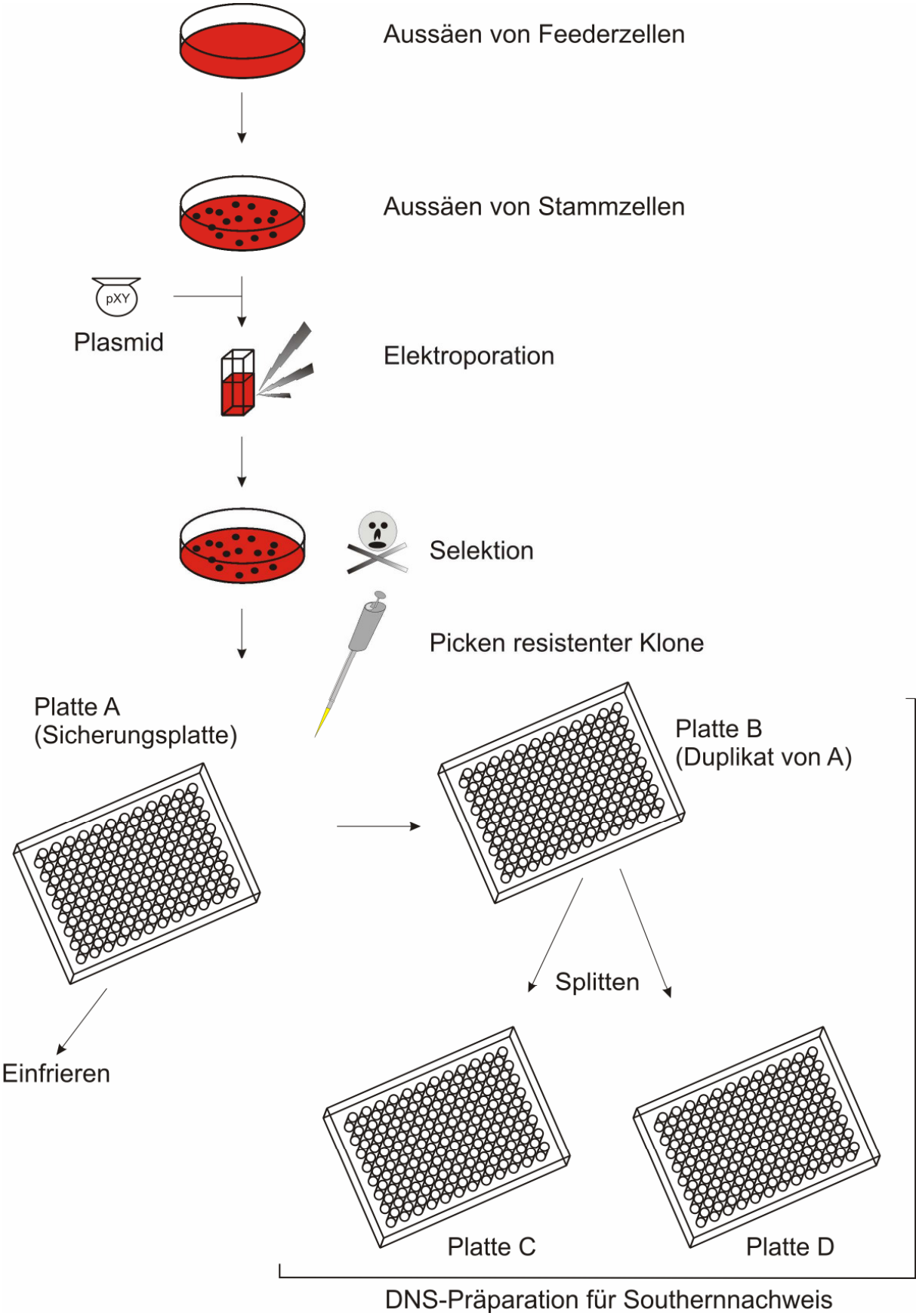
- Zugabe von 10 – 30 μ L Zellsuspension auf das Raster
- Je einen Tropfen Wasser in die seitlichen Cavitäten tropfen und Deckglas durch Adhäsion fixieren
- Unter dem Mikroskop die Zellen in einem kleinen Quadrat zählen
- Mehrere Quadrate auszählen und Mittelwert berechnen

- Gezählte Zellen x 16 = Zellzahl in 0,1 mm³
- Zellzahl in 0,1 mm³ x 10000 = Zellzahl in 1 mL (1 cm³)

4.3.15.3 Homologe Rekombination in ES-Zellen

Die gezielte Manipulation von ES-Zellen durch homologe Rekombination wird als „*Gene-Targeting*“ (siehe 1.5) bezeichnet. Dabei wird Fremd-DNS (Targeting-Konstrukt) in die Stammzellen eingebracht (Transfektion). Ein effizientes Verfahren zur Transfektion eukaryotischer Zellen ist die Elektroporation (Neumann et al. 1982; Chu et al. 1987). Kurze Hochspannungsimpulse bewirken eine Störung des Membranpotentials der Zelle. Es entstehen Poren in der Membran und fremde DNS kann in das Zellinnere aufgenommen werden (Klenchin et al. 1991; Sukharev et al. 1992). Im Zellinneren kann sich der fremde DNS-Strang in das Genom der Zelle integrieren. Diesen Vorgang bezeichnet man als „*crossing over*“. Um die Wahrscheinlichkeit der Rekombination am gewünschten Gen-Ort möglichst groß zu halten, ist es nötig, dass das Targeting-Konstrukt neben der Mutation auch große, zur Zielstruktur identische DNS-Abschnitte enthält. Dennoch ist das Ereignis der Rekombination an der richtigen Stelle relativ selten. Nur bei etwa 0,1 – 1 % der transfizierten Zellen findet sich eine korrekte Insertion. Bei den restlichen Zellen integriert das Targeting-Konstrukt entweder zufällig in das Genom, oder gar nicht. Aus diesem Grund ist eine geeignete „Screening“-Methode nötig, um Zellklone zu identifizieren, welche das Targeting-Konstrukt in ihr Genom aufgenommen haben und desweiteren diejenigen auszumachen, bei denen die Rekombination zusätzlich an der richtigen Stelle stattgefunden hat. Das Targeting-Konstrukt wird daher so konzipiert, dass später eine Selektion der gewünschten Zellen erfolgen kann. Zum einen enthält der zur Konstruktion verwendete Vektor eine s.g. „neo/tk-Kassette“ (Erklärung s.u.), worüber eine Doppelselektion positiver Zellklone möglich ist. Ob das Konstrukt zufällig oder korrekt integriert hat, wird durch Detektion definierter Fragmente über Southern-Blot nachgewiesen. Dem Konstrukt werden zusätzliche, am ursprünglichen Genort nicht vorhandene Restriktionsschnittstellen hinzugefügt. Bei richtiger Integration tritt somit eine Verlängerung oder Verkürzung im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp-Fragment auf.

Abbildung 4-6 Schema zum Ablauf eines Targetings



4.3.15.4 1. Targeting (positive Selektion)

Im 1. Targeting werden die ES-Zellen mit dem Targeting Konstrukt transfiziert. Der entsprechende Vektor enthält ein Gen, das eine Resistenz gegenüber dem Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin vermittelt (*neo*). Das Resistenzgen codiert für eine bakterielle Aminoglykosid-N-Acyltransferase, welche in der Lage ist, einen Acyl-Rest auf die 6-Aminogruppe von Aminoglykosiden zu übertragen und diese damit unwirksam zu machen. Im Gegensatz zu anderen Aminoglykosiden, wie Gentamicin oder Streptomycin, blockiert Geneticin die zelluläre Proteinsynthese durch Bindung an eukaryotische 80 S Ribosomen. Diese Eigenschaft macht Geneticin zu einem wirkungsvollen Selektionsinstrument in eukaryotischen Zellsystemen (Davies & Jimenez 1980). Die Kultur in geneticinhaltigem Medium überleben folglich nur die Zellen, welche den Selektionsmarker in ihr Genom integriert haben und somit resistent gegen das Antibiotikum sind. Die Resistenz zeigt jedoch lediglich an, dass das Targeting-Konstrukt integriert hat, nicht jedoch, an welcher Stelle. Auf korrekte Integration wird mittels zweier externer Southernsonden geprüft. Mehrfachintegration wird über eine für das Resistenzgen spezifische Sonde (*neo*-Sonde) ausgeschlossen, die bei Einfachintegration nur ein Signal liefern darf. Da diese Art der Selektion nur Zellen überleben, welche die Resistenz stabil aufgenommen haben, spricht man von einer „Positiv-Selektion“. Zellklone, die aus dem 1. Targeting hervorgehen, werden einem zweiten Targeting unterzogen.

Vorgehensweise

Vorbereitung der DNS

- 100 µg des Targeting-Konstrukts linearisieren
- Phenol/ Chloroform Aufreinigung (s.o.)
- Ethanolfällung (s.o.)
- Pellet unter Sterilwerkbank trocknen
- In 100 µL PBS lösen (Dem Lösungsvorgang Zeit geben, evtl. über Nacht)
- 5 mL für Checkgel einsetzen
- 50- 60 µg DNS zur Elektroporation einsetzen

Elektroporation

- 50 µg DNS in sterilem Kryovial vorlegen
- Mit den vorbereiteten ES-Zellen in PBS (s.o.) vorsichtig mischen
- Mit gestopfter Pasteur-Pipette in vorgekühlte Elektroporationsküvette überführen und auf Eis lagern

- Elektroporationsbedingungen: (am Gerät einstellen)
Ladung: 500 μ F
Spannung: 0,23 kV
- Küvette ins Gerät einbringen
- Elektroporation bis akustisches Signal ertönt
- Zeitkonstante¹⁾ $T_{\text{const.}}$ am Gerät ablesen (soll: 7-9 msec)
- Kontrolle mit 900 μ L PBS durchführen: Gleiche Zeitkonstante
- Zellen in der Küvette 5 min bei RT stehen lassen
- In 15 mL Falcon-Röhrchen 9,2 mL ES/ LIF vorlegen
- Zellen mit gestopfter Pasteur-Pipette in Falcon-Röhrchen überführen und gut resuspendieren
- Je 1 mL in 55 cm² Petrischale²⁾ geben
- Zellen durch 8er-Bewegung gleichmäßig verteilen
- Bei 37° C und 5 % CO₂ inkubieren
- Nach 24 Stunden mit der Selektion (0,4 mg G418/ mL ES/ LIF) beginnen
- Täglicher Mediumwechsel
- Resistente Klone nach ca. 8 Tagen picken

1) Die Zeitkonstante τ (Tau) beschreibt die Zeit, in welcher die Spannung auf den Wert $1/e$ (etwa 37 %) des Ausgangswertes absinkt. Sie errechnet sich aus dem Produkt aus Widerstand und Kapazität.

2) Am Nachmittag zuvor 10 Schalen mit Feederzellen und 10 mL ES/ LIF vorbereiten.
Zur optimalen pH Einstellung 30 min. vor Elektroporation Mediumwechsel

Picken der ES-Zellklone

Vorbereitungen:

- Sterilwerkbank ausräumen, säubern, UV-Bestrahlung (20 min)
- Mikroskop mit Ethanol 70 % einsprühen, abwischen und in Werkbank stellen
- 2 x 96-Loch-Platten, Abfallgefäß, autoklavierte 200 μ L-Spitzen und 20 μ L-Pipette unter die Werkbank
- Haarnetz und Mundschutz aufziehen
- Kurz vor dem Picken in jedes Loch einer 96-Loch-Platte 35 μ L PBS vorlegen

Picken

Gepickt wird unter dem Mikroskop, bei 25-facher Vergrößerung im Dunkelfeld. Die zu pickenden Klone sollten auch mit bloßem Auge in der Kulturschale erkennbar und ihr Durchmesser größer als jener der Pipettenspitze sein. Nur Zellklone, die einen scharf abgegrenzten, leuchtenden Rand haben, werden gepickt (siehe Abbildung 5-25). Ist der Rand unförmig ausgefranst oder berühren sich die Zellklone bereits, deutet dies auf beginnende Differenzierung hin. Entsprechende Zellen dürfen wegen fehlender Pluripotenz nicht verwendet werden. Die Klone möglichst ganz mit der Pipette einsaugen, da diese sonst erneut anwachsen können und eventuell doppelt gepickt werden.

- Je einen Klon mit der 20 μL Pipette (Einstellung 2,5 μL) umfahren, einsaugen und in ein Loch mit PBS transferieren
- Spitzen korrespondierend zum Loch entnehmen, nicht benötigte Löcher der 96-Loch-Platte mit Deckel der zweiten Platte abdecken.
- Wenn Klone gepickt, Zugabe von 30 μL 2 x Trypsin/EDTA in jedes Loch
- 10 min bei 37° C inkubieren
- Mit 8-Kanal-Pipette (auf 40 μL einstellen) Zellen vereinzeln (mikroskopische Kontrolle)
- 60 μL ES/ LIF/G418 zugeben
- Mit 8-Kanal-Pipette suspendieren und je 50 μL auf 2 frische, mit Feederzellen beschichtete 96-Loch-Platten (A- und B-Platte) mit 75 μL ES/LIF/G418 pro Loch geben
- Am Tag nach dem Picken Mediumwechsel, dann alle zwei Tage
- Nach 2 bis 3 Tagen Evaluation

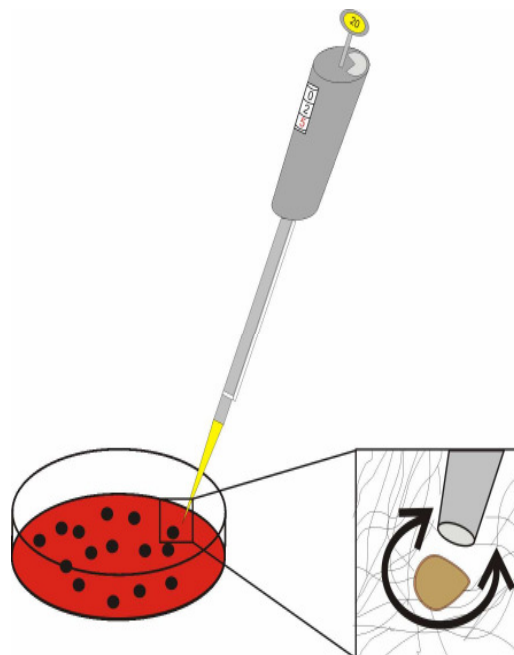


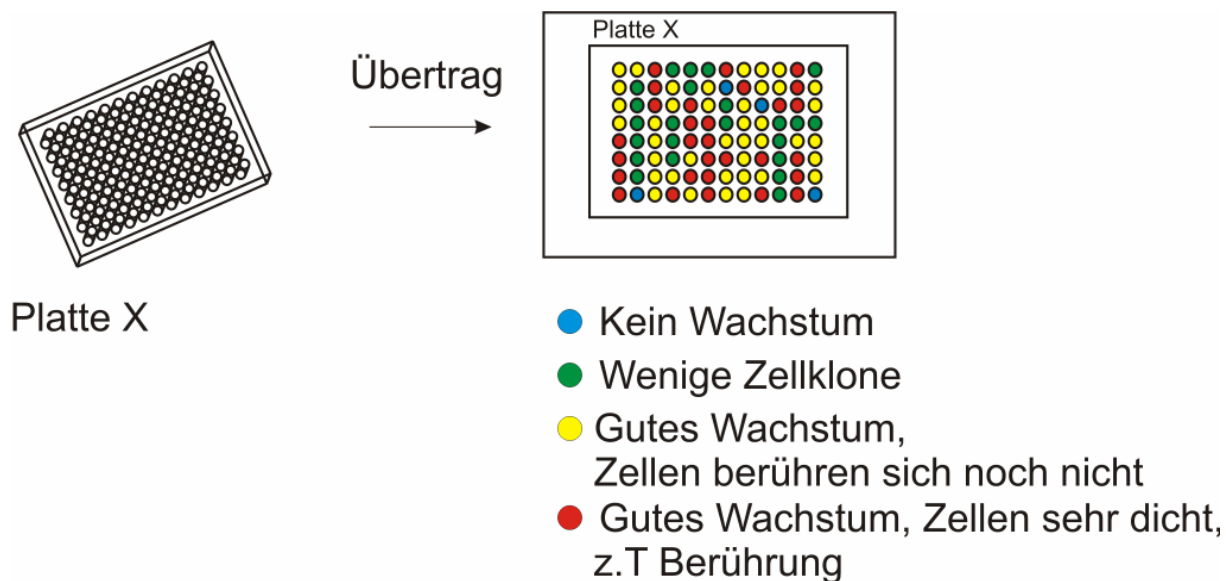
Abbildung 4-7 Picken der Klone

Zum Picken werden die Klone vorsichtig umfahren. Dabei wird die Feederzellschicht mit der Pipettenspitze „zerschnitten“. Durch vorsichtiges Anstoßen kann der Klon gelockert und anschließend eingesaugt werden

Evaluation

Nach 2 bis 3 Tagen wird das Wachstum der einzelnen Stammzellklone bezüglich Größe, Anzahl und Aussehen unter dem Mikroskop beurteilt. Dabei bedient man sich eines 4-Farben-Codes und ordnet jedem Loch eine Farbe zu. Dies wird auf einer Papierkopie der Platte festgehalten.

Abbildung 4-8 Beispiel für eine Evaluation



Einfrieren der Sicherungsplatte (Platte A)

Von dieser Platte werden nach erfolgter Southern-Blot-Analyse die entsprechenden, rekombinanten Zellklone aufgetaut und für das zweite Targeting vorbereitet. Die Sicherungsplatte sollte nicht länger als 3- 4 Wochen bei -80°C gelagert werden, da die Zellen zunehmend an Qualität für eine Keimbahngängigkeit verlieren.

- Medium vorsichtig abgießen
- Zugabe von 180 μL PBS pro Loch (8-Kanal-Pipette)
- PBS abgießen
- Zugabe von 30 μL 1x Trypsin/EDTA pro Loch
- 10 min bei 37°C inkubieren
- Möglichst vereinzelt Zellen (mikroskopische Kontrolle)
- Zugabe von 180 μL Kryomedium (ES/LIF/G418 + 10 % DMSO)
- Zellen mit 8 Kanal-Pipette suspendieren
- Mit autoklavierband abkleben, 1- 3 Stunden bei -20°C , dann -80°C

Vervielfältigung der Platte B für DNS-Präparation

Platte B und die resultierenden Platten C und D sind exakte Duplikate der Sicherungsplatte A. Die Southern-Ergebnisse können somit zugeordnet und der richtige Klon von der Sicherungsplatte aufgetaut werden.

- Medium vorsichtig abgießen
- 2 x mit 180 µL PBS waschen
- Zugabe von 30 µL 1 x Trypsin/EDTA
- 10 min bei 37° C inkubieren (mikroskopische Kontrolle)
- Zugabe von 120 µL ES/ LIF/ G418
- Mit 8-Kanal-Pipette resuspendieren
- Je 50 µL der Zellsuspension auf 2 frisch, mit Feederzellen beschichtete 96-Loch-Platten (Platten C und D) mit 150 µL ES/ LIF/ G418 pro Loch verteilen
- Zum Rest der Zellen je 150 µL ES/ LIF/ G418 zugeben (bleibt Platte B)
- Zellen solange wachsen lassen, bis das Medium gelb wird (ca. 4 Tage)

Einfrieren der Zellen für die DNS-Präparation

Diese Arbeiten werden normal im Labor unsteril durchgeführt.

- Medium vorsichtig über eine Ecke abkippen
- 180 µL PBS zugeben, vorsichtig abkippen
- Platte leicht auf Papierhandtüchern trockenklopfen
- Mit Parafilm abkleben und bei -20° C lagern

DNS-Präparation

Die Durchführung der DNS-Präparation wurde wie unter 4.3.2 beschrieben durchgeführt

Analyse der DNS mittels Southern Blot

Da als blau und grün evaluierte Zellen aufgrund ihres schlechten Wachstumsverhaltens als ungeeignet für eine spätere Injektion angesehen werden, wurden nur gelbe und rote Zellklone auf homologe Rekombination überprüft.

Die DNS-Analyse über Southern-Blot wurde wie unter 4.3.11 beschrieben durchgeführt.

4.3.15.5 2. Targeting (negative Selektion)

Neben der *neo*-Resistenz besitzt der Vektor als weiteren Selektionsmarker ein Gen, das für die virale Thymidinkinase codiert (*tk*). Die Thymidinkinase ist ein Enzym, welches zu den Nukleosid-Analoga zählende Virostatika wie Aciclovir oder Ganciclovir phosphoryliert und somit in die aktive Form überführt. Diese Substanzen dienen der DNS-Polymerase als „falsche Substrate“ und führen aufgrund ihrer Struktur, die keine weitere Verlängerung mehr zulässt, zum Kettenabbruch. Im 2. Targeting erfolgt die Transfektion mit dem Vektor pIC-Cre. Dieser Vektor wird nur vorübergehend (transient) in die Zellen aufgenommen und vermittelt die Expression der Cre-Rekombinase (zum Cre/ Lox P-Systems siehe 1.6.). Nur die zwei Rekombinationsereignisse, bei denen die Selektionskassette wieder entfernt wurde, sind erwünscht. Wird die Kultur nun in ganciclovirhaltigem Medium durchgeführt, kann das Virostatikum nur bei vorhandener Thymidinkinase aktiviert werden. Alle Zellen, bei denen die *neo/tk*-Kassette noch vorhanden ist, sterben folglich ab, während die anderen von der Substanz unberührt bleiben. Diese Art der Selektion wird als „Negativ-Selektion“ bezeichnet, da dieses Mal nur Zellen ohne Selektionsmarker überleben. Die Analyse und Unterscheidung der resultierenden Zellklone erfolgt ebenfalls über Southern-Blot.

Vorgehensweise

Auftauen der positiven Klone

- Entsprechende 96-Loch-Platten kurz bei 37° C im Brutschrank auftauen
- Zellen in der jeweiligen Vertiefung gut mit 200 µL-Pipette und gestopfter Spitze resuspendieren
- Den Inhalt einer Vertiefung der 96-Loch-Platte in eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte (mit Feedern beschichtet, 1 mL ES/LIF/G418 pro Loch) überführen
- Bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubieren
- Täglicher Mediumwechsel bis Zellen ca. 70 % konfluent (ca. 5-6 Tage)

Expandieren auf 6-Loch-Platte (1. Passage)

- Medium absaugen
- 2 x mit PBS waschen
- Pro Loch 200 µL 1 x Trypsin/ EDTA zugeben
- 5 min bei 37° C im Brutschrank inkubieren
- Mit gestopfter 200 µL-Spitze resuspendieren (mikroskopische Kontrolle)
- Zugabe von je 900 µL ES/LIF/G418

- Mit gestopfter Pasteur-Pipette gut resuspendieren
- In eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte (Feederzellen; 3 mL/ Vertiefung) transferieren
- Bei 37° C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubieren
- Täglicher Mediumwechsel bis Zellen ca. 70 % konfluent sind (ca. 1-2 Tage)

Expandieren auf 25 cm²-Flasche, Abzweigen von Zellen für Kryokonservierung (2. Passage)

- Medium absaugen
- 3 x mit PBS waschen
- Zugabe von von je 1 mL 1 x Trypsin/EDTA
- 5 min bei 37° C inkubieren
- Mit gestopfter 1 mL Spitze vorsichtig resuspendieren (mikroskopische Kontrolle)
- Zugabe von 3 mL ES/LIF/G418; resuspendieren (insgesamt 4 mL Zellsuspension)
- In 15 mL Falcon-Röhrchen überführen, 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren; absaugen
- Pellet in 4 mL ES/LIF/G418 Medium aufnehmen
- 2 mL davon in 15 mL Falcon-Röhrchen mit 3 mL ES/LIF/G418
- 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren; absaugen
- Pellet in 2 mL Kryo-Medium (ES/LIF/G418/ 10 % DMSO) aufnehmen und je 1 mL in Nunc-Kryo-Röhrchen pipettieren.
- Über Nacht bei -80° C lagern, dann in flüssigen Stickstoff überführen
- Restliche 2 mL in 25 cm²-Flasche (mit Feederzellen beschichtet, 3 mL ES/LIF/G418) transferieren
- Bei 37° C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubieren
- Täglicher Mediumwechsel bis Zellen ca. 70 % (konfluent sind (ca. 2 Tage)

Vorbereiten zur Elektroporation und Abzweigen von Zellen für DNS-Präparation (3. Passage)

- Medium absaugen
- 2 x mit PBS waschen
- Zugabe von je 1,5 mL 1 x Trypsin/EDTA
- 5 min bei 37° C im Brutschrank inkubieren
- Mit gestopfter Pasteurpipette vorsichtig resuspendieren
- Zugabe von 5 mL ES/LIF/G418, resuspendieren

- 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Pellet in 6 mL ES/LIF/G418 aufnehmen, resuspendieren
- 5 mL in 75 cm²-Flasche (mit Feederzellen beschichtet, 10 mL ES/LIF/G418) transferieren
- Restliche 1 mL mit einer Spitze der 8-Kanal-Pipette suspendieren und je 30 µL pro Vertiefung auf 3 Reihen einer 96-Loch-Platte (mit Feederzellen beschichtet; 100 µL ES/LIF/G418) verteilen (Abbildung 4-9); wachsen lassen bis Medium gelb; DNS-Präparation s.o.)
- Bei der Flasche täglich Mediumwechsel bis Zellen 70 % konfluent sind (1-2 Tage), dann Cre-Transfektion

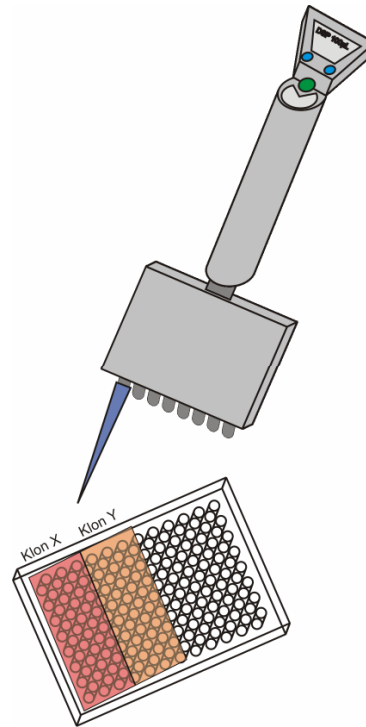


Abbildung 4-9 Abzweigen von Zellen für DNA-Präparation

Vorbereitung der DNS

- 100 µg nicht-linearisierten pIC-Cre-Vektor vorbereiten

(siehe 4.3.15.4 1. Targeting)

Cre-Transfektion

- Medium absaugen
- 2 x mit PBS waschen
- Zugabe von 3 mL 1 x Trypsin/EDTA
- 5 min bei 37° C inkubieren
- Mit gestopfter Pasteurpipette vorsichtig resuspendieren
- Zugabe von 7 mL ES/LIF (ohne G418!), suspendieren
- In 15 mL Falcon-Röhrchen überführen
- 5 m in bei 1000 rpm zentrifugieren; absaugen
- Pellet in 10 mL PBS resuspendieren
- 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren absaugen
- In 900 µL PBS resuspendieren
- 20 µg pIC-Cre in Nunc-Kryoröhrchen vorlegen
- Zugabe der 900 µL Zellsuspension

- Vorsichtig mit gestopfter Pasteurpipette mischen und in vorgekühlte Elektroporationsküvette überführen und auf Eis lagern
- Elektroporationsbedingungen: (am Gerät einstellen)
Ladung: 500 μ F
Spannung: 0,23 kV
- Küvette ins Gerät einbringen
- Elektroporation bis akustisches Signal ertönt
- Zeitkonstante $T_{\text{const.}}$ am Gerät ablesen (soll: 7-9 msec)
- Kontrolle mit 900 μ L PBS durchführen: Gleiche Zeitkonstante
- Zellen in der Küvette 5 min bei RT stehen lassen
- 9 mL ES/LIF in 15 mL Falcon-Röhrchen vorlegen
- Zellen mit gestopfter Pasteurpipette in Röhrchen überführen und gut suspendieren; Zellzahl: ca. 1×10^7 Zellen (Zellzählung siehe oben)
- Auf Kulturschalen mit Feederzellen und 10 mL ES/LIF nach folgendem Schema verteilen:

Tabelle 4-1 Verteilung der Zellen auf Kulturschalen

Anzahl der Schalen	Nummerierung	Volumen der Zellsuspension	Zellzahl
1	1	2,00 mL	2×10^6
3	2	1,00 mL	1×10^6
3	3	0,50 mL	$0,5 \times 10^6$
2	4	0,25 mL	$0,25 \times 10^6$
1	5	0,10 mL	$0,1 \times 10^6$

Das Aussäen der Zellen in Schalen verschiedener Dichte ist nötig, da das Wachstumverhalten der transfizierten Zellen nicht vorherzusehen ist. Bei zu hoher Zelldichte werden durch das einsetzende Absterben der Zellen sehr große Mengen an Faktoren freigesetzt, welche dann ihrerseits das Wachstum der richtig rekombinierten Stammzellen beeinträchtigen können.

- täglicher Mediumwechsel
- Wachstum der Zellen kontrollieren; bevor Zellen sich berühren (ca. 2 Tage)
Selektionsstart mit Ganciclovir
- Täglicher Mediumwechsel mit ES/LIF/Ganc.
- Nach ca. 8- 10 Tagen können ES-Zellklone gepickt werden

Weiteres Vorgehen (Picken, Vervielfältigung, Einfrieren, DNS-Präparation) siehe 1. Targeting (4.3.15.4)

4.3.16 Injektion genetisch modifizierter ES-Zellen in Blastozysten

Die embryonalen Stammzellen, welche doppelt selektioniert sind und bei denen alle Nachweise anzeigen, dass die gewünschte Mutation an der richtigen Stelle im Genom vorliegt, werden schließlich zur Generierung der Knockout-Maus herangezogen. Dazu werden die entsprechenden Zellklone aufgetaut, in Blastozysten injiziert und diese Blastozysten in Ammen-Mäuse (*foster-mice*) reimplantiert. In Abbildung 4-3 ist dieses Vorgehen schematisch dargestellt.

Ziel der Injektion und Reimplantation ist es, eine Maus zu erzeugen, die zu einem großen Teil aus den mutierten ES-Zellen entstanden ist. Da die durch homologe Rekombination veränderten ES-Zellen und die für die Injektion verwendeten Blastozysten von Mäusen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund abstammen, werden die so erzeugten Mäuse als Chimären bezeichnet. Die zu mutierenden Stammzellen werden aus Blastozysten von SV 129 Mäusen gewonnen, deren Fell eine golden-bräunliche (agouti) Färbung aufweist. Die Blastozysten für die Injektion hingegen stammen von C57/Bl6 Mäusen mit schwarzem Fell. Zur Entstehung des Maus-Organismus tragen somit Stammzellen beider Mauslinien bei. Auch die Fellfärbung setzt sich anteilig aus braun und schwarz zusammen, so dass die Mäuse ein geflecktes Fell aufweisen. Das Ausmaß des Chimärismus lässt sich dadurch bereits optisch durch Beurteilung der Fellfarbe abschätzen. Je größer der agoutifarbene Anteil, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass auch Keimbahnzellen die gewünschte Mutation tragen und diese dadurch weitervererbt wird (Keimbahngängigkeit).

4.3.16.1 Isolierung von Blastozysten

Zur Gewinnung der Blastozysten werden abends C57/Bl6 Weibchen mit männlichen C57/Bl6 Mäusen zusammengesetzt und am nächsten Morgen wieder getrennt. Ein sichtbarer Vaginalpfropf deutet auf erfolgte Kopulation hin. Bei erfolgter Befruchtung entspricht dies Tag 0,5 p.c. An Tag 3,5 p.c. werden die Spendertiere getötet und die Blastozysten entnommen (Hogan et al. 2000).

4.3.16.2 Vorbereitung der ES-Zellen zur Injektion

7 - 9 Tage vor geplanter Injektion werden die dafür vorgesehenen Zellen in Kultur genommen. Dazu werden sie wie unter 4.4.3.4 beschrieben aufgetaut, in eine 24-Loch-Platte überführt und nach Trypsinierung in verschiedenen Verdünnungen auf einzelne Vertiefungen einer 6-Loch-Platte verteilt. Nach 2-4 Tagen, je nach Dichte der ausgesäten Zellen, haben die Stammzellen die für die Injektion optimale Größe erreicht.

Für die Injektion werden die ES-Zellen einer Vertiefung durch Trypsinierung vereinzelt, zentrifugiert und in ca. 3 mL ES-Medium aufgenommen. 1 – 1,5 mL davon werden zentrifugiert und nach Absaugen eines Großteils des Überstandes zur Injektion eingesetzt. Aus den verbliebenen Zellen wird DNS präpariert und die Richtigkeit der injizierten Klone nochmals per Southern-Blot bzw. PCR überprüft.

4.3.16.3 Blastozysteninjektion

Um die vereinzelt Stammzellen in die isolierte Blastozyste zu bringen, bedient man sich der Mikroinjektionstechnik. Unter mikroskopischer Kontrolle werden 10 - 20 Stammzellen perlschnurartig in die Injektionskapillare aufgezogen und in die an der Haltepipette durch Ansaugen immobilisierte Blastozyste injiziert. Die innere Zellmasse der Blastozyste ist hierbei auf Seite der Haltepipette oder um etwa 90° gedreht.

4.3.16.4 Embryotransfer in pseudoschwangere Ammenmäuse

Die injizierten Blastozysten müssen nun in weibliche Ammenmäuse reimplantiert werden. Diese Weibchen sollen vom Hormonstatus auf Schwangerschaft eingestellt sein, jedoch keine eigenen Embryos tragen. Dies erreicht man durch Zusammensetzen der Ammen-Mäuse mit sterilen, vasktomierten Männchen. Nach erfolgter Kopulation stellt sich der Körper der Weibchen auf Schwangerschaft um, ohne dass eine Befruchtung stattgefunden hat (Pseudoschwangerschaft). Der Embryotransfer findet an Tag 2,5 der Pseudoschwangerschaft statt.

Unter Narkose werden die Blastozysten nun in diese Ammen-Mäuse implantiert. Durch einen Schnitt am Rücken wird der Uterus freigelegt, mit einer Nadel punktiert und mit der Transferpipette werden ca. 10 -15 Blastocysten in das Uterushorn

injiziert. Da die Maus zwei Uterushörner besitzt, können 20-30 Blastozysten in eine Ammen-Maus reimplantiert werden.

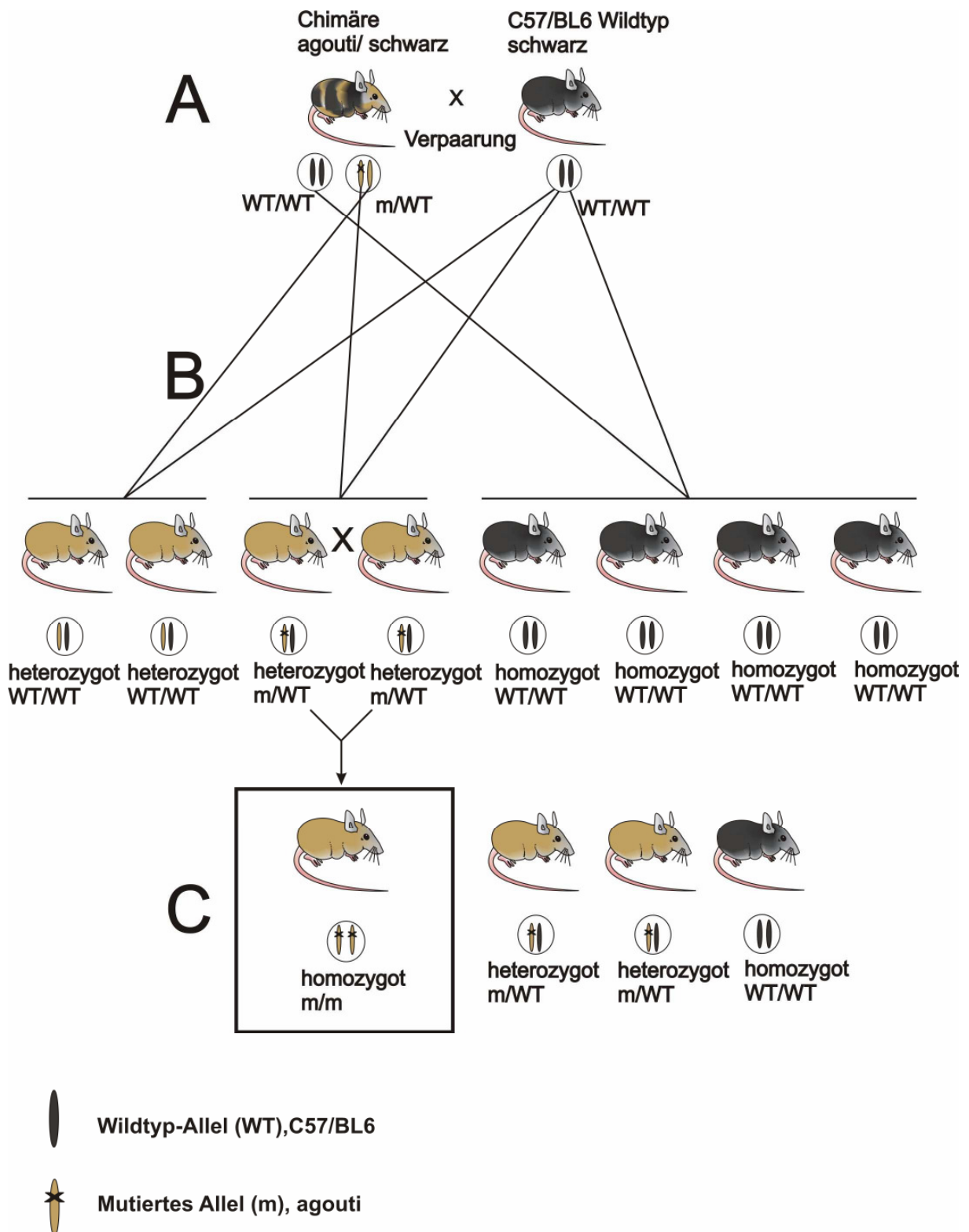
Die Tragezeit von Mäusen beträgt 21 Tage. Die Blastozysten befinden sich im Tag 3,5 ihrer Entwicklung. Somit werden an Tag 18 nach erfolgreicher Reimplantation Junge geboren. Etwa 10 Tage nach der Geburt ist das Fell der Jungen entwickelt, so dass erste Aussagen über etwaigen Chimärismus gemacht werden können.

4.3.16.5 Testung der Chimären auf Keimbahngängigkeit und Etablierung von Knockout-Mauslinien (siehe Abbildung 4-10)

Wie bereits erwähnt, bestehen die chimären Mäuse aus Zellen, die sich einerseits aus den Blastozysten der schwarzen Spendertiere (C57/Bl6) entwickelt haben und Zellen, die aus den injizierten mutationstragenden ES-Zellen der agouti-farbenen Mäuse (SV 129) hervorgegangen sind **(A)**. Die Mutation kann nur von einer auf die nächste Generation weitervererbt werden, wenn auch Zellen der Keimbahn die genetische Veränderung tragen. Um eben diese Keimbahngängigkeit zu testen, werden männliche Chimären mit hohem (60 – 90 %) agouti-farbenem Fellanteil mit schwarzen C57/Bl6 Weibchen verpaart **(A)**. In der Abbildung werden schematisch die unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten dargestellt. Agouti wird dominant über schwarz vererbt, so dass braune Nachkommen potentiell Träger der Mutation sind **(B)**. Diese Tiere sind heterozygot SV 129 /C57/Bl6. Da jedoch die injizierten Stammzellen auch nur in einem Allel mutiert sind (eine korrekte homologe Rekombination beider Allele ist ein äußerst unwahrscheinliches Ereignis), kann es sein, dass es sich bei agouti-farbenen Tieren dennoch um Wildtyp-Mäuse handelt. Ob von der Chimäre das Wildtyp (WT, +) Allel, oder das mutierte (m, -) Allel weitergegeben wurde, wird über Southern-Blot bzw. Genotypisierungs-PCR mit Mausschwanz-DNS bestimmt.

Mutationstragende heterozygote Tiere (m/WT bzw. +/-) werden untereinander verpaart um letztendlich homozygote m/m bzw. -/- Mäuse zu erhalten **(C)**. Hierbei folgt die Vererbung theoretisch den Mendelschen Gesetzen. Die Wahrscheinlichkeit für einen homozygoten -/- Nachkommen durch Verpaarung zweier heterozygoter +/- Mäuse beträgt rechnerisch 25 %.

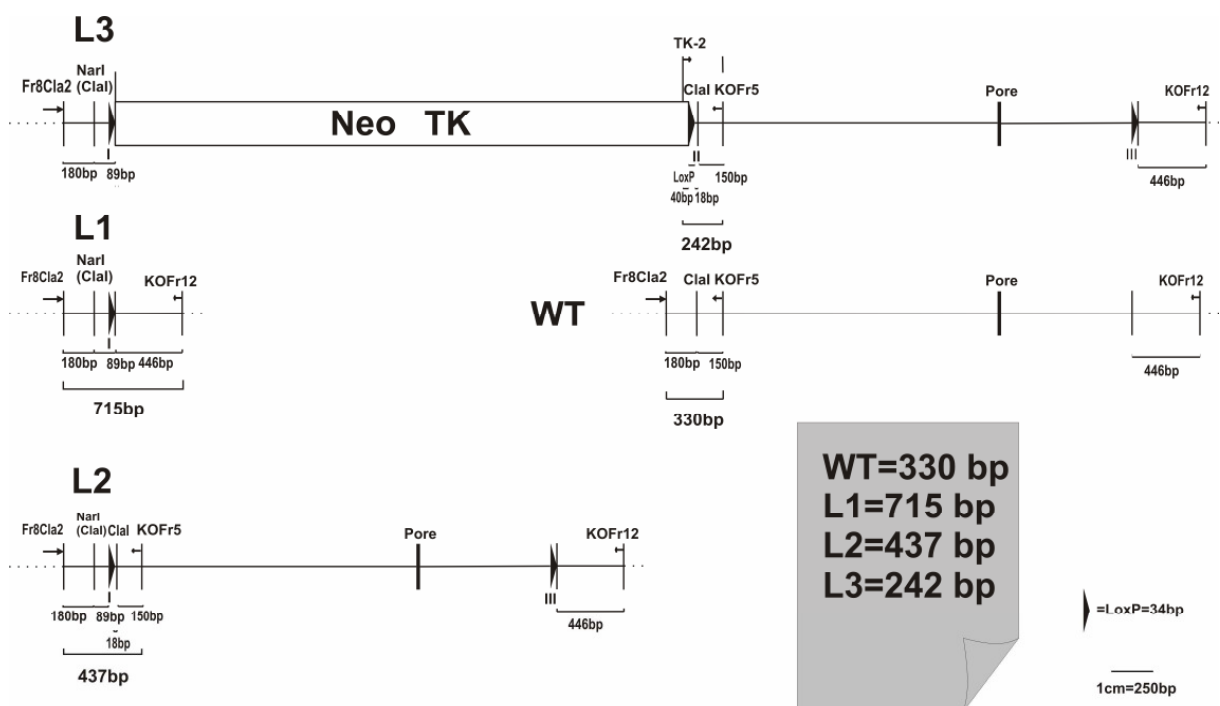
Abbildung 4-10 Schema zur Etablierung einer Knockout-Mauslinie (Erklärungen im Text)



4.3.16.6 Genotypisierung der Mäuse durch PCR

Den 8- 10 Tage alten Tieren werden Schwanzbiopsien entnommen und die DNS wie unter 4.3.2.2 beschrieben isoliert. Etwa 5 μ L der DNS-Lösung werden für die Genotypisierungs-PCR eingesetzt. Die PCR-Primer sind so gewählt, dass sich Wildtyp-, L1- und L2-Allele aufgrund verschiedener Amplikongrößen unterscheiden lassen.

Abbildung 4-11 Genotypisierungs-PCR



Verwendete Primer

Fr8Cla2 (fw), TK-2 (fw), KO-Fr_5 (rv), KO-Fr_12 (rv)

Strategie

Die PCR-Strategie zum Nachweis der einzelnen Genotypen beruht darauf, dass ein äquimolares Gemisch der vier Primer eingesetzt wird. Je nach Genotyp entstehen Fragmente unterschiedlicher Größe, die im Agarosegel voneinander unterschieden werden können. Die Primer sind so gewählt, dass beide Vorwärts-Primer mit beiden Rückwärts-Primern kompatibel sind. So sind die Primer zwar alle im Reaktionsansatz vorhanden, ein Amplikon entsteht dabei aber nur, wenn je ein Vorwärts- und ein

Rückwärtsprimer im richtigen Abstand zueinander liegen, dass unter den gewünschten PCR-Bedingungen das Fragment entsprechender Größe entstehen kann. Liegen die Primer zu weit auseinander, wird das theoretisch mögliche Fragment unter diesen Voraussetzungen nicht gebildet.

Wildtyp

Mit Fr8Cla2 und KO-Fr_5 entsteht ein **330 bp** Fragment. TK-2 kann nicht binden, da die NeoTK-Selektionskassette fehlt. Fr8Cla2 und KO-Fr_12 liegen zu weit auseinander (2,8 kb).

L3

Mit TK-2 und KO-Fr_5 entsteht ein **242 bp** Fragment. KO-Fr_12 ist von beiden Vorwärtsprimern zu weit entfernt, bei Fr8Cla2 und KO-Fr_5 ist der Abstand durch Insertion der NeoTK-Selektionskassette ebenfalls zu groß.


L1

Durch Wegfall des gesamten Abschnitts zwischen LoxP-I und LoxP-III rücken Fr8Cla2 und KO-Fr_12 soweit zusammen, dass ein Amplikon von **715 bp** gebildet wird.

L2

Im L2-Allel fehlt die Selektionskassette. Somit kann jetzt mit Fr8Cla2 und Ko-Fr_5 ein **437 bp** Fragment amplifiziert werden. Mit Fr8Cla2 und KO-Fr_12 entsteht aufgrund der großen räumlichen Distanz kein Amplikon.

Protokoll für Genotypisierungs-PCR

94 °C	3 min	Initiale Denaturierung	 29 Zyklen
94 °C	1 min	Denaturierung	
60 °C	30 s	Annealing	
72 °C	30 s	Elongation	
72 °C	3 min	Finale Elongation	

5 Ergebnisse

5.1 Identifizierung des murinen *slo2.1* Gens

Für die erfolgreiche Entwicklung einer Strategie zur Deletion des *slo2.1* Gens in der Maus war es unabdingbar, sich einen genauen Überblick über die Genarchitektur von *slo2.1* zu verschaffen. Nur mit Kenntnis der Exon-/ Intronstruktur eines Gens lässt sich eine Strategie zur Herstellung des Targeting-Konstruktes planen. Dies stellte sich als problema-

tisch heraus, da zu Beginn der Arbeit keine Sequenz des *slo2.1* verfügbar war. Einzig die Sequenz des homologen Kalium-Kanals SLACK (*slo2*) aus Ratte und Fadenwurm (Yuan et al. 2000; Yuan et al. 2003) war bekannt. Die Arbeit von Yuan et al. lieferte erste Hinweise, dass der natriumaktivierte Kaliumkanal zur *slo* Genfamilie zählt und dass darüber hinaus zwei unterschiedliche Paraloge des *slo2* Gens existieren, die jetzt als *slo2.1* und *slo2.2* bezeichnet wurden.

Die daraufhin mit der bekannten Sequenz des *slo2* der Ratte durchgeführte Datenbankrecherche landete zwei Treffer. Mit Hilfe der BLAST-Funktion des

Ensemble Mouse Genome Server (www.ensembl.org) fand sich ein Bereich großer Homologie auf Chromosom 2, ein Bereich mit geringerer Übereinstimmung auf Chromosom 1 (Abbildung 5-1). Bei BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) handelt es sich um ein Programm mit dem, basierend auf einem bestimmten Algorithmus, DNS- oder Proteinsequenzen auf Übereinstimmungen untersucht werden können (Altschul et al. 1990). Das Ergebnis der BLAST -Suche führte zu

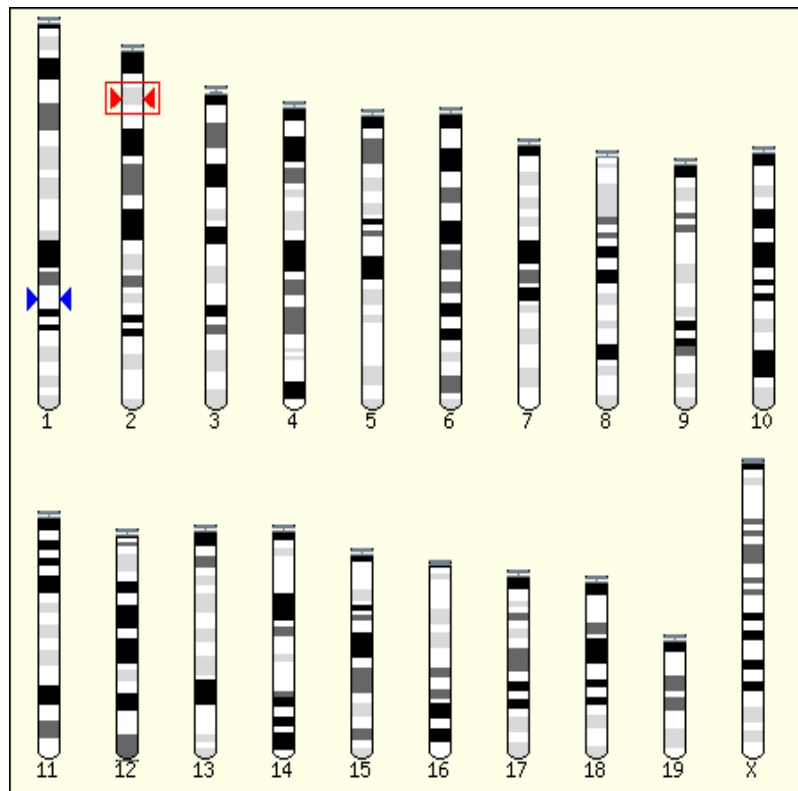


Abbildung 5-1 Chromosomenverteilung Slo2.1 und Slo2.2

BLAST von slo2 (Ratte), Mausgenom

Rot= slo2.2

Blau= slo2.1

dem Schluss, dass es sich bei dem Treffer auf Chromosom 2 um das Mausorthologe zu Slo2 (jetzt Slo 2.2) handelt und der Abschnitt auf Chromosom 1 das von mir gesuchte Gen slo2.1 beinhalten musste. Um mehr Informationen über Gen- und Proteinsequenzen zu bekommen, wurde daraufhin die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchsucht und lieferte eine putative cDNA- und Protein-Sequenz des wahrscheinlichen Slo2.1. Alignments dieser Sequenz mit dem Slo2 Protein zeigten relativ hohe Homologien im transmembranären Bereich, jedoch fehlten dem putativen Slo2.1 zwei Transmembransegmente und der N-terminale Teil bzw. wäre dieser als extrem kurz anzusehen (Abbildung 5-2). Da dies sehr unwahrscheinlich schien, wurde die putative Sequenz der Datenbank zum Primerdesign herangezogen und eigene PCR-Amplifizierungen mit anschließenden Sequenzierungsarbeiten an Erststrang-cDNS durchgeführt. Der Erststrang war durch Reverse Transkription gewonnen worden. Als Matrize für diese Reaktion diente Poly-A-mRNS welche aus dem Mausgehirn isoliert worden war (4.3.3). Auf diese Weise konnte die cDNA-Sequenz des Slo2.1 sukzessive zusammengetragen werden. Die von mir ermittelte Sequenz des murinen Slo2.1 stimmt zu etwa 98 % mit der von Bhattacharjee et al. 2003 nahezu gleichzeitig veröffentlichten Sequenz des Slo2.1 der Ratte überein. Aufgrund zweier verschiedener Tierspezies finden sich Unterschiede in einzelnen Aminosäuren des N-Terminus, während Transmembran- und Porenregion hochkonserviert sind (Abbildung 5-3).

Abbildung 5-2 Alignment des putativen slo2.1 mit slo2 der Ratte

```

slo2.1_putativ   mkrlkntrlvqdvtteqvvsmlfnher-----
slo2_Ratte      maraklprspsegkagpgdtpagsaapeephglsp1lp1ptrggsgvsgsdvqgrlhvedfsl
                                     S1
slo2.1_putativ   -----
slo2_Ratte      dsslsqvqvvefyvntfkerlklffiknqrsslrlrlfnfslklltcllyivrvlldnp
                                     S2
slo2.1_putativ   -----
slo2_Ratte      dqggicwgctkynyftngsssefhwapilwverkmalwviqvivatisfletmlliylsy
                                     S3 S4
slo2.1_putativ   -----
slo2_Ratte      kgniweqifhvsfvlemintlpfiitvfwpp1rn1fipvflncwlakhahlenmindfhra
                                     S5
slo2.1_putativ   -----LCVNTGcgefnhfvwilkakgevgnltdafvptkxsklkt
slo2_Ratte      ilrtqsamfnqvlilfctllLCLVFTGt-----
                                     PORE S6
slo2.1_putativ   esiCGIQHLERIGKKNLFDLSYFCIVTFTSTVGFGDVTPEtWssKLFVAMICVALVVLP
slo2_Ratte      ---CGIQHLERAGGNLNLTSFYFCIVTFTSTVGFGDVTPKIWpSQLLVVILICVTLVVLP
slo2.1_putativ   IQFEQLAYLWMERQKSGGNSRHRARTEKHVVLCVSSLKIDLLMDFLNEFYAHPRLQDYY
slo2_Ratte      LQFEELVYLWMERQKSGGNSRHRARTEKHVVLCVSSLKIDLLMDFLNEFYAHPRLQDYY
slo2.1_putativ   VVILCPTEMDVQVRRVLQIPMWSQRVIYLYLQGSALKDQDLLRAKMDNAEACFILSSRCEVD
slo2_Ratte      VVILCPSEMDVQVRRVLQIPLWSQRVIYLYLQGSALKDQDLRAKMDNGEACFILSSRNEVD
slo2.1_putativ   RTSSDHQTILRAWAVKDFAPNCP1YVQI1LKPENKFH1KFADHVVEE1FKYAMLALNC1C
slo2_Ratte      RTAADHQTILRAWAVKDFAPNCP1YVQI1LKPENKFHV1KFADHVVEE1CKYAMLALNC1C
slo2.1_putativ   PATSTLITLLVHTSRGQEGQSP1EQWQKTYGRCSGNEVYH1vleESTFFAEYEGKSFTYA
slo2_Ratte      PATSTLITLLVHTSRGQEGQSP1EQWQRM1YGRCSGNEVYH1rmgDSKFFREYEGKSFTYA
slo2.1_putativ   SFHAHKKFGVCLVGVRRDNKN1LLNPGPRYIMNASDICFYINITKEENSAF---KNQDQ
slo2_Ratte      AFHAHKKYGVC1LIGLKREENKS1LLNPGPRH1LAASDTCFYINITKEENSAF1fkQEEKQ
slo2.1_putativ   QRKSNVRSFYHG1PSR1LPVHS1IASMgtVAIDLQD1SCRATSGpt1al-----PSEGGK
slo2_Ratte      NRRGLAGQALYEG1PSR1LPVHS1IASM--VAMD1QNTDCR1PSQGGsggggk1tl1PTENGs
slo2.1_putativ   ELRRPSIAPVLEVADTSS1Q1TCDLLSDQSEDETTpdeets1nldykvwedyqetktveln
slo2_Ratte      GSRRPSIAPVLELADSSALLPCDLLSDQSEDEVTpsdeglsvveyvkgyppnspyigss
slo2.1_putativ   ypqvynliltvrlssqrkgtvqdfLKKSCQHNYEDAKAYGFKNKLI1VAAETAGNGLYN
slo2_Ratte      ptlchl1pvkapfcl1r-----LDKGCKHNSYEDAKAYGFKNKLI1VSAETAGNGLYN
slo2.1_putativ   FIVPLRAYYR1PKKELNPIVLLLDNp-----CGVTF
slo2_Ratte      FIVPLRAYYRSRRELNPIVLLLDNkp1dh1fleaiccfpmv1yvmegsvdn1lds1l1qCGI1Y
slo2.1_putativ   AANMVVVDK1ESTMSAEEDYMADAKTIVNVQ1TLFRkhatqqasqqkeyeryad-----
slo2_Ratte      ADNLVVVDK1ESTMSAEEDYMADAKTIVNVQ1TMFR1lfp1slsittelthpsnmrfmqfrakd
slo2.1_putativ   -----MDQKERERGSN1LAFMFRLPFAAGRVFS1S1MLD1TLLYQ-----
slo2_Ratte      sys1al1skLEKQERENG1SNLAFMFRLPFAAGRVFS1S1MLD1TLLYQ1sfvkdymititr1ll
slo2.1_putativ   -----MKITEDDLW1IRTYARLYQKLCSS1TGDVPIGIYRTEsq1l1t-----
slo2_Ratte      gl1dt1tpgsgylcaMKVTEDDLW1IRTYGR1LFQKLCSS1SAE1PIGIYRTEchvf1s1s1phdlr
slo2.1_putativ   SESQ1S1S1VEEWEDTKDVKD1Pghh1rsh-----RNS1TSSDQSDH1PLLRRKSMQWARRL
slo2_Ratte      AQSQ1SVNME1DCE1DTREAK1PwgtraasgggsthgRHGGSAD1PVEH1PLLRRKSLQWARKL
slo2.1_putativ   SRK1GPKHSGK---TAEKITQQR1LNLYRRSERQELAE1LVKNRMKHLGLSTVGY-----
slo2_Ratte      SRKSSKQAGK1apmT1DWITQQR1LSLYRRSERQELSELVKNRMKHLGLPTTGYedvan1ta
slo2.1_putativ   -----DEMNDH1qs-TLSY1ILINPS1DTRLELNDVVY1LIRPD1FLSYLPNSEPS
slo2_Ratte      sdvmnr1vnl1gyl1qDEMNDH1hqnT1LSYV1LINPP1DTRLEPN1DIVY1LIRSD1PLAHV1TSSSQS
slo2.1_putativ   RKnsicnaavq--DSREETQL
slo2_Ratte      RKsscsnkl1sscnpETRDETQL

```

█ Transmembrandomänen

Alignment erstellt nach Bhattacharjee 2003 mit DIALIGN
 (B. Morgenstern 2004:DIALIGN: Multiple DNA and Protein
 Sequence Alignment at BiBiServ.Nucleic Acids Research 2, 33-W36)

Abbildung 5-3 Alignment muriner slo2.1 mit slo2.1 der Ratte

```

mslo2.1   MVDLESEVPPLPPRYRFRDLLLGDQGWQNDDRVQVEFYMNENTFKERLKLFFIKNQRSSL
rslo2.1   MVDLESEVPPLPPRYRFRDLLLGDQGWQNDDRVQVEFYMNENTFKERLKLFFIKNQRSSL
          S1 ████████████████████████████████████████████████████████████ S2 ████████████████████████████████████████████████████████████

mslo2.1   RIRLFNFSLKLLSCLLYIIRVLLKPKSQGNEWSHIFWVNRSLPLWGLQVSVVALISLFETI
rslo2.1   RIRLFNFSLKLLSCLLYIIRVLLKPKSQGNDWSHIFWVNRSLPLWGLQVSVVALISLFETI
          ██████████ S3 ████████████████████████████████████████████████████████████ S4 ████████████████████████████████████████████████████████████

mslo2.1   LLGYLSYKGNIEQILRIPFILEIINAVPFIISIFWPTLRNLFVFPVFLNCWLAKHALENM
rslo2.1   LLGYLSYKGNIEQILRVPFFILEIINAVPFIISIFWPTLRNLFVFPVFLNCWLAKHALENM
          ██████████ S5 ████████████████████████████████████████████████████████████ PORE ████████████████████████████████████████████████████████████

mslo2.1   INDLHRAIQRTQSAMFNQVLILISTLLCLIFTCICGIQHLEIRIGKKLNLFDSLYFCIVTF
rslo2.1   INDLHRAIQRTQSAMFNQVLILISTLLCLIFTCICGIQHLEIRIGKKLNLFDSLYFCIVTF
          ██████████ S6 ████████████████████████████████████████████████████████████

mslo2.1   STVGFGDVTPETWSSKLFVVAMICVALVVLPIQFEQLAYLWMERQKSGGNYSRHRAQTEK
rslo2.1   STVGFGDVTPETWSSKLFVVAMICVALVVLPIQFEQLAYLWMERQKSGGNYSRHRAQTEK

mslo2.1   HVVLCVSSLKIDLLMDFLNEFYAHPRLQDYYVVILCPTEMDVQVRRVLQIPMWSQRVIYL
rslo2.1   HVVLCVSSLKIDLLMDFLNEFYAHPRLQDYYVVILCPTEMDVQVRRVLQIPMWSQRVIYL

mslo2.1   QGSALKDQDLLRAKMDNAEACFILSSRCEVDRTSSDHQTI LRAWAVKDFAPNCPPLYVQIL
rslo2.1   QGSALKDQDLLRAKMDNAEACFILSSRCEVDRTSSDHQTI LRAWAVKDFAPNCPPLYVQIL

mslo2.1   KPENKFHIKFADHVCEEEFKYAMLALNCICPATSTLITLLVHTRGQ-----EGQQS
rslo2.1   KPENKFHIKFADHVCEEEFKYAMLALNCICPATSTLITLLVHTRGQcvclccrEGQQS

mslo2.1   PEQWQKTYGRCSGNEVYHIVLEESTFFAEYEGKSFTYASFHAHKKFGVCLVGRREDNKN
rslo2.1   PEQWQKTYGRCSGNEVYHIVLEESTFFAEYEGKSFTYASFHAHKKFGVCLVGRREDNKN

mslo2.1   ILLNPGPRYIMNASDICFYINITKEENSAFKNQDQQRKSNVRSRFBYHGSPRLPVHSIIAS
rslo2.1   ILLNPGPRYIMNASDICFYINITKEENSAFKNQDQQRKSNVRSRFBYHGSPRLPVHSIIAS

mslo2.1   MGTVAIDLQDTSRATSGPTLALPSEGKELRRPSIAPVLEVADTSSIQTCDLLSDQSED
rslo2.1   MGTVAIDLQDTSRATSGPTLALPSEGKELRRPSIAPVLEVADTSSIQTCDLLSDQSED

mslo2.1   ETPDEETSSNLEYAKGYPPYSPYIGSSPTFCHLLQEKVPFCCLRLDKSCQHNYYEDA
rslo2.1   ETPDEETSSNLEYAKGYPPYSPYIGSSPTFCHLLQEKVPFCCLRLDKSCQHNYYEDA

mslo2.1   YGFKNKLIIVAAETAGNGLYNFIVPLRAYRPKKELNPIVLLLDNPPDMHFLDAICWFPM
rslo2.1   YGFKNKLIIVAAETAGNGLYNFIVPLRAYRPKKELNPIVLLLDNPPDMHFLDAICWFPM

mslo2.1   VYYMVGSIDNLDLRLCGVTFANMVVVDKESTMSAEEDYMAKTI VNVQTLFRLFSSL
rslo2.1   VYYMVGSIDNLDLRLCGVTFANMVVVDKESTMSAEEDYMAKTI VNVQTLFRLFSSL

mslo2.1   SIITELTHPANMRFMQFRAKDCYSLALSKLEKKERERGSNLAFMFRLPFAAGRVFSISML
rslo2.1   SIITELTHPANMRFMQFRAKDCYSLALSKLEKKERERGSNLAFMFRLPFAAGRVFSISML

mslo2.1   DTLLYQSFVKDYMISITRLLLGLDTIPGSGFLCSMKITEDDLWIRTYARLYQKLCSSSTGD
rslo2.1   DTLLYQSFVKDYMISITRLLLGLDTIPGSGFLCSMKITEDDLWIRTYARLYQKLCSSSTGD

mslo2.1   VPIGIYRTESQKLTTSSESQISISVEEWEDTKDVKDPGHRSIHRNSTSSDQSDHPLLRK
rslo2.1   VPIGIYRTESQKLTTSSESQISISVEEWEDTKDVKDPGHRSIHRNSTSSDQSDHPLLRK

mslo2.1   SMQWARRLSRKGPKHSGKTAEKITQQRNLNLYRRSERQELAEVKNRMKHLGLSTVGYDEM
rslo2.1   SMQWARRLSRKGPKHSGKTAEKITQQRNLNLYRRSERQELAEVKNRMKHLGLSTVGYDEM

mslo2.1   NDHQSTLSYILINPSPDTRLELNDVVYLIRPDPLSYLPNSEPSRKNSICNAAVQDSREET
rslo2.1   NDHQSTLSYILINPSPDTRLELNDVVYLIRPDPLSYLPNSEPSRKNSICNAAVQDSREET

mslo2.1   QL
rslo2.1   QL
    
```

█ Transmembrandomänen

Alignment erstellt nach Bhattacharjee 2003 mit DIALIGN
 (B. Morgenstern 2004: DIALIGN: Multiple DNA and Protein
 Sequence Alignment at BiBiServ. Nucleic Acids Research 2, 33-W36)

5.2 Entwicklung der Knockout-Strategie für *slo2.1*

5.2.1 Erstellung einer Gen-Karte

Nachdem die Sequenz der mRNA jetzt bekannt war, konnte über BLAST auch die Genarchitektur ermittelt werden. Dazu wurde mit der mRNA- bzw. cDNA-Sequenz von *slo2.1* und dem Maus-Genom eine BLAST Analyse durchgeführt. Als Resultat erhielt man eine Folge von 28 Alignments, die sich auf einem 370 kb großen Abschnitt des Chromosom 1 verteilten. Da sich die 28 Alignments umgekehrt wieder zur Ausgangs-cDNS zusammenfügen ließen, wurde daraus geschlossen, dass es sich hierbei um die Exon-Sequenzen handelt. Das *slo2.1* Gen erstreckt sich also über einen Abschnitt von 370 kb und besteht aus 28 Exonen. Die reine Exon-Sequenz (mRNA, cDNA) hat die Länge von 3408 bp, das hieraus abgeleitete Protein besteht aus 1136 Aminosäuren. Interessant ist weiterhin zu erwähnen, dass sich zwischen dem ersten und zweiten Exon ein Intron-Bereich von 100 kb befindet. Mit großer Wahrscheinlichkeit finden sich in diesem Abschnitt weitere Exone. Spekulativ kann also angenommen werden, dass noch andere Varianten von Slo2.1 existieren, die durch alternatives Spleißen entstanden sind.

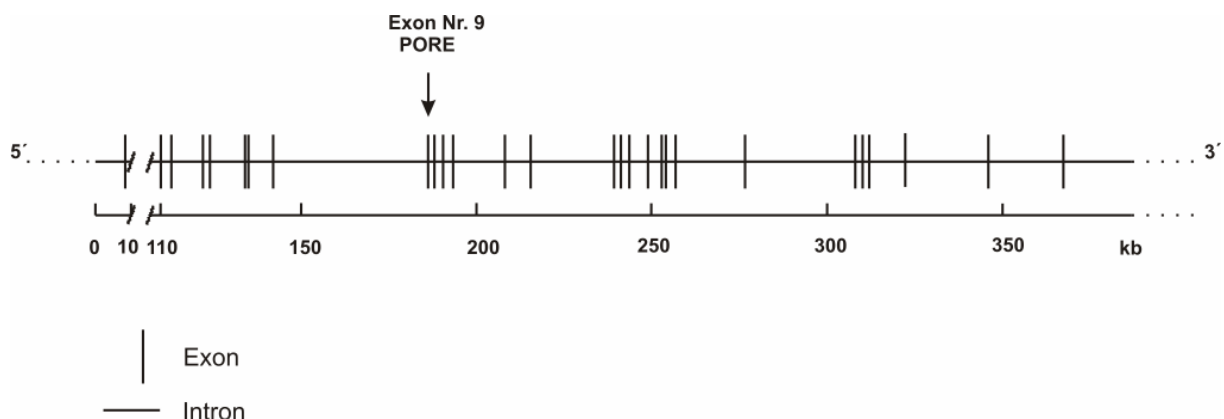


Abbildung 5-4 Genkarte von *slo2.1*

5.2.2 Knockout-Strategie

Ziel des Knockouts ist es, das Gen in seiner Funktion so zu beeinträchtigen, dass kein funktionsfähiges Protein mehr daraus entstehen kann. Neben der Verschiebung des Leserasters durch Einklonierung einer fremden DNS-Sequenz (z.B. einer Selektionskassette), kann dies auch dadurch erreicht werden, dass ein essentielles Strukturelement des Proteins zerstört wird. Bei Ionenkanälen stellt die Pore ein geeignetes Ziel für derartige Manipulationen dar.

Im Falle von *slo2.1* ist der für die Porenregion codierende DNS-Abschnitt im Exon Nummer 9 lokalisiert. Die Strategie beruht auf der gezielten Deletion dieses Exons. Hierzu wurde ein Bereich von ca. 20 kb aus der genomischen DNS-Sequenz ausgewählt, bei welchem sich Exon 9 etwa in der Mitte befindet. Dieser Abschnitt wurde mit dem Online-Computerprogramm NEBcutter (www.tools.neb.com) einer genauen Restriktionsanalyse unterzogen, um einen Überblick über vorhandene Restriktions-Stellen zu bekommen. Schnittstellen, die in diesem Abschnitt nur einmal vorkommen (*1-cutter*), wurden bevorzugt in die Überlegungen miteinbezogen. Schneidet ein Enzym mehrfach kann es sein, dass bereits klonierte Fragmente in einem späteren Klonierungsschritt ungewollt wieder zerschnitten werden.

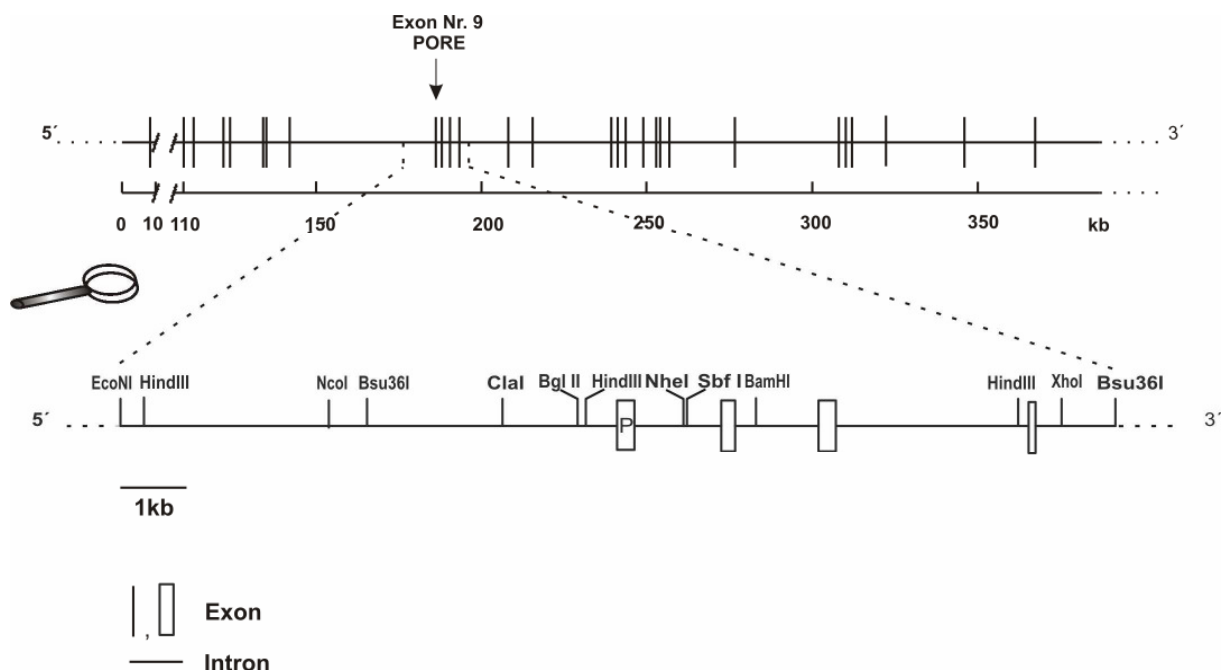


Abbildung 5-5 Porenregion

Dargestellt ist ein Bereich 10 kb up bzw. downstream des Porenexons (P). Auch die für die Knockoutstrategie relevanten Restriktionsstellen sind eingezeichnet.

Als Ziel der Arbeit sollten sowohl generelle, als auch konditionale Knockout-Mäuse erzeugt werden. Dahingehend wurde auch die Strategie ausgelegt. Porexon Nr. 9 sollte letztendlich gefloxt vorliegen. Folglich werden insgesamt drei LoxP-Sequenzen benötigt (siehe Cre/LoxP-System). Zwei LoxP-Sequenzen

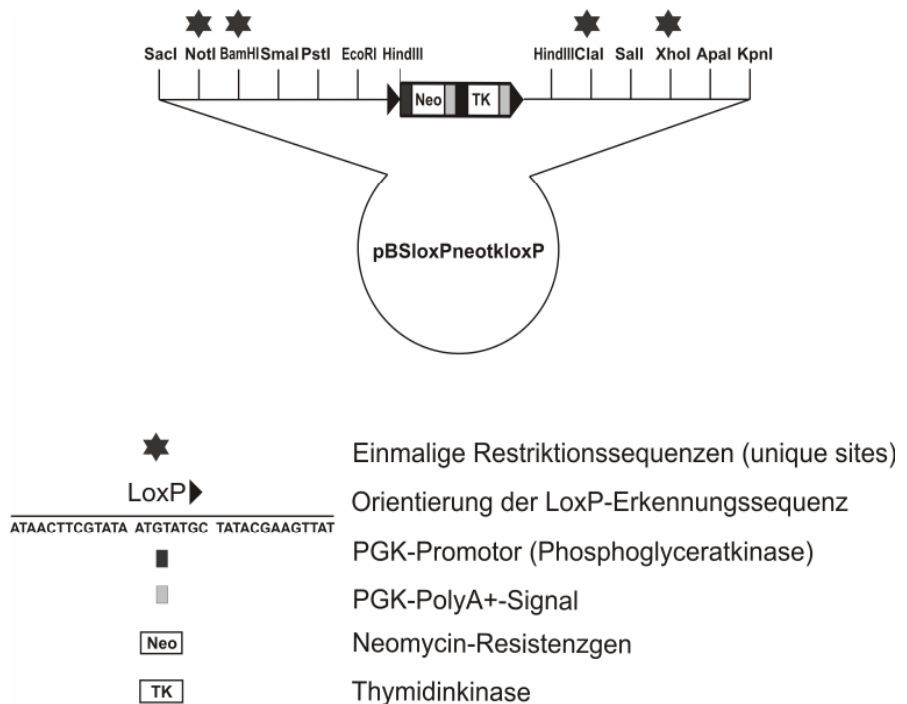


Abbildung 5-6 Knockoutvektor pBSloxPneotkloxP

sind bereits im vorgegebenen Vektor pBSLoxPneotkLoxP vorhanden. Dieser beruht auf einem pBluescript Grundgerüst und enthält eine von zwei LoxP-Sequenzen flankierte Selektionskassette (*neo/TK*) in seiner Klonierungsstelle. In 5'- und 3'-Richtung der Selektionskassette befinden sich jeweils zwei, einmalig vorkommende Restriktionsstellen, über welche die homologen Bereiche in den Vektor eingefügt werden. Die dritte LoxP-Sequenz muss so konzipiert sein, dass ein Entfernen des Porexons Nr. 9 über Cre-vermittelte Rekombination möglich ist. An die dritte, auch als „singulär“ bezeichnete, LoxP-Sequenz wird weiterhin eine Restriktionserkennungssequenz, die im Wildtyp-Gen an dieser Stelle nicht vorkommen darf, angefügt. Damit wird später das Rekombinationsergebnis nachgewiesen. LoxP- und Restriktionssequenz werden durch PCR erzeugt. LoxP und Enzymschnittstelle allein lassen sich aber noch nicht in richtiger Orientierung und an der richtigen Stelle in das Targeting-Konstrukt einfügen. Dazu wird ein Fragment benötigt, das die richtige Größe hat, um korrekt durch PCR amplifiziert zu werden, den richtigen Abstand zum Porexon (≥ 500 bp) besitzt und nach Möglichkeit von zwei verschiedenen, einmaligen Restriktionserkennungssequenzen begrenzt wird. Über diese wird das native Fragment im Targeting-Konstrukt durch das, mit LoxP- und Restriktionssequenz modifizierte, ersetzt. Als Primer für die PCR dienen Oligonukleotide, die einen Überhang besitzen, der auf der einen Seite aus Enzymschnittstelle, auf der anderen Seite aus Enzymschnittstelle, LoxP-Sequenz und zusätzlicher Schnittstelle besteht. Ein für die Modifikation geeigneter DNS-Abschnitt findet sich 600 bp in 3'-Richtung von der Pore. Hier wird ein 150 bp langes Fragment

von den Schnittstellen NheI und SbfI begrenzt. Aufgrund der Position dieses PCR-Fragments, und der Tatsache, dass sich in 5'-Richtung der Pore ein großer Intronbereich befindet, wurde entschieden, die Selektionskassette 5', und die singuläre LoxP mit angehängter Schnittstelle 3' der Pore einzufügen. Das prinzipiell aus drei Abschnitten bestehende Targeting-Konstrukt setzt sich in diesem Fall folgendermaßen zusammen (Abbildung 5-7):

- 1. Kurzer Arm
- 2. Selektionskassette
- 3. Langer Arm.

Die Pore befindet sich im langen Arm, der sich ebenfalls in drei Abschnitte unterteilt:

- 1. Vom Ende der Selektionskassette bis PCR-Fragment
- 2. PCR-Fragment inklusive LoxP
- 3. Vom Ende des PCR-Fragments bis Ende des Homologiebereichs

Im weiteren Verlauf der Strategie-Planung mussten nun die begrenzenden Schnittstellen für kurzen und langen Arm festgelegt werden.

Bei näherer Betrachtung der Restriktionskarte und der Klonierungsstelle des Vektors fällt auf, dass die Schnittstellen BamHI, ClaI und XhoI sowohl im gewählten Genabschnitt, als auch im Vektor (als die einmaligen Restriktionsstellen) vorkommen. ClaI und XhoI liegen außerdem in der richtigen Reihenfolge vor, so dass diese als Begrenzung für den langen Arm in Frage kommen. Für das 5'-Ende des kurzen Armes ist die NcoI-Schnittstelle geeignet, so dass das Targeting-Konstrukt folgende Gliederung aufweisen soll:

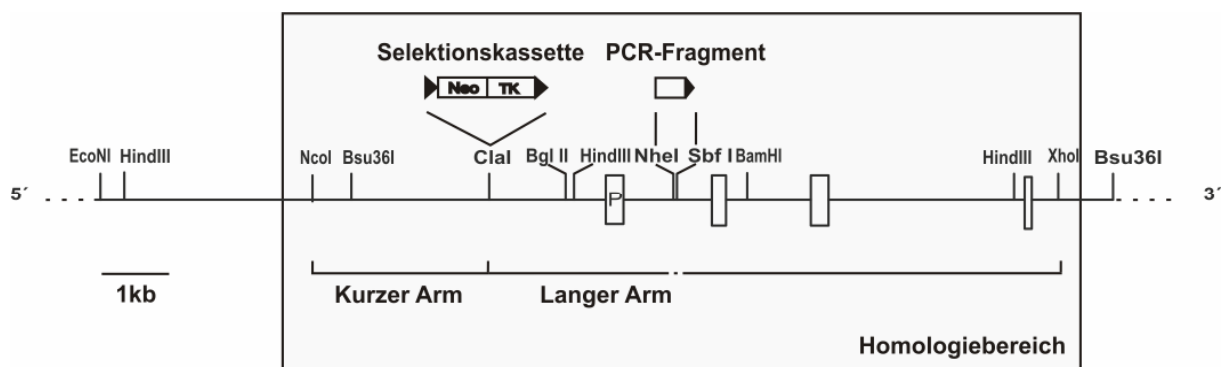


Abbildung 5-7 Targeting-Konstrukt

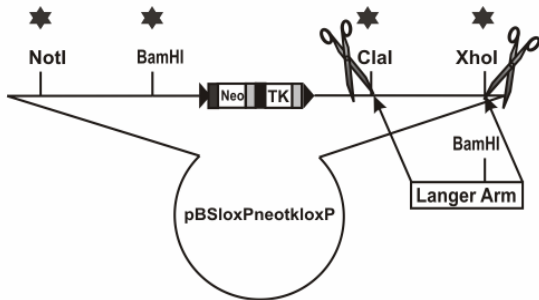
Die Abbildung zeigt die geplanten Veränderungen des Gens. Die Selektionskassette soll über eine ClaI Schnittstelle 5' des Porenexons eingeführt werden, das PCR-Fragment, inklusive dritter, singulärer LoxP-Sequenz wird über NheI und SbfI 3' des Porenexons eingefügt.

Das Vorhandensein von BamHI und ClaI würde bei nachfolgenden Klonierungsarbeiten allerdings Probleme bereiten:

Wird zuerst der kurze Arm in den Vektor eingebracht, bekommt dieser eine zusätzliche ClaI Schnittstelle. Zur Insertion des langen Arms muss der Vektor aber mit ClaI und XhoI geöffnet werden. Der kurze Arm würde hierbei zwangsläufig zerstört (A). Wird im umgekehrten Fall zuerst der lange Arm in den Vektor kloniert, kommt eine BamHI-Schnittstelle hinzu, die bei Öffnen des Vektors mit BamHI ebenfalls geschnitten, und der lange Arm dadurch zerstört würde (B). Eine der beiden Schnittstellen musste folglich eliminiert werden. Zur

B

1. Öffnen des Vektors mit ClaI und XhoI, Einfügen des langen Arms



2. Öffnen des Vektors mit NotI und BamHI zum Einfügen des kurzen Arms. Hierbei würde der lange Arm auch zerschnitten.

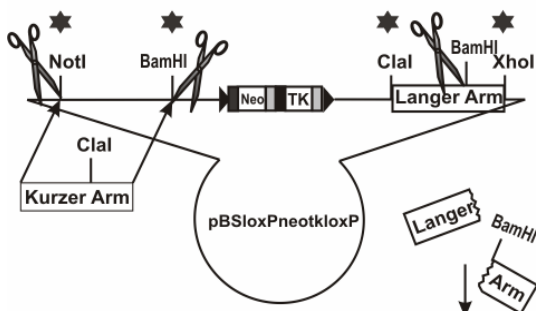
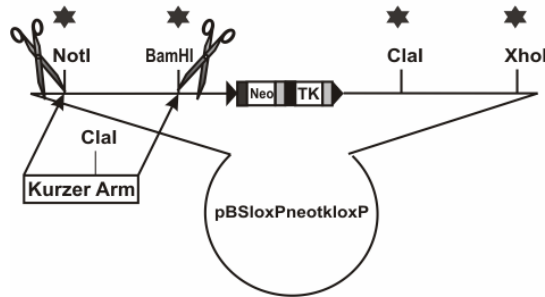


Abbildung 5-9 Klonierung des Vektors (2)

A

1. Öffnen des Vektors mit NotI und BamHI, Einfügen des kurzen Arms



2. Öffnen des Vektors mit ClaI und XhoI zum Einfügen des langen Arms. Hierbei würde der kurze Arm auch zerschnitten.

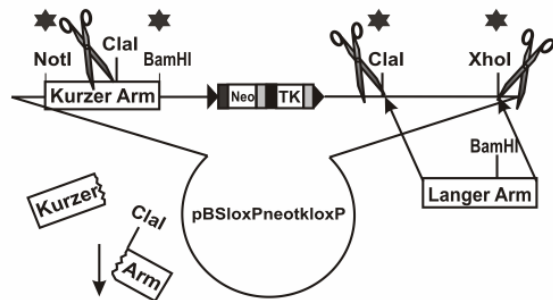


Abbildung 5-8 Klonierung des Vektors (1)

Eliminierung einer Schnittstelle wird ein Restriktionsenzym benötigt, das zwar eine andere Erkennungssequenz besitzt, aber dennoch den gleichen, kompatiblen Überhang erzeugt. Die kompatiblen Überhänge können ligiert werden, wobei eine neue Basensequenz entsteht, die (meist) von keinem der beiden Enzyme erkannt wird und an dieser Stelle nicht mehr geschnitten werden kann. Eine Liste von Enzymen, die kompatible Enden produzieren, findet sich im Produktkatalog der New England Biolabs.

Sowohl für BamHI, als auch ClaI finden sich derartige Enzyme. Da sich die

BamHI-Schnittstelle aber inmitten des langen Arms befindet, würde ihre Eliminierung mit zusätzlichen Klonierungsschritten verbunden sein. Die ClaI-Schnittstelle aber liegt ohnehin am Ende des kurzen Arms wo sie ohne weitere Klonierungen durch Rekombination mit einer NarI-Schnittstelle eliminiert werden könnte. NarI produziert den gleichen CG-Überhang wie ClaI und ist daher zur Eliminierung geeignet. Dazu bedarf es aber zusätzlich eines Hilfsvektors, der die benötigten Erkennungssequenzen in der richtigen Reihenfolge in seiner Klonierungsstelle enthält: NotI-NcoI-NarI-BamHI. Auch zur Klonierung des langen Armes sind verschiedene Hilfsvektoren nötig.

Im Folgenden wird die Vorgehensweise zur Herstellung von Hilfsvektoren und die Darstellung von kurzem und langem Arm und deren Zusammenfügen zum Gesamtkonstrukt beschrieben.

5.2.3 Klonierung des Targeting-Konstrukts

5.2.3.1 Cosmidbankscreening

Die für die Klonierung des Targeting-Konstruktes nötigen DNS-Fragmente sollten aus Cosmiden gewonnen werden. Als Cosmide werden zirkuläre, doppelsträngige DNS-Moleküle bezeichnet, die s.g. „*cos-sites*“ (*cohesive sites*) besitzen, über welche die Zyklisierung stattfindet. Im Unterschied zu Plasmiden können Cosmide allerdings DNS-Fragmente in der Größenordnung von 40- 50 kb aufnehmen. Daher eignen sie sich besonders gut, um genomische Banken zu erstellen. Eine Cosmid-Bank enthält das ganze Genom eines Organismus (z.B. Maus). Prinzipiell wird das Genom hierzu durch Restriktionsverdau in 40-50 kb große DNS-Fragmente zerlegt und diese Fragmente in Cosmid-Vektoren kloniert, so dass für jeden Abschnitt des Genoms theoretisch ein Cosmid-Klon vorliegt (Ish-Horowicz & Burke 1981). Ein Problem besteht allerdings darin, dass es bei Fragmenten dieser Größe schon innerhalb des Fragments selbst zu Rekombinationen kommen kann. Das *slo2.1*-Gen ist mit einer Größe von ca. 370 kb zu groß ist, um als Ganzes in der Cosmidbank vorzukommen. Daher sollten Klone identifiziert werden, welche zumindest die Porenregion beinhalten. Zu diesem Zweck wurde bei der Firma RZPD (Berlin) eine Cosmidbank bestellt (Cosmid-Bank Nr. 121, 129/ola). Diese wurde dann mit Hilfe einer PCR, in welcher mit den Primern *porex_fw* und *porex_rv* spezifisch die Porenregion amplifiziert wird, gescreent. Die Cosmid-Bank selbst besteht aus einer 96-Loch-Platte, wobei jede Vertiefung einen s.g. Primär-Pool beinhaltet, der wiederum aus acht vereinigten 96-Loch-Platten besteht (**Abbildung 5-10 A**). Jeder Primärpool

beherbergt also $8 \times 96 = 768$ Klone, so dass die gesamte Cosmidbank $768 \times 96 = 73728$ Klonen enthält und bei einer angenommenen Größe von 50 kb pro Cosmid dadurch das komplette Mausgenom mit seinen ca. 3 Milliarden Basenpaaren abgedeckt wird: $73728 \times 50000 \text{ bp} = 3,6 \times 10^9 \text{ bp}$. Durch PCR-Screening der Cosmidbank mit ihren Primär-Pools lässt sich also die Suche nach dem Klon, der die Pore enthält, schon weiter eingrenzen. Die Primärpools, die nach dem ersten Screen ein positives Ergebnis liefern, werden nach einem bestimmten System zu neuen, jetzt als Sekundär-Pools bezeichneten, 96-Lochplatten zusammengefügt (**Abbildung 5-10 B**): Je eine der acht Platten, die den Primär-Pool bilden, wird in eine Vertiefung einer neuen 96-Loch-Platte gegeben, so dass die erste Säule (1A-1H) belegt ist („Platten-Pool“). In die nächsten zwei Säulen (2A-3H) werden die „Reihen“ von je 4 Platten vereinigt (pro Platte gibt es acht Reihen (A-H), insgesamt also sechzehn Reihen; „Reihen-Pool“). Die folgenden drei Säulen (3A-6H) des neuen Pools werden durch die Säulen von wiederum jeweils 4 Platten belegt (pro Platte existieren 12 Säulen (1-12), insgesamt sind also 24 Vertiefungen belegt; „Säulen-Pool“).

Um den richtigen Klon zu identifizieren, müssen mit der PCR drei „Treffer“ im Sekundärpool gelandet werden: Der Treffer im Plattenpool bezeichnet die Platte auf, welcher der Klon zu finden ist, die zwei Treffer in Reihen- und Säulenpool zeigen die Koordinaten des gesuchten Klons (**Abbildung 5-10 C**). Durch dieses System lässt sich mit nur zwei PCR-Reaktionen der Klon, der das gewünschte Insert enthält, aus der Masse von über 70000 Klonen der Cosmid-Bank isolieren.

Es wurde mit der PCR ein positiver Primärpool auffindig gemacht, der zugehörige Sekundärpool angefordert, gescreent und letzten Endes ein Klon identifiziert, der den gewünschten DNS-Abschnitt beinhalten müsste.

Nun sollte das gesamte Porenfragment, ca. 11kb mit NcoI und XhoI aus dem Cosmid ausgeschnitten und, wegen der einfacheren Handhabung, in ein High-Copy-Plasmid (z.B. pBluescript) subkloniert werden. Damit wäre genügend Ausgangsmaterial für die nachfolgende Klonierung der homologen Arme vorhanden.

Nach mehreren vergeblichen Versuchen wurde das Cosmid mit geeigneten Primern für das 11 kb-Porenfragment sequenziert. Damit wurde überprüft, ob die gesuchte DNS-Sequenz und die erforderlichen Schnittstellen überhaupt vorhanden sind. Unglücklicherweise stellte sich heraus, dass nicht das komplette 11 kb-Fragment im Cosmid enthalten war. Der Bereich von BglII bis XhoI (großer Teil des langen Arms, Pore) war vorhanden, während der Rest von NcoI bis BglII (kurzer Arm, Teil des langen Arms) vermutlich durch Rekombination verloren war. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde die Strategie dahingehend geändert, dass die vorhandenen DNS-Fragmente aus dem Cosmid ausgeschnitten und in Hilfsvektoren subkloniert werden sollten, die fehlenden Teile jedoch über PCR erzeugt werden mussten.

Abbildung 5-10 Cosmid-Bank-Screening

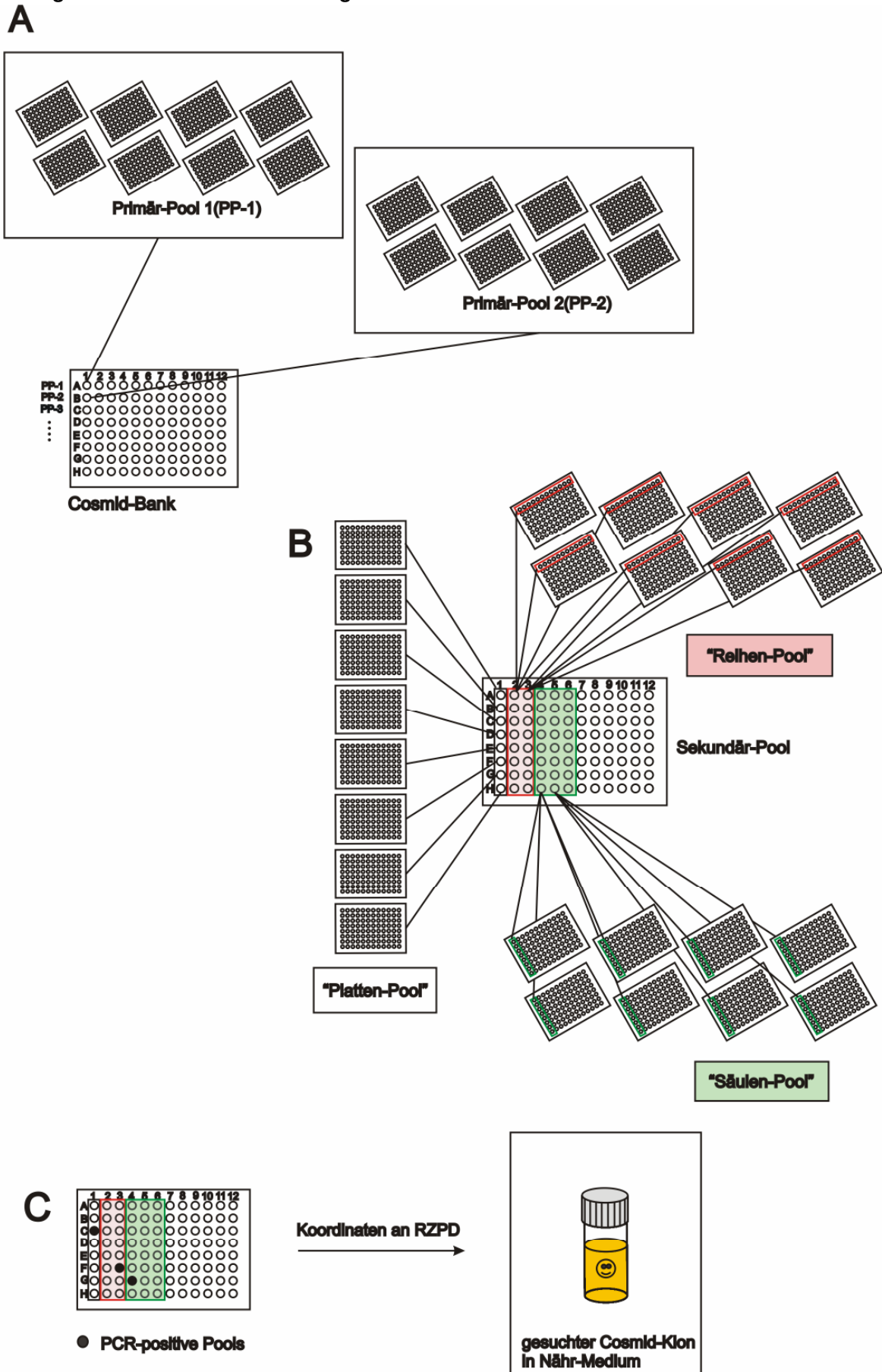


Abbildung erstellt nach www.rzpd.de Flash-Movie: "From Pools to Clones"

5.2.3.2 Klonierung des kurzen Arms (Erklärungen im Text)

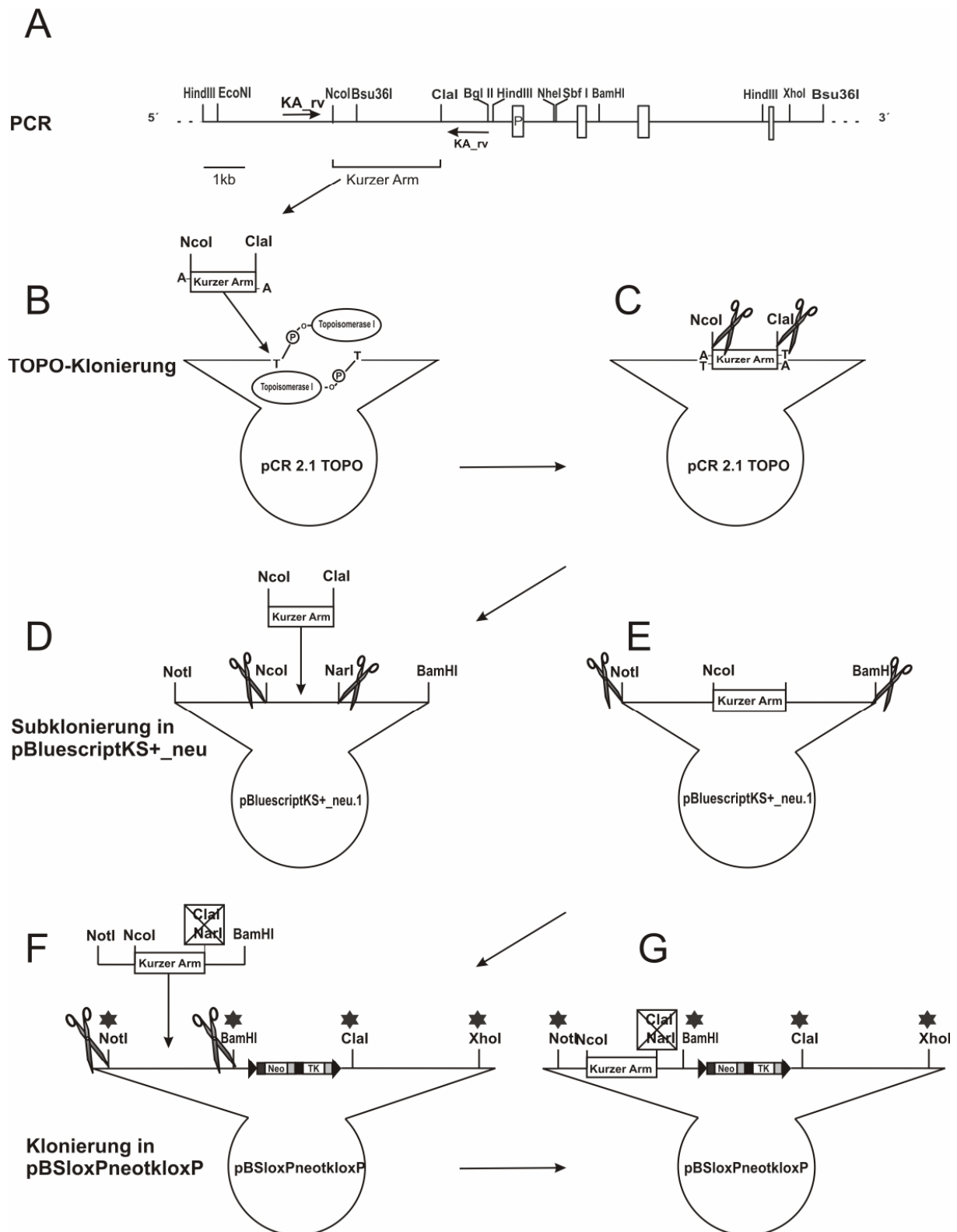


Abbildung 5-11 Kurzer Arm

Die Klonierung des kurzen Arms erfolgte in mehreren Schritten. Da er sich nicht im Cosmid befindet, muss er komplett mittels PCR erzeugt werden. Hierzu wurde das 2,6 kb Fragment mit dem Primerpaar KA-fw und KA-rv unter Verwendung der Taq-Polymerase amplifiziert **(A)**. Als Template diente isolierte Mausschwanz-DNS. Das Amplikon wurde anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt und mit seinem Adenosin-Überhang in den pCR 2.1 Topo-Vektor kloniert **(B)** (TOPO-TA Cloning-Kit, Invitrogen). Die isolierten Plasmide verschiedener Bakterienklone mussten daraufhin zur Überprüfung der korrekten Amplifizierung in voller Länge sequenziert werden. Die Sequenzen mehrerer unabhängiger Klone zeigten im Vergleich mit der Datenbank zwei Basenaustausche. Da die Sequenzen der verschiedenen Klone untereinander identisch waren und die Datenbank in dieser Region selbst viele N-Stellen aufweist, wurde einer dieser Klone weiterverwendet. Der kurze Arm wurde dann mit NcoI und ClaI aus dem Topo-Vektor ausgeschnitten **(C)**, in einen Hilfsvektor, pBluescriptKS+_neu.1 mit richtiger Schnittstellenfolge subkloniert **(D)**, von dort mit NotI und BamHI herausgenommen **(E)** und in den geöffneten pBSloxPneotkloxP eingebracht **(F,G)**.

Hilfsvektor pBluescriptKS+_neu.1

Zur Generierung eines Hilfsvektors muss die Klonierungsstelle des Wildtyp-Vektors gegen eine neue mit passender Schnittstellenabfolge ausgetauscht werden. Zu diesem Zweck werden zwei Oligonukleotide entworfen, welche die gewünschten Schnittstellen in 5'-3'-Richtung und 3'-5'-Richtung beinhalten. Zwischen die einzelnen Erkennungssequenzen werden vier bis sechs Basen als Abstandhalter („spacer“) eingebaut, um die Schnitteffizienz der einzelnen Enzyme nicht zu beeinträchtigen. Am Ende des Oligonukleotids befinden sich die nötigen Überhänge, um die neue Klonierungsstelle in den geöffneten Wildtyp-Vektor einzubringen. Äquimolare Mengen der beiden Oligonukleotide werden zunächst auf 90° C erhitzt, wobei diese linearisieren, und anschließend schrittweise auf Raumtemperatur abgekühlt. Hierbei lagern sich die komplementären Fragmente zu einem Doppelstrang zusammen. Dieser kann direkt in den Vektor ligiert werden und das neu entstandene Plasmid zur Vermehrung in Bakterien transformiert werden.

Der Hilfsvektor pBluescriptKS+_neu.1 beruht auf pBluescriptKS+ in dessen Klonierungsstelle der Adapter aus den Oligonukleotiden pBSKS+_fw.1/ pBSKS+_rv.1 eingefügt wurde:

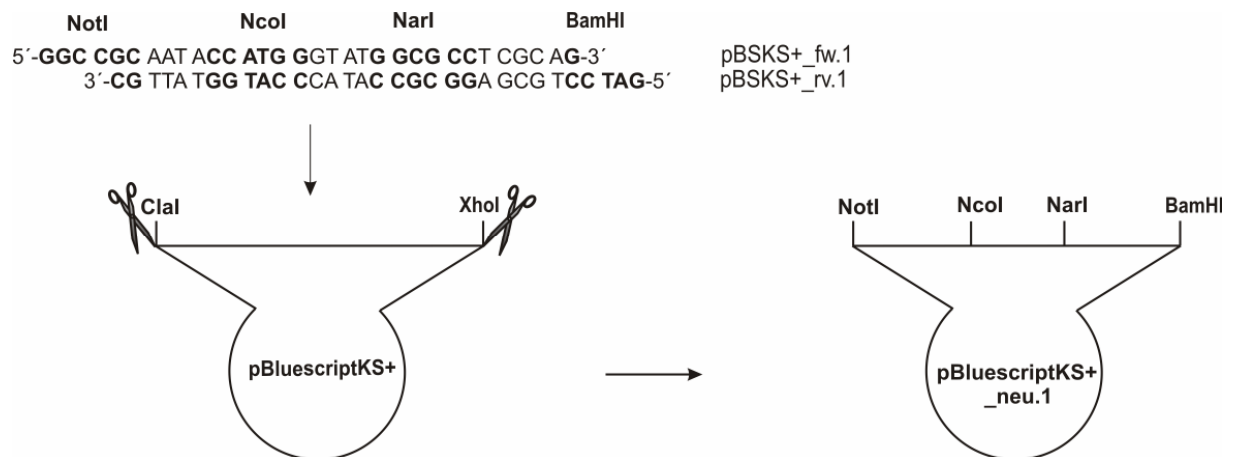
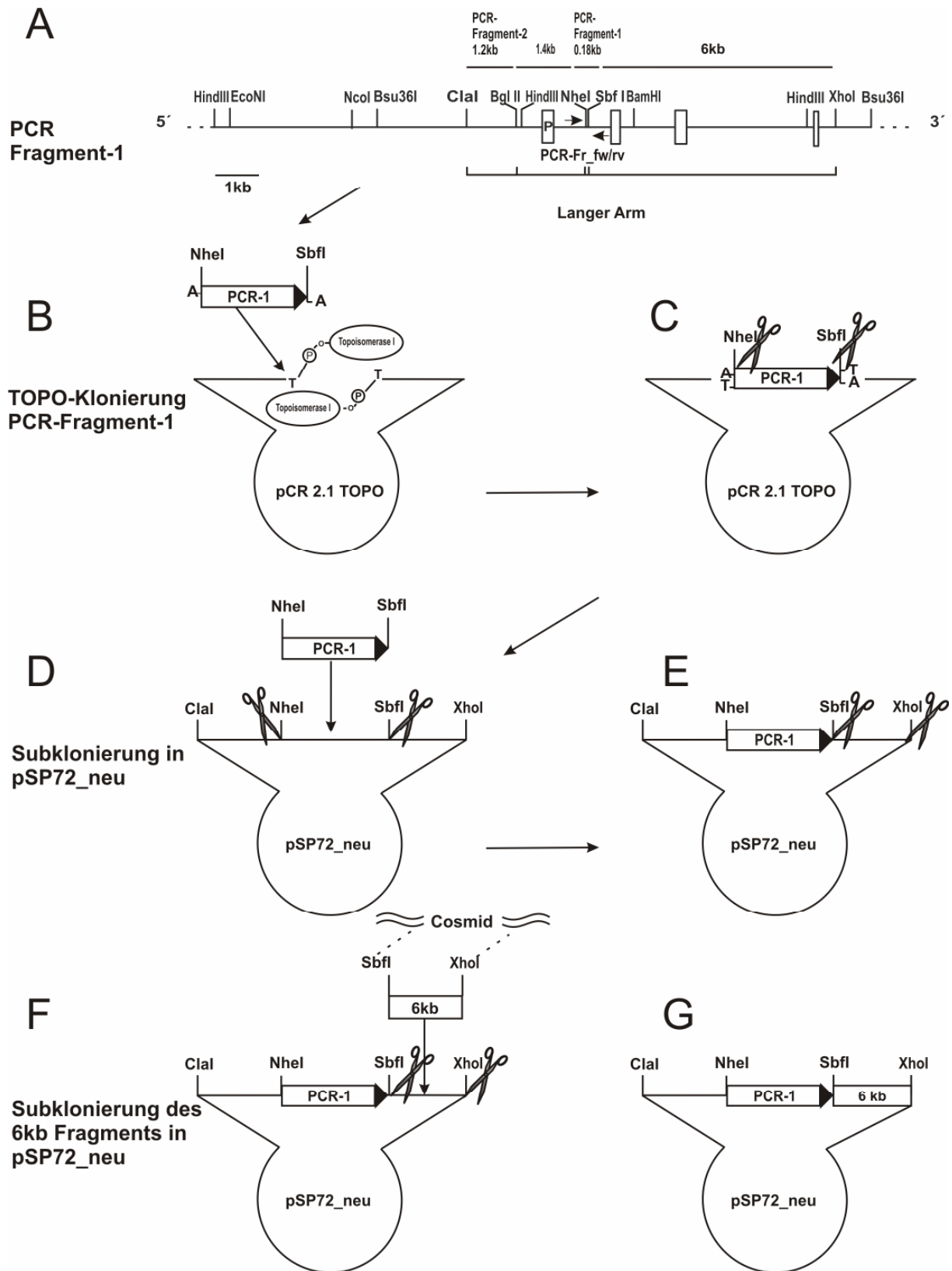


Abbildung 5-12 Hilfsvektor pBluescript KS+_neu.1

Der Hilfsvektor wurde nun mit NcoI und NarI geöffnet und der kurze Arm, der mit NcoI und Clal ausgeschnitten worden war, konnte jetzt in den Hilfsvektor eingefügt werden. Aus den kompatiblen Überhängen von Clal und NarI entsteht eine neue Basenabfolge, die weder von Clal, noch von NarI wiedererkannt wird. Somit konnte die für weitere Klonierungsschritte störende Clal-Erkennungssequenz aus dem kurzen Arm entfernt werden. Dieser wurde jetzt mit den Enzymen NotI und BamHI aus dem Hilfsvektor ausgeschnitten, durch Elution aus dem Gel aufgereinigt und in den offenen pBSloxPneotkloxP ligiert.

5.2.3.3 Klonierung des Langen Arms (Erklärung im Text)



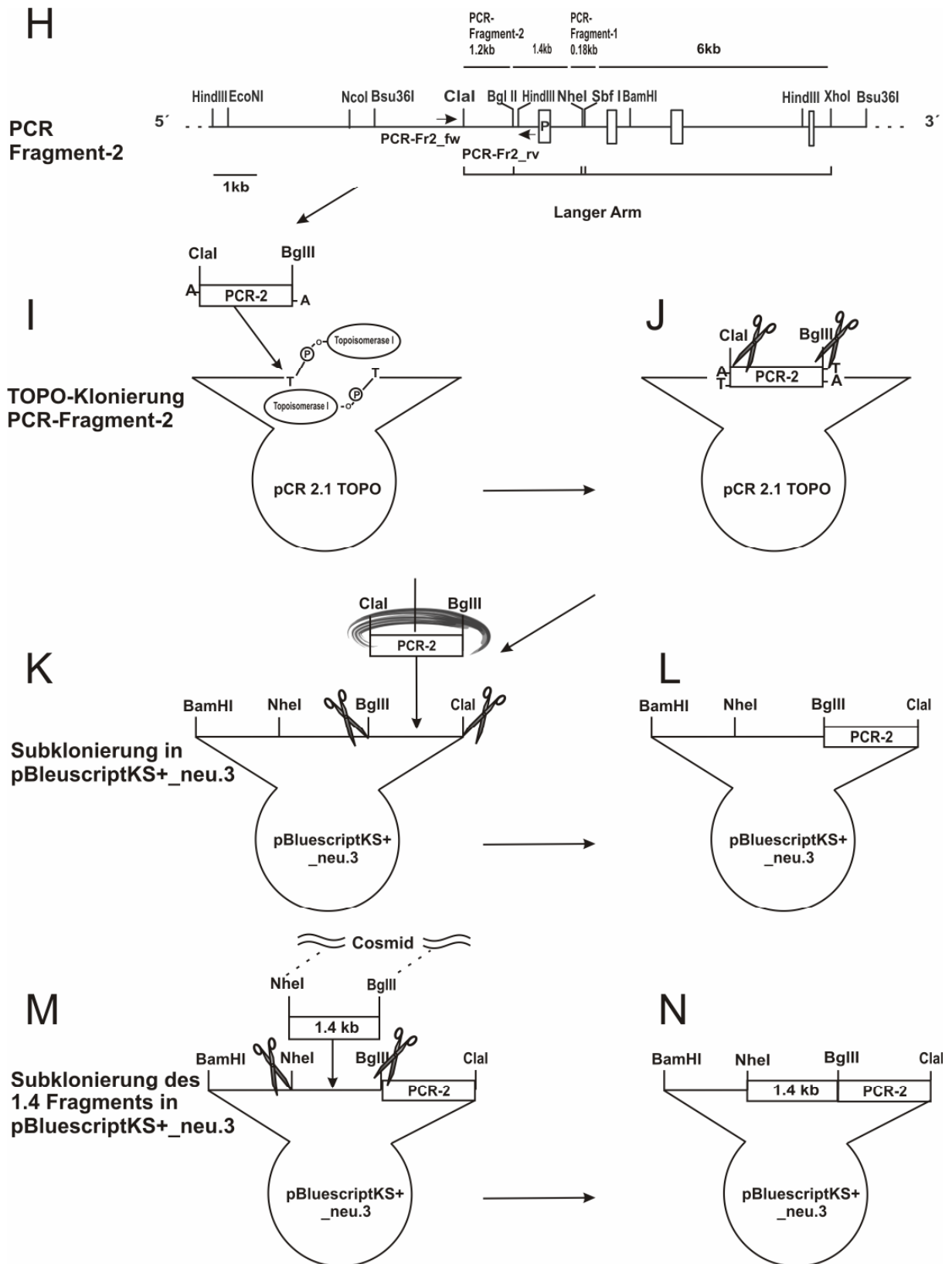


Abbildung 5-14 Klonierung des langen Arms (2)

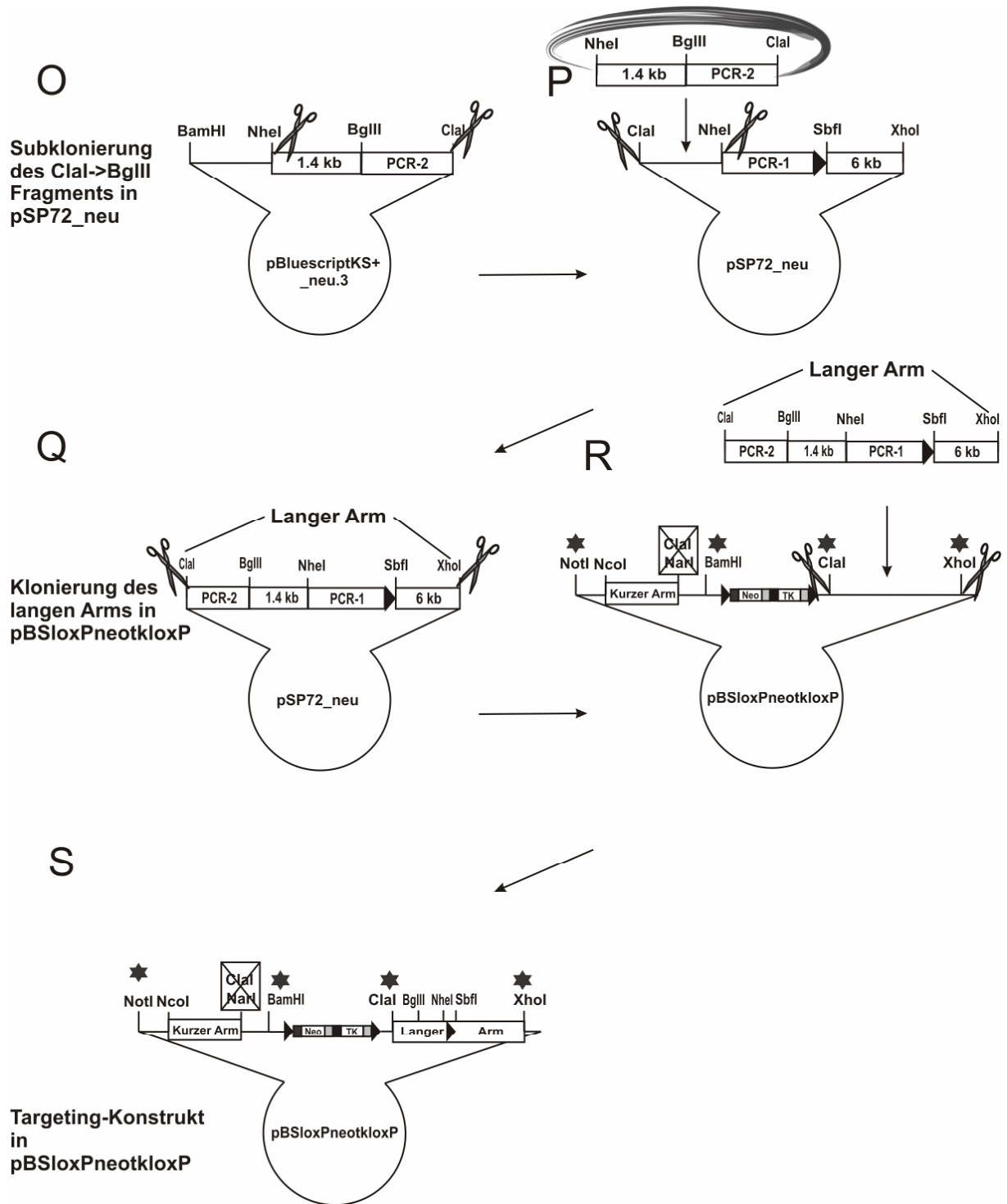


Abbildung 5-15 Klonierung des langen Arms (3)

Die Darstellung des langen Armes gestaltete sich deshalb schwieriger, weil er aus vier Teilen besteht, die nacheinander in mehreren Klonierungsschritten zum Gesamtfragment zusammengefügt werden mussten. Zwei DNS-Fragmente konnten aus dem Cosmid isoliert werden, die beiden anderen mussten mit PCR erzeugt werden. Weiterhin wurden zwei Hilfsvektoren, pSP72_neu und pBluescriptKS+_neu.2 zur Subklonierung verschiedener Klonierungszwischenstufen benötigt.

Zunächst wurde das PCR-Fragment generiert, welches die singuläre LoxP-Sequenz und die Erkennungssequenz für das Enzym Bsu36I enthält, mit welcher später das Rekombinationsereignis am 3'-Ende nachgewiesen werden sollte **(A)**. Die Amplifizierung erfolgte mit dem Primerpaar PCR-Fr_fw/ PCR-Fr_rv. Der Rückwärtsprimer wurde hierbei so entworfen, dass er einen Überhang besitzt, der die LoxP-Sequenz, die Bsu36I- und die SbfI-Erkennungssequenz besitzt. Wichtig ist es, darauf zu achten, dass die LoxP-Sequenz die richtige Orientierung aufweist, da es sonst nicht zur Exzision, sondern zur Inversion des entsprechenden Fragments kommt.

PCR-Fragment

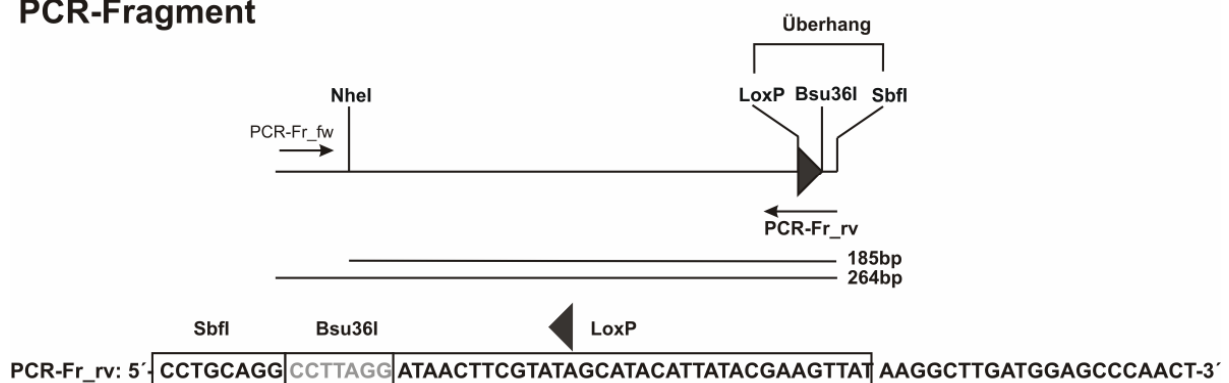


Abbildung 5-16 Darstellung des PCR-Fragments

Das PCR-Fragment (NheI→SbfI, 185 bp) wurde über Gelelektrophorese aufgereinigt, in den pCR2.1 TOPO-Vektor subkloniert **(B)**, sequenziert und von dort mit NheI und SbfI wieder ausgeschnitten **(C)**. Jetzt konnte das PCR-Fragment in den geöffneten Hilfsvektor pSP72_neu.2 kloniert werden **(D, E)**.

Hilfsvektor pSP72_neu.2

Der Hilfsvektor pSP72_neu.2 basiert auf einem pSP-72_Vektor, in dessen Klonierungsstelle der Adapter aus den Oligonukleotiden pSP72_fw/ pSP72_rv eingefügt wurde.

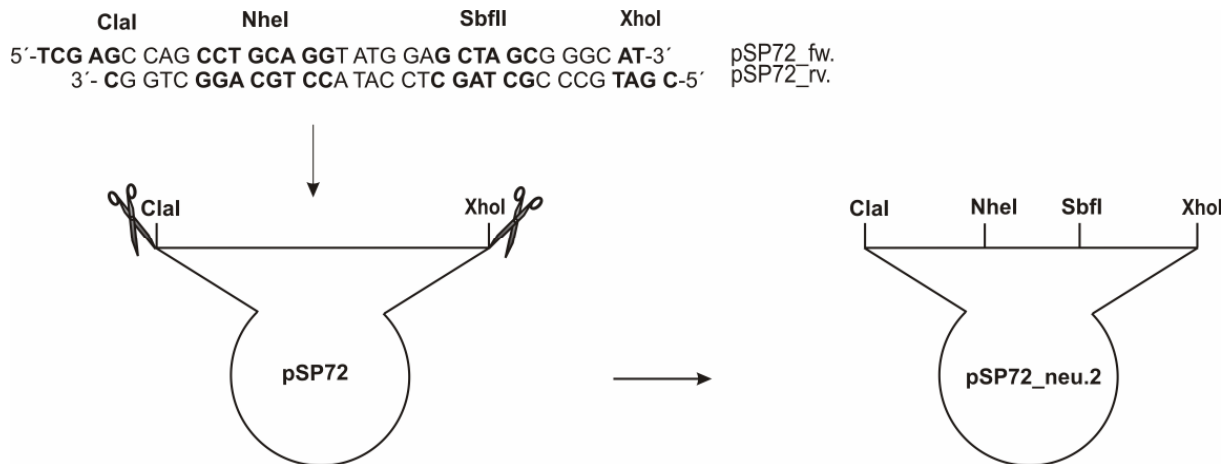


Abbildung 5-17 Hilfsvektor pSP72_neu.2

Das 6 kb-Fragment, welches sich von SbfI bis XhoI erstreckt, wurde direkt aus dem Cosmid ausgeschnitten, aufgereinigt und in pSP72_neu.2, der schon das PCR-Fragment enthält, hineinkloniert (**F, G**).

In einem weiteren Schritt sollte jetzt das zweite PCR-Fragment, welches den Bereich von Clal bis BglII abdeckt, der ja auf dem Cosmid ebenfalls nicht mehr vorhanden war, erzeugt werden. Hierzu wurden das Primerpaar PCR-Fr.2_fw/ PCR-Fr.2_rv und Mausschwanz-DNS verwendet. Das Fragment wurde mit Hilfe der Taq-Polymerase erzeugt, aufgereinigt und pCR2.1 TOPO kloniert (**H, I**). Von dort sollte das per Sequenzanalyse überprüfte Stück mit Clal und BglII wieder ausgeschnitten und in den geöffneten Hilfsvektor pBluescriptKS+_neu.3 eingebracht werden. Problematisch hierbei erwies sich die Clal-Erkennungssequenz ATCGAT, welche potentiell ein Signal zur dam-Methylierung aufweist (GATC). Folgt auf die Erkennungssequenz also ein weiteres C, wird das G innerhalb der Schnittstelle vom bakterieneigenen Enzym Dam-Methylase methyliert und kann nicht mehr geschnitten werden. Die native Clal-Stelle am 5'-Ende des Fragments lautetATCGATC... und beinhaltet folglich das Methylierungssignal. Da ein direktes Ausschneiden mit BglII und Clal nun nicht möglich war, musste das isolierte Plasmid zunächst in einen Bakterienstamm, der die Dam-Methylase nicht exprimiert, zurücktransformiert werden. Beim *E.coli*-Stamm SCS-110 handelt es sich um eine derartige dam-negative Zelllinie. Nach Rücktransformation und erneuter Plasmidisolierung konnte das zweite PCR Fragment (Clal→BglII, 1,4 kb) wie gewünscht mit Clal und BglII ausgeschnitten (**J**), gereinigt und in den Hilfsvektor pBluescriptKS+_neu.3 eingefügt werden (**K, L**).

Hilfsvektor pBluescriptKS+_neu.3

Der Hilfsvektor pBluescriptKS+_neu.3 beruht wieder auf dem pBluescriptKS+ Grundgerüst. Die neue Klonierungsstelle trägt folgende Erkennungssequenzen und wurde aus den Oligonukleotiden pBSKS+_fw.3/ pBSKS+_rv.3 erstellt:

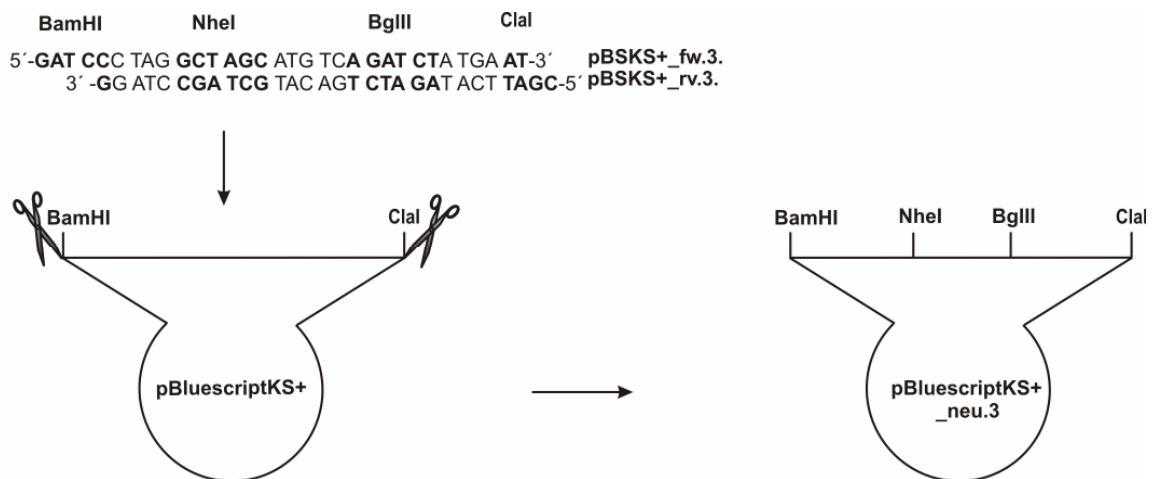


Abbildung 5-18 Hilfsvektor pBluescriptKS+_neu.3

Der Abschnitt des langen Armes, der das Porenexon enthält und von BglII bis NheI reicht, konnte wiederum direkt mit den beiden Enzymen aus dem Cosmid ausgeschnitten werden. Nach Gelaufreinigung wurde das 1,2 kb große Fragment in den Hilfsvektor pBluescriptKS+_neu.3, der schon das zweite PCR-Fragment (ClaI→BglII, 1,4 kb) enthält, eingebracht (**M, N**). Um aus diesem Hilfsvektor das zusammenhängende Fragment ClaI→NheI von 2,6 kb Länge, mit ClaI und NheI ausschneiden zu können, musste das Plasmid zunächst wieder in die dam-negativen Zellen zurücktransformiert werden. Eine direkte Transformation des Ligationsansatzes in SCS110-Zellen war nicht möglich, da diese Zellen im Vergleich zu XL-Gold-Zellen eine um den Faktor 10^3 geringere Transformationseffizienz aufweisen. Jetzt konnte das Plasmid isoliert, mit ClaI und NheI geschnitten, gereinigt und in den geöffneten Hilfsvektor pSP72_neu liegert werden (**O, P**). In diesem befinden sich bereits die anderen Teile des langen Arms. Somit ist der gesamte lange Arm (ClaI→XhoI, 8,8 kb) in pSP72_neu subkloniert. Der lange Arm wurde nun mit den Enzymen ClaI und XhoI aus dem Hilfsvektor ausgeschnitten (**Q**), über Gelelektrophorese gereinigt und in den über diese Schnittstellen geöffneten pBSloxPneotkloxP, der schon den kurzen Arm (NcoI→ClaI, 2,5 kb) enthält, ligiert werden (**R**).

Damit war das Targeting-Konstrukt fertiggestellt (**S**) und wurde zur nochmaligen Überprüfung sequenziert.

5.2.4 Nachweis der homologen Rekombination

5.2.4.1 Southern-Nachweis

Diejenigen Stammzellen, welche das Targeting-Konstrukt über homologe Rekombination an der richtigen Stelle integriert haben, müssen von denen, die nicht, bzw. an der falschen Stelle, rekombiniert haben, zu unterscheiden sein. Hierfür eignet sich der Southern-Blot, mit dem es möglich ist, ein DNS-Fragment von bestimmter Größe in der Masse von genomischer DNS mit einer radioaktiv markierten Sonde aufzuspüren. Der Southern-Blot (siehe 4.3.11) ist eine Methode, die es erlaubt, in kurzer Zeit eine große Anzahl von Zellen zu überprüfen („Massen-Screen“).

Der Nachweis beruht darauf, dass durch Restriktionsverdau von Wildtyp ES-Zell-DNS mit einem Enzym ein Fragment bestimmter Größe entsteht. Durch das Targeting-Konstrukt werden zusätzliche Restriktionssequenzen an den Genort gebracht, so dass bei richtiger Integration eine Verkürzung oder Verlängerung des Fragments auftritt, was dann im Southern-Blot nachzuweisen ist.

Bei der Auswahl der Schnittstellen und der Sonden sind verschiedene Punkte zu beachten. Die durch Restriktionsverdau entstehenden Fragmente von Wildtyp und Mutante sollten so gewählt werden, dass sie durch Agarosegelelektrophorese gut getrennt und unterschieden werden können. Ein Längenunterschied von 1-2 kb bei Fragmenten der Größenordnung <12 kb kann im 0,7 %igen Gel in angemessener Laufzeit und Auflösung getrennt werden. Zu lange Laufzeiten und Laufstrecken beeinträchtigen die schnelle Anwendbarkeit der Methode und erschweren die Handhabung. Von den Schnittstellen muss eine außerhalb, die andere innerhalb des rekombinanten Bereichs liegen, da nur so eine Aussage getroffen werden kann, ob eine Integration an der richtigen Stelle stattgefunden hat. Theoretisch könnte bei falscher Integration zufällig ein Fragment gleicher Größe entstehen. Dieses Ereignis wird aber, statistisch gesehen, ausgeschlossen. Auch die Sonden müssen außerhalb des rekombinanten Bereichs liegen, da interne Sonden immer, auch bei zufälliger Integration des Konstrukts, ein Signal liefern. Dies führt zu vielerlei unspezifischen Signalen und erhöht die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse. Die Sonden sind 100-1000 bp große DNS-Stücke, die möglichst spezifisch für das zu detektierende Fragment sein müssen. Weiterhin kann es vorkommen, dass das Targetingkonstrukt nur in „Einzelteilen“ integriert. Darum muss die korrekte Insertion sowohl am 5´-, als auch am 3´-Ende überprüft werden. Eine Sonde, die spezifisch die NeoTK-Selektionskassette detektiert, soll zeigen, dass diese nur einmal im Genom, an der richtigen Stelle vorkommt. Nur Stammzellen, die alle drei Kriterien erfüllen, werden für die Balstozysteninjektion herangezogen.

5.2.4.2 Sonde für den 5'-Nachweis

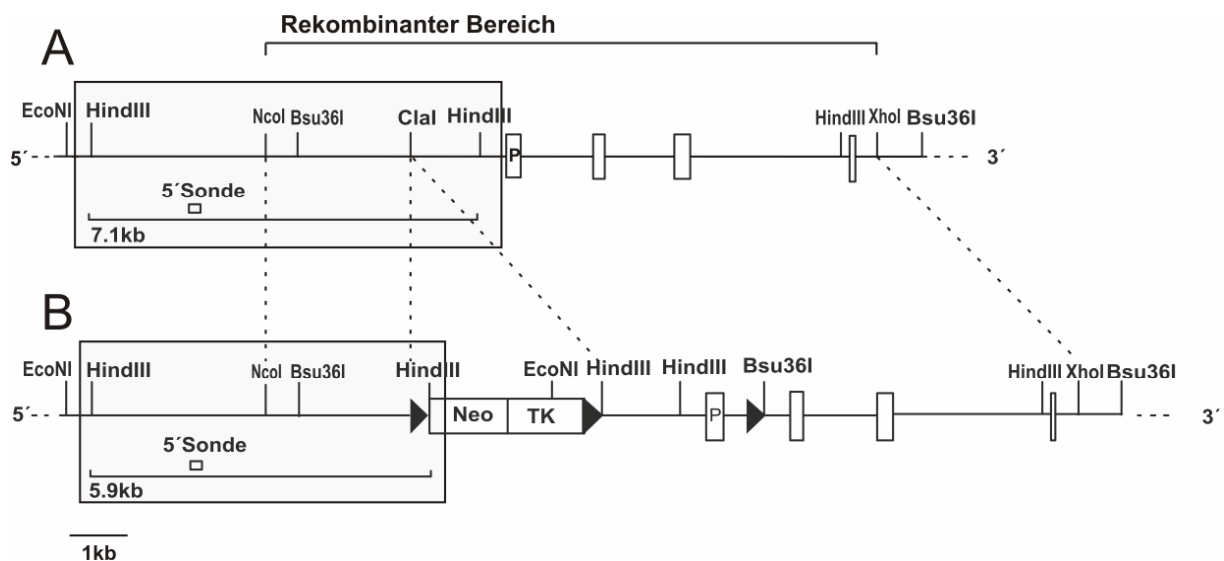


Abbildung 5-19 Strategie für Nachweis der 5'-Rekombination

Für den Restriktionsverdau zum Nachweis auf der 5'-Seite wurde HindIII ausgewählt. Mit HindIII ergibt sich für den WT ein Fragment der Länge 7,1 kb (**A**). Die entsprechende Sonde liegt zwischen der HindIII-Schnittstelle und dem rekombinanten Bereich, der mit NcoI beginnt. Durch die Einführung der NeoTK-Selektionskassette kommt eine neue HindIII-Erkennungssequenz hinzu. Das mit der ausgesuchten Sonde detektierte Fragment wird nach erfolgter Rekombination auf 5,9 kb verkürzt (**B**).

Herstellung der Sonde und Test an WT-DNS

Bei der Sonde handelt es sich um ein 200 bp großes Fragment, das nach Spezifität und Einzigartigkeit zunächst am Computer ausgewählt wurde (BLAST auf www.ensembl.org, www.repeatmasker.org). Entsprechend wurde die Sonde durch PCR mit dem Primerpaar 5'Probe2_fw/rv und Taq-Polymerase an Mausschwanz-DNS erzeugt, in TOPO kloniert und sequenziert. Für die Southern-Hybridisierung wurde die Sonde dann mit EcoRI aus dem TOPO-Vektor ausgeschnitten und über Gelelektrophorese gereinigt. Die Markierung erfolgte wie unter 4.3.11.2 beschrieben. Zum Test der Sonden-Spezifität wurden ca. 7 µg Wildtyp ES-Zell-DNS mit HindIII (50 U) verdaut und geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit der markierten 5'-Sonde und sollte das WT-Fragment von 7,1 kb liefern.

Wildtyp-ES-Zell-DNS
HindIII-Verdau

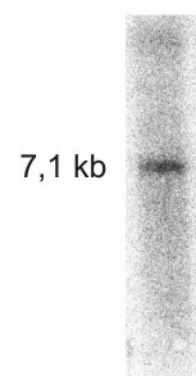


Abbildung 5-20 Testung der 5'-Sonde

5.2.4.3 Sonde für den 3'-Nachweis

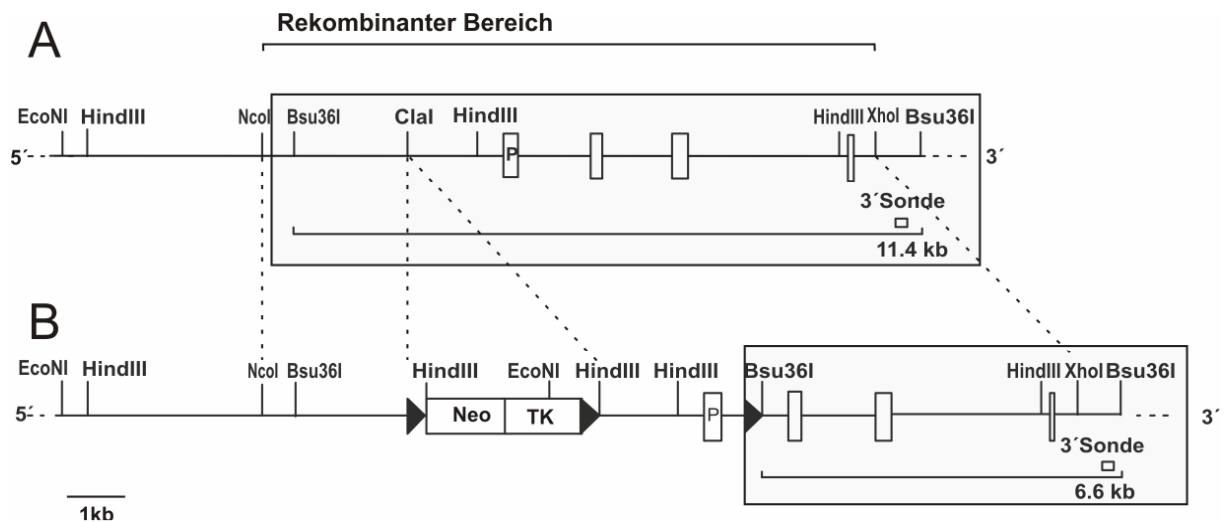


Abbildung 5-21 Strategie zum Nachweis der 3'-Rekombination

Der Nachweis auf der 3'-Seite sollte nach Restriktionsverdau mit Bsu36I durchgeführt werden. Auch hier liegt die Sonde außerhalb des rekombinanten Bereichs und liefert für den Wildtyp ein Fragment der Größe 11,4 kb (A). Durch die zusätzliche, zusammen mit der dritten LoxP-Sequenz eingeführte Bsu36I Erkennungsstelle verkürzt sich das Fragment nach erfolgreicher Rekombination auf 6,6 kb (B).

Herstellung der Sonde und Test an WT-DNS

Bei der 3'-Sonde handelt es sich um ein 86 bp Fragment, das mit dem Primerpaar 3'Probe2_fw/rv wie unter 5.2.4.2 beschrieben erzeugt wurde. Die Sonde ist sehr kurz, da der Bereich zwischen XhoI (Rekombinanter Bereich) und Bsu36I an sich nur 600 bp groß ist, wovon wiederum ein großer Teil sehr viele repetitive Basenfolgen beinhaltet.

Zum Test wurden ebenfalls ca. 7 µg Wildtyp-ES-Zell-DNS mit 50 U Bsu36I über Nacht verdaut, elektrophoriert und gebロットet. Nach Hybridisierung zeigte sich das gewünschte WT-Fragment von 11,4 kb.

Wildtyp-ES-Zell-DNS
Bsu36I-Verdau

11,4 kb



3'-Sonde

Abbildung 5-22 Testung der 3'-Sonde

5.2.4.4 Neo-Sonde

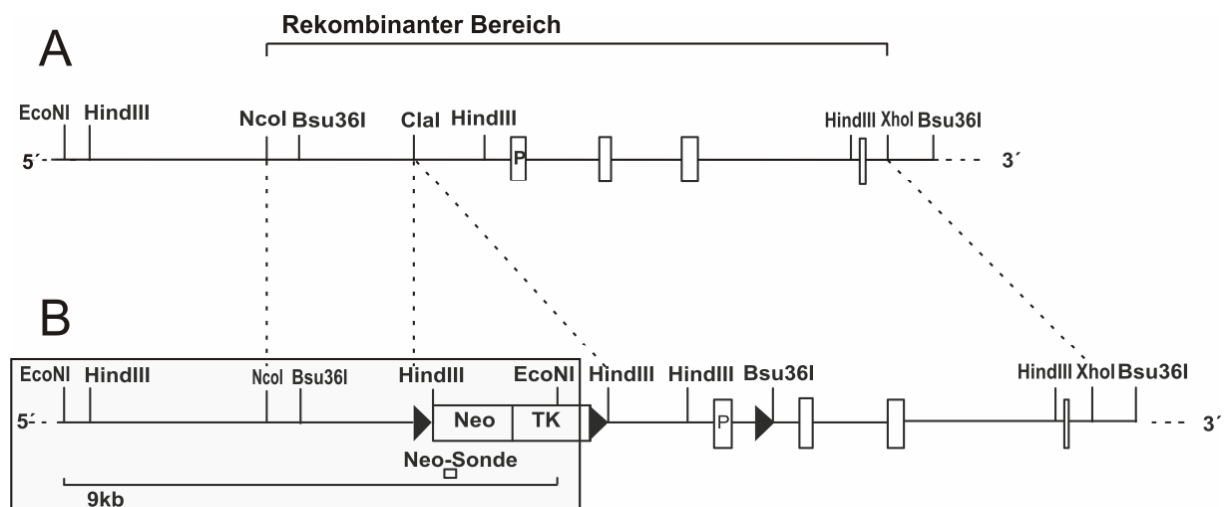


Abbildung 5-23 Strategie zum Nachweis der Einfachintegration

Zum Nachweis dafür, dass die NeoTK-Selektionskassette nur einmal und an der richtigen Stelle ins Genom integriert hat, wurde ein 600 bp Fragment, welches sich im Anfangsbereich der Selektionskassette befindet, generiert. Die DNS soll mit EcoNI verdaut werden. Da im Wildtyp ursprünglich keine Neomycin-Resistenz vorkommt, darf mit der Neo-Sonde kein Signal mit Wildtyp-ES-Zell-DNS zu sehen sein (**A**).

Nach erfolgter Rekombination ergibt sich durch Verdau mit EcoNI ein 9 kb-Fragment, was mit der Neo-Sonde detektiert wird (**B**).

Es darf auch nur ein einziges Signal zu sehen sein, weil ansonsten angenommen werden muss, dass das Targeting-Konstrukt, bzw. die isolierte Selektionskassette zusätzlich noch an anderer Stelle integriert wurde. Wäre dies der Fall, kann durch die zufällige Integration ein weiteres Gen zerstört oder zumindest beeinflusst werden, so dass diese Zellen nicht für die Blastozysten-Injektion herangezogen werden dürfen. Mäuse, die aus solchen Zellen entstünden, würden einen nicht zuzuordnenden Phänotyp aufweisen.

Die Neo-Sonde konnte insofern nicht vorab getestet werden, da im Wildtyp kein Signal zu erwarten ist.

Für den „Massen-Screen“ nach dem ersten Targeting ist die 5'-Sonde vorgesehen. HindIII ist, verglichen mit Bsu36I, ein preiswertes, gut charakterisiertes Enzym, das zusätzlich in hochkonzentrierter Form (50U/ μ L) erhältlich ist, so dass die Glycerolkonzentration im Restriktionsansatz gering gehalten werden kann. Nur Stammzellen, die mit der 5'-Sonde positive Signale liefern, werden auch mit 3'-und Neo-Sonde überprüft. Für das zweite Targeting werden nur Zellen eingesetzt, die mit allen drei Sonden positiv sind.

5.3 Targeting von *slo2.1*

5.3.1 Das 1. Targeting

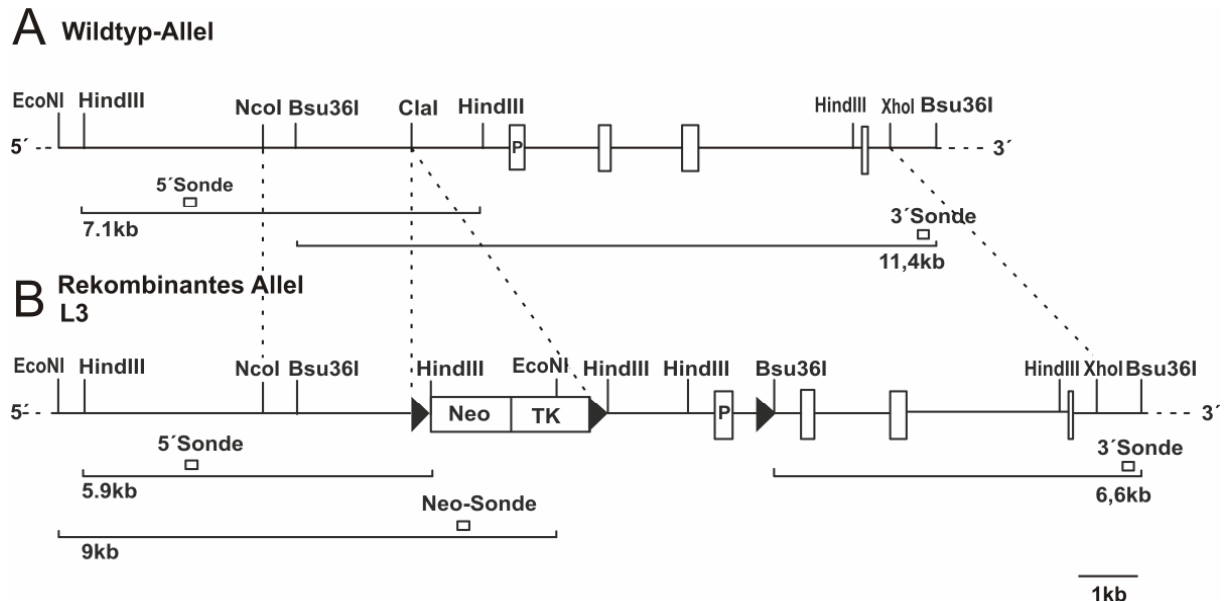


Abbildung 5-24 Homologe Rekombination des Targetingkonstruktes

Im ersten Targeting werden die Stammzellen mit dem Targeting-Konstrukt transfiziert. Erwartet wird homologe Rekombination, was zu mutierten Zellen führen soll, die am Gen-Locus drei LoxP-Sequenzen (L3) tragen. Die Vorbereitungen zum ersten Targeting, sowie das Targeting selbst wurden wie unter 4.3.15.4 beschrieben durchgeführt. Hierzu wurden 75 µg des zuvor mit XhoI linearisierten Targeting-Vektors zur Elektroporation (4.3.15.4, Elektroporation) eingesetzt. XhoI ist zur Linearisierung geeignet, da es sich hierbei um eine Schnittstelle handelt, die nur ein einziges Mal, am Ende des langen Arms, im Konstrukt vorkommt. Am Tag nach der Elektroporation wurde mit der G418-Selektion begonnen, und die überlebenden Zellklone unter der Sterilbank nach Vorschrift (4.3.15.4, Picken) gepickt. Die DNS von gelb bzw. rot evaluierten (4.3.15.4, Evaluation) Zellen wurde HindIII verdaut und mit der 5'-Sonde hybridisiert. „Grüne“ Klone liefern in der Regel zu wenig DNS für den Southern-Blot und werden daher nicht verwendet. Nur 5'-positive Zellklone wurden mit 3'- und Neo-Sonde weiterüberprüft und für ein eventuelles zweites Targeting vorbereitet. Insgesamt wurde das erste Targeting viermal durchgeführt, wobei aus den ersten Versuchen keine rekombinanten Stammzellklone hervorgingen.

Nachdem die anfänglichen Blastozysteninjektionen mit Zellen, die aus Targeting Nummer 3 hervorgegangen waren, erfolglos blieben, wurde parallel zu den Injektionen ein weiteres Targeting (Nummer 4) durchgeführt.

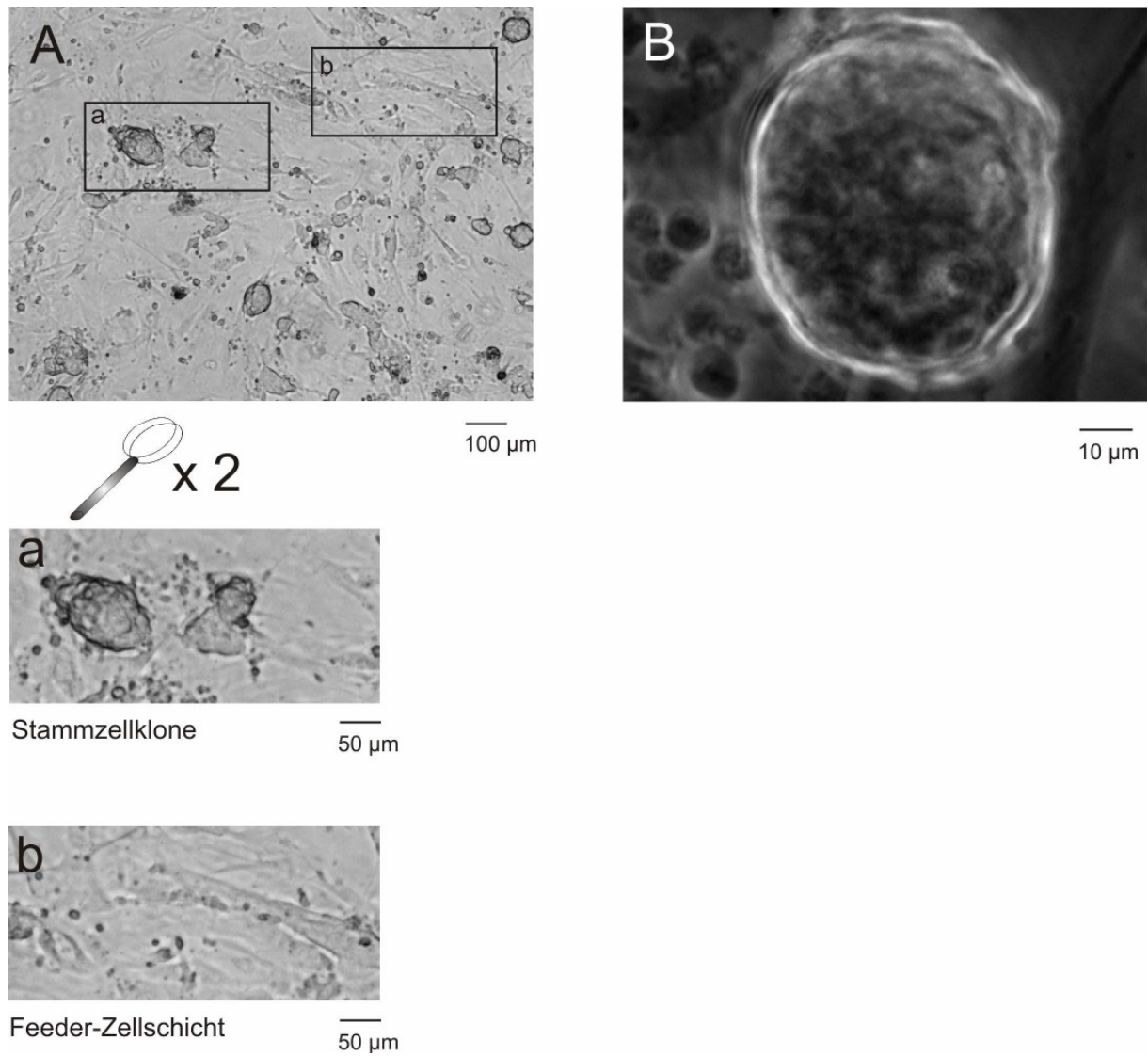


Abbildung 5-25 ES-Zellen auf Feederzellrasen

- (A) Stammzellen auf einer Schicht von Fibroblastenzellen (Feederzellen).
- (B) Einzelner Stammzellklon in Vergrößerung. Auffällig die runde Form, die von einem leuchtenden Rand umgeben ist. ES-Zellen dieser Morphologie befinden sich noch im undifferenzierten Zustand und können gepickt werden.

Tabelle 5-1 Ergebnisse des 1. Targetings

1. Targeting							
Targeting Nummer	Zellzahl/ Zeitkonstante	Gepickte Klone	Gelbe bzw rote Zellen	Rekombinante Klone	5'-Sonde positiv	3'-Sonde positiv	Neo-Sonde positiv
1	2,8x10(7)/8,4	100	36	0	0	0	0
2	3,5x10(7)/9,9	360	46	0	0	0	0
3	3x10(7)/8,4	1248	770	12	12	2	1
4	1,7x 10(7)/7,1	1214	751	3	3	0	0

Wie Tabelle 5-1 zeigt, waren von den 1248 gepickten Klonen nur 12 Stück mit der 5'-Sonde positiv. Bei einer Überprüfung dieser Klone mit der 3'-Sonde zeigten zwei davon ein deutlich positives Signal im Southern Blot. Nach weiterer Überprüfung mit Hilfe der der Neo Sonde blieb letztendlich ein einziger Klon übrig, der für alle drei Sonden positiv war.

Aus 1248 gepickten ES-Zellklonen resultierte einer der für das zweite Targeting herangezogen werden konnte. Das entspricht einer Ausbeute von 0,8 Promille.

5.3.1.1 Nachweis mit der 5'-Sonde (Massenscreen)

Für die Hybridisierung mit der 5'-Sonde wurde die DNS der gepickten ES-Zellen wie unter 4.3.2.1 beschrieben isoliert, mit HindIII verdaut, elektrophoriert, geblottet (4.3.11.1) und mit der 5'-Sonde hybridisiert (4.3.11.2). Nach der Detektion konnten 12 Klone ausfindig gemacht werden, bei denen die gewünschten Fragmente von 7,1 kb für das Wildtyp Allel und 5,9 kb für das L3-Allel vorhanden waren. Es müssen beide Banden vorhanden sein, da eine homologe Rekombination des Konstruktes auf beiden Allelen als nahezu unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Die Abbildung 5-27 zeigt beispielhaft zwei Spuren des Massenscreens in dem ein rekombinanter L3-Klon und ein reiner Wildtyp nebeneinander vorliegen.

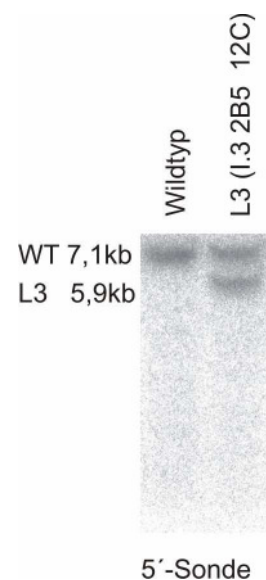


Abbildung 5-26
Screen mit der 5-Sonde

Bezeichnung der Klone

I.3 2A5 12C= 1. Targeting, zum 3. Mal, 5.A-Platte von an Tag 2 gepickten Klonen, Koordinate 12C auf 96-well

Nachweis mit 3'- und Neo-Sonde

Nur die zwölf Klone, die nach dem Massenscreen mit der 5'-Sonde positiv waren, wurden mit der 3'-Sonde und der Neo-Sonde überprüft. Die DNS der entsprechenden ES-Zellen wurde aufgearbeitet (4.3.2.1), mit Bsu36I (3'-Sonde) bzw. EcoNI (Neo-Sonde) verdaut, elektrophoriert, geblottet (4.3.11.1) und mit den Sonden hybridisiert (4.3.11.2).

Für den 3'-Nachweis wurde eine Bande bei 11,4 kb für den Wildtyp erwartet, die sich nach erfolgter Rekombination auf 6,6 kb verkürzt. Hierbei wird zugleich auch die dritte, singuläre LoxP-Sequenz nachgewiesen (siehe 5.2.4.3).

Das Rekombinationsereignis konnte im 3'-Southern nur für zwei Klone eindeutig gezeigt werden.

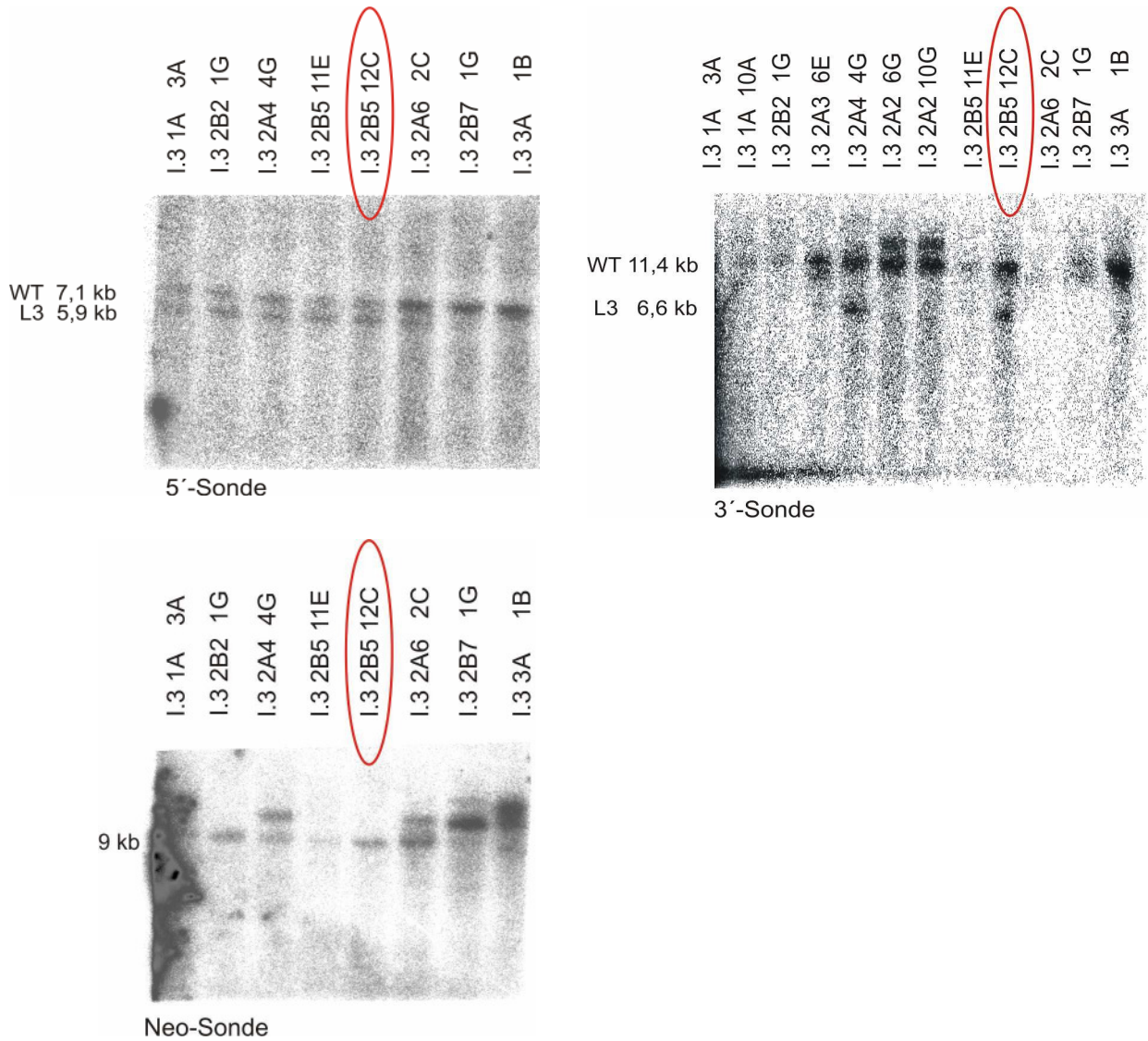
Die Hybridisierung mit der Neo-Sonde zeigte, dass nur einer der zwei 5'- **und** 3'-positiven Klonen die Selektionskassette richtig integriert hatte. Beim anderen ist eine zusätzliche Bande zu sehen, was auf Mehrfachintegration hinweist.

Nach erfolgtem 3'-Nachweis wurden die bei -80° C gelagerten Zellen erneut aufgetaut, expandiert und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff bei -183° C überführt. Hierbei sollte von den zwölf Klonen noch einmal DNS isoliert, verdaut und mit den drei Sonden hybridisiert werden, um die Ergebnisse in einer Synopsis darzustellen. Zwei der zwölf Klone (I.3 2A2 6G und I.3 2A2 10 G) wurden bereits nach dem 3'-Southern als negativ beurteilt und daher nicht aufgetaut, weitere zwei (I.3 1A 10A und I.3 2A3 6E) sind nach dem Transfer von der 96-Loch-Platte nicht weiter angewachsen.

Die Klone I.3 2B7 1G und I.3 3A 1B zeigen im zweiten 5'-Southern nur noch die Wildtypbande.

Abbildung 5-27 Southern-Blot-Ergebnisse des 1. Targetings

Der einzige L3 Klon, der mit allen drei Sonden positiv ist, ist **I.3 2B5 12C**. Bei den anderen Klonen ist entweder die 3'-Sonde negativ, oder bei Hybridisierung mit der Neo-Sonde tauchen zusätzliche Banden auf, was auf eine Mehrfachintegration hinweist.



5.3.2 Das 2. Targeting

Mit dem im 1. Targeting erhaltenen positiven Klon **I.3 2B5 12 C** wurde nun das 2. Targeting durchgeführt. Im 2. Targeting werden die Stammzellen mit einem Vektor, pIC-Cre transfiziert, durch welchen in den transfizierten Zellen die Cre-Rekombinase exprimiert wird. Durch die Aktivität der Cre-Rekombinase kommt es im L3 Allel zur Rekombination der LoxP-Sequenzen. Hierbei sind drei verschiedenen Ereignisse denkbar (siehe 1.6 Cre/LoxP-System). Allerdings überleben nur diejenigen Zellen die Selektion in ganciclovirhaltigem Medium, bei denen die NeoTK-Selektionskassette entfernt wurde, folglich die L1 (**A**) und L2 Klone (**B**).

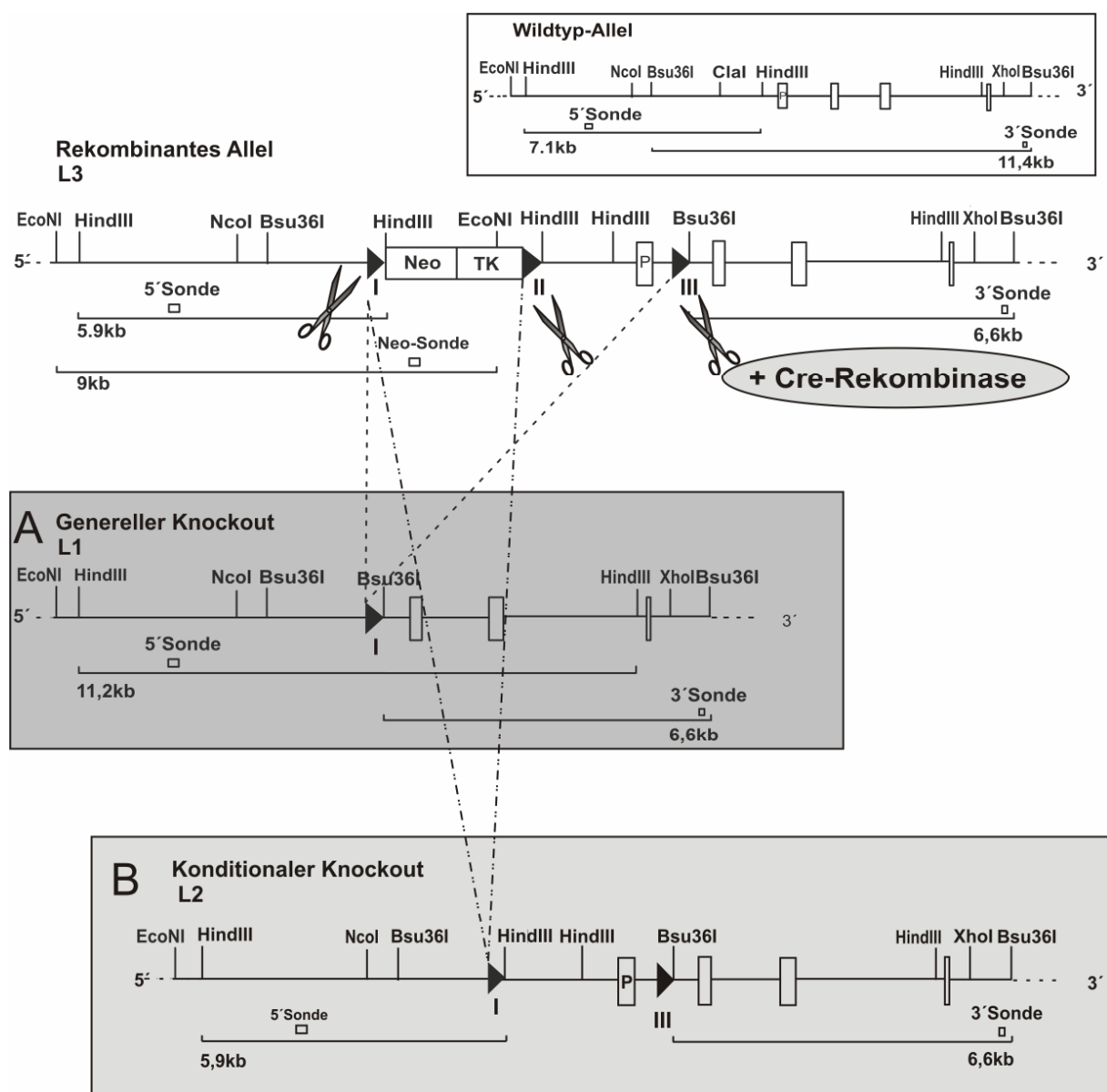


Abbildung 5-28 Rekombinationsereignisse im 2. Targeting

A: Rekombination zwischen LoxP-I und LoxP-III führt zum generellen (totalen) Knockout

B: Rekombination zwischen LoxP-I und LoxP-II führt zum konditionalen Knockout

Das 2. Targeting wurde wie unter 4.3.15.5 beschrieben durchgeführt. Für die Transfektion wurden 20 µg des gereinigten pC-Cre-Vektors eingesetzt. Abweichend vom Protokoll wurde schon 24 Stunden nach Cre-Transfektion mit der Ganciclovirselektion begonnen, da das Wachstum der Zellen, vor allem auf der Platte mit höchster Dichte schon sehr weit fortgeschritten war. Am Tag 7 nach der Cre-Transfektion wurde mit dem Picken der Klone begonnen werden. Das Picken der Zellen und die weitere Verarbeitung wurden unter 4.3.15.4 beschrieben.

Insgesamt konnten 352 Klone gepickt werden, von welchen 252 in der Evaluation als rot bzw. gelb beurteilt wurden. Nur diese Klone wurden mit Southern-Blot untersucht, da nur gelbe und rote potentiell für eine Blastozysten-Injektion in Frage kommen.

Die Ergebnisse des 2. Targetings sind in Tabelle 5-2 zusammengefasst:

Tabelle 5-2 Ergebnisse des 2. Targetings

2. Targeting						
Targeting Nummer	Zeitkonstante	Gepickte Klone	Gelbe bzw rote Zellen	L1 Klone	L2 Klone	
1	8,5	352	252	221	31	

Das Rekombinationsereignis, welches zu L1-Klonen führt, ist um etwa den Faktor 8 wahrscheinlicher, als jenes, aus welchem L2-Klone resultieren.

5.3.2.1 Nachweis über Southern-Blot

Im Southern-Blot lassen sich mit Hilfe der 5'-Sonde L1 und L2 voneinander unterscheiden. Der Nachweis beruht ebenfalls auf einem Verdau der DNS mit HindIII. Bei L1-Klonen bleibt nur eine LoxP-Sequenz erhalten, alles zwischen LoxP I und LoxP III fällt weg. Somit auch die ursprünglich in diesem Abschnitt vorhandenen HindIII Schnittstellen. Es ergibt sich jetzt ein 11,2 kb Fragment zwischen der HindIII-Schnittstelle außerhalb des Homologiebereichs und der HindIII-Schnittstelle, die sich kurz vor dem 3'-Ende befindet. Für die L2-Klone ergibt sich durch Exzision der Selektionskassette ein Fragment der Länge 5,9 kb, da eine zusätzliche HindIII-Schnittstelle, welche mit der NeoTK-Kassette eingeführt worden war, zurückbleibt. L3-Klone, welche dieselbe

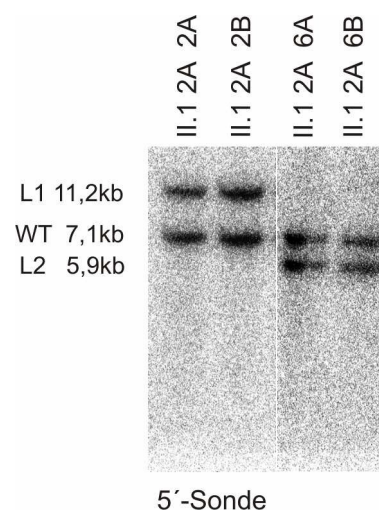


Abbildung 5-29
Screen mit der 5' Sonde

Fragmentgröße von 5,9 kb erwarten ließen (siehe 4.2.4.2.), überleben die Ganciclovirselektion nicht und können somit im 2.Targeting nicht vorkommen.

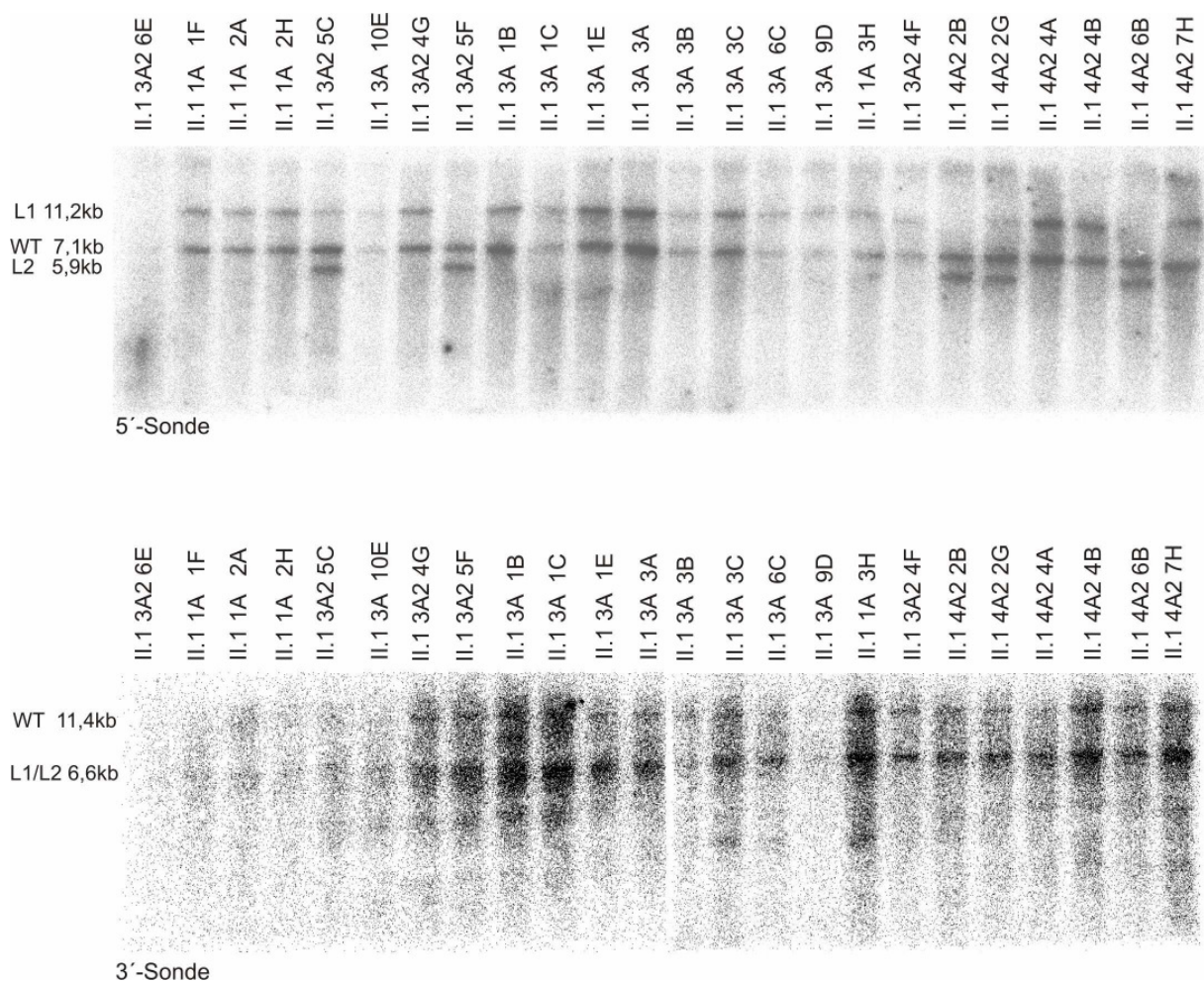
Mit der 3'-Sonde findet sich kein Unterschied zwischen L1 und L2 da bei beiden Genotypen die singuläre LoxP-Sequenz mit der zusätzlichen Bsu36I-Schnittstelle erhalten bleibt.

Da auch die Cre-Rekombination nur auf einem, dem vorherigen L3-Allel stattfindet, sind auch hier pro Zellklon zwei Banden zu erwarten, die 7,1 kb Wildtyp-Bande und zusätzlich entweder die L1- oder L2-Bande (siehe Abbildung 5-30).

Der 5'-Nachweis zeigte, dass sich unter den analysierten Zellen 31 L2-Klone befanden, der Rest besaß das L1-Allel.

Nicht alle Zellen sollten zur Langzeitkonservierung in flüssigen Stickstoff überführt werden. Daher wurden 24 Klone, darunter 5 L2-Klone und 19 L1-Klone, aufgetaut, expandiert und bei -183°C aufbewahrt. Während der 2. Passage wurde von allen Zellen ein Anteil abgezweigt, der zur nochmaligen Southern-Überprüfung kultiviert und anschließend die DNS präpariert wurde.

Abbildung 5-30 Southern-Blot –Ergebnisse des 2. Targetings



5.3.3 Blastozysteninjektion

Für die Blastozysteninjektion und den anschließenden Embryotransfer wurden ausgewählte L1- und L2-Klone des zweiten Targetings verwendet. Dazu wurden die Stammzellen aufgetaut und durch Expansion für die Mikroinjektion vorbereitet.

Blastozystenisolierung, -injektion und Embryotransfer wurden von Dr. Matthias und Dr. Ulrike Sausbier, Tübingen, sowie Herrn Christian Klasen, EMBL Heidelberg, durchgeführt.

Anfängliche Injektionsexperimente brachten jedoch nicht den erwünschten Erfolg. So wurden entweder keine oder ausschließlich nicht-chimäre Nachkommen geboren. Auch die Injektion des „Master“-L3-Klons war nicht erfolgreich. Mit Etablierung einer L3-Mauslinie hätten durch Verpaarung mit einer „Cre-deleter“-Maus (siehe Abbildung 6-2) die entsprechenden L1- bzw. L2-Mäuse erzeugt werden können.

Da die Zellen aufgrund der optimalen Targetingverläufe und ihres Wachstumsverhalten als potent eingestuft wurden, sollten die Injektionsparameter optimiert werden. Durch Verringerung der normalerweise pro Blastozyste injizierten Stammzellzahl von 10 – 12 auf 8 – 10 war es gelungen, drei männliche Chimären zu erzeugen. Nur männliche Tiere sind in der Lage, die Mutation an ihre Nachkommen weiterzugeben, da die für die Targeting-Experimente benutzten ES-Zellen aus männlichen SV129 gewonnen worden waren (Nagy et al. 1993). Der Chimärismus der Mäuse wurde anhand der Fellfärbung auf 5 - 30 % geschätzt.

Im Alter von 7 – 8 Wochen können die Chimären mit weiblichen C57/ BL6-Weibchen verpaart und damit die Keimbahntransmission der Mutation getestet werden.

Die Ergebnisse der Injektionen sind in Tabelle 5-3 zusammengefasst:

Tabelle 5-3 Ergebnisse der Blastozysteninjektionen

Blastozysteninjektion					
Stammzell-Klon	Anzahl an LoxP-Seiten	Nachkommen	Chimären ♂	Chimärismus	Keimbahntransmission
I.3 2A5 12 C	L3	0	-	-	-
II.1 2A 2A	L1	0	-	-	-
II.1 2A 2B	L1	0	-	-	-
II.1 2A 6A	L2	4	0	-	-
II.1 2A 6B	L2	0	-	-	-
II.1 3A2 4G	L1	14	3	5 - 30%	?
II.1 3A2 5F	L2	0	-	-	-

5.4 Klonierung des murinen Slo2.1 in Expressionsvektoren

Nachdem das *slo2.1*-Gen wie unter 5.1 beschrieben identifiziert war, sollte das Protein Slo2.1 für weitere Untersuchungen im heterologen System exprimiert werden. Von heterologer Expression spricht man dann, wenn das zu exprimierende Protein so in der Zelle nicht vorhanden ist.

Zur Expression in einem heterologen System ist es nötig, die Information für das zu exprimierende Protein, d.h. den codierenden DNS-Bereich des Gens, in eine Wirtszelle einzuschleusen. Dort wird, unter bestimmten Voraussetzungen, im Rahmen der wirtszelleigenen Proteinbiosynthese auch die Information der fremden DNS verwendet und das zugehörige Protein hergestellt. Hierfür bedient man sich der cDNS, die über reverse Transkription aus RNS erzeugt wird. Die cDNS, welche die komplette (aus Exonen bestehende) Information für das Protein enthält, wird in einen Expressionsvektor kloniert und damit die gewünschten Zellen transfiziert. Die Vektoren besitzen die Eigenschaften klassischer bakterieller Plasmide. Auf diese Weise lässt sich in Bakterien eine zur Transfektion ausreichende DNS-Menge erzeugen. Zusätzlich benötigen Expressionsvektoren weitere Eigenschaften, die eine Proteinexpression erlauben: Sie besitzen einen für das entsprechende Zellsystem spezifischen Promotor, der ein Ablesen der cDNS ermöglicht. An diesen schließt sich in der Regel ein RNS-Polymerase Promotor an, der das Umschreiben in RNS kontrolliert. Ein zusätzliches Polyadenylierungs-(Poly-A-)Signal kennzeichnet die in der Zelle transkribierte RNS als proteinkodierende Boten-RNS (*messenger RNA*, mRNA).

5.4.1 Erzeugung eines kompletten cDNS-Klons von Slick

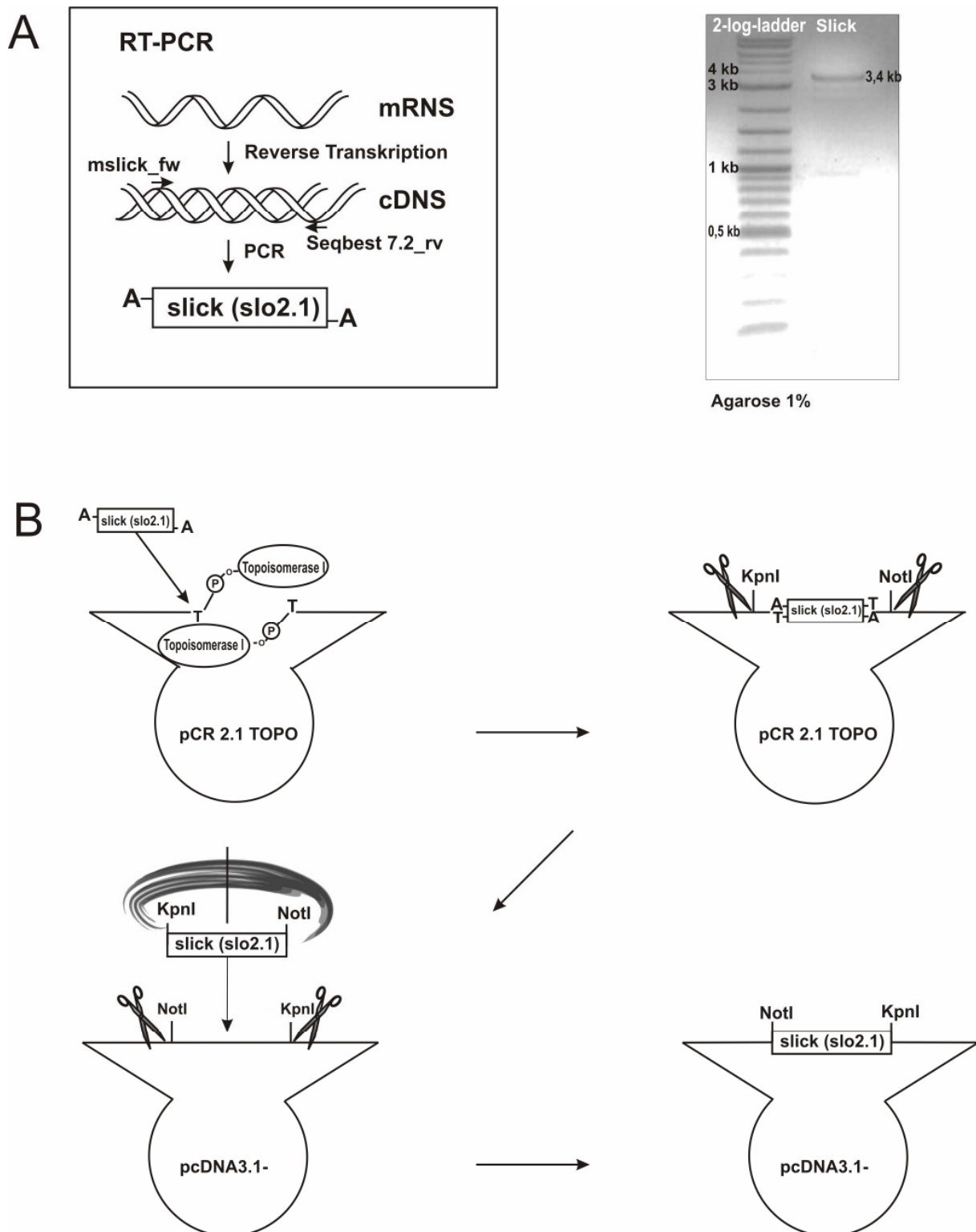
Die cDNS, welche die kodierende Information für Slick enthält, wurde, wie in 4.3.10.2 beschrieben, mittels RT-PCR erzeugt.

Als Primer wurden der *mslick_fw*-Primer und der *seqbest-7.2_rv*-Primer eingesetzt. Als Template diente Poly-A-mRNS, die aus dem Gehirn einer 6 Wochen alten SV 129 Maus isoliert worden war (4.3.3).

Mit der RT-PCR konnte ein entsprechendes Fragment mit der erwarteten Größe von 3,4 kb erzeugt werden. Dieses wurde aus dem Agarosegel isoliert und über TOPO-TA-Cloning in den Vektor pCR2.1 eingefügt (4.3.7.1). Durch Sequenzierung mehrerer Klone wurde bestätigt, dass es sich hierbei um die cDNS von Slick handelt.

Die Slick-cDNS wurde nun mit über *KpnI* und *NotI* aus dem TOPO-Vektor ausgeschnitten und den geöffneten Expressionsvektor pcDNA3.1- (Invitrogen) ligiert. Dass der für die Expression nötige offene Leserahmen („open reading frame“, ORF)

mit Startcodon ATG und Stop-Codon TGA vorliegt, wurde nochmals durch Sequenzierung überprüft.



5.4.2 Transfektion von HEK-Zellen

Die Abkürzung HEK steht für „Human Embryonic Kidney“. Bei den Zellen handelt sich also um menschliche embryonale Nierenzellen, welche wiederum Epithelzellen sind. Die aus embryonalem Nierengewebe kultivierten Zellen wurden mit Hilfe eines onkogenen Virus, dem Simian Virus 40 (SV 40) (Schein H.M. & Enders J.F 1962), auch 293T-Zellen bezeichnet, oder dem Adeno-Virus Typ 5 (Graham et al. 1977) (293-Zellen) transfiziert. Auf diesem Weg wurden den Zellen auf künstlichem Wege Eigenschaften verliehen, die normalerweise charakteristisch für Krebszellen sind, z.B. die ungehemmte Vermehrung.

Für die Zellkultur sind HEK-Zellen insbesondere durch ihre einfache Handhabung interessant. Sie lassen sich leicht kultivieren und auch das Einbringen von Fremd-DNS stellt kein größeres Problem dar.

Sie sind daher ein etabliertes, gut charakterisiertes System für die heterologe Expression eukaryotischer Proteine. HEK-Zellen gewährleisten als Säugerzellen eine korrekte Faltung und Modifizierung der exprimierten (eukaryotischen) Proteine.

Die Expression von Slo2.1 in HEK-Zellen soll grundlegende elektrophysiologische Funktionsuntersuchungen, wie beispielsweise die Regulation durch Proteinkinasen, ermöglichen. Diese Ergebnisse können dann mit *In-vivo*-Studien am Knockout-Mausmodell verglichen werden.

Die Expression und die Funktionsuntersuchungen werden zurzeit von Professor Dr. Michael Korth, Hamburg, durchgeführt.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde beschrieben, wie mithilfe molekularbiologischer Methoden der Na⁺- und Cl⁻-abhängige K⁺-Kanal Slo2.1 kloniert und durch homologe Rekombination in ES-Zellen der Maus gezielt inaktiviert wurde. Durch Injektion der Zellen in Blastozysten und anschließende Reimplantation in pseudoschwangere Ammenmäuse (Embryotransfer) wurden chimäre Mäuse erzeugt. Eine Keimbahntransmission (Beteiligung der mutierten ES-Zellen an den Keimbahnen der chimären Mäuse) und damit Weitervererbung der KO-Mutation an ihre Nachkommen konnte bislang noch nicht gezeigt werden.

Ionenkanäle regulieren das Stoffwechselgeschehen auf zellulärer Ebene. Sie sorgen für einen reibungslosen Ablauf bei der Weitergabe von Information durch elektrische Signale. Dies geschieht letztendlich durch ein sehr gut koordiniertes Zusammenspiel aus Öffnen und Schließen der einzelnen Ionenkanäle.

Prinzipiell ist ein Leben in der Tier- und Pflanzenwelt ohne Ionenkanäle nicht möglich. Defekte in der Funktion bereits eines Kanaltyps äußern sich mitunter in schwerwiegenden Krankheiten. Mukoviszidose, eine Erkrankung, bei welcher der Wasserhaushalt der Zellen gestört ist, und daher sämtliche Körpersekrete äußerst zähflüssig sind, wird durch einen defekten Chlorid-Ionen-Kanal verursacht (Rommens et al. 1989). Auch bei neurologischen Störungen (Epilepsie, (Bernard et al. 2004; Du et al. 2005)) oder allergischen Erkrankungen (Bradding & Conley 2002) spielen pathologisch veränderte Ionenkanäle eine Rolle.

Strukturen, die derart weit in einem Organismus verbreitet sind, wie die Ionenkanäle, eignen sich auch hervorragend als Angriffspunkte für bestimmte Pharmaka. Bewährte Medikamente entfalten ihre Wirkung über die Blockade oder Aktivierung von Ionenkanälen. Beispielsweise wird der Kalziumkanalblocker Nifedipin schon geraume Zeit erfolgreich zur Behandlung des Bluthochdrucks eingesetzt (Guazzi et al. 1977). Ein anderes Arzneimittel mit einem Ionenkanal als Zielstruktur, ist das orale Antidiabetikum Glibenclamid. Hierbei handelt es sich um einen Blocker eines ATP-sensitiven Kaliumkanals (Inoue et al. 1991).

Diese exemplarisch aufgezeigten Beispiele unterstreichen, wie wichtig es ist, über die Funktionsweise dieser Kanäle Bescheid zu wissen. Nicht zuletzt im Hinblick darauf, massgeschneiderte Medikamente zu entwickeln, welche die selektive Modulation eines einzelnen Kanals erlauben und somit das Krankheitsgeschehen beeinflusst werden kann.

Die Entwicklung der Knockout-Technologie, mit deren Hilfe Gene in einem Organismus gezielt ausgeschaltet werden können („Gene-Targeting“) (Thomas & Capecchi 1987; Capecchi 1989), leistet bis heute einen wichtigen Beitrag zum

Verständnis der Funktion von Genen und den daraus resultierenden Proteinen. Seit Etablierung der ersten Knockout-Mauslinie (Koller et al. 1989) wurden unzählige Knockout-Mäuse für die verschiedensten Proteine geschaffen und untersucht. Auf diese Weise konnte das Wissen über die biologische Funktion unterschiedlicher Gene und Proteine beträchtlich erweitert werden.

Der „klassische“ Knockout besteht darin, das Leseraster eines Gens zu zerstören, indem durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen eine Mutation in das entsprechende Gen eingeführt wird. Dabei handelt es sich im Allgemeinen um einen Selektionsmarker, wie das Neomycin-Resistenzgen, der eine Selektion der rekombinierten Stammzellen ermöglicht (Thomas & Capecchi 1987). Während das Resistenzgen abgelesen und exprimiert wird, bleibt das Zielgen, in seiner Struktur zerstört, funktionslos. Da diese Tiere in keinem Gewebe ein funktionsfähiges Protein exprimieren können, bezeichnet man dies auch als „totalen“ Knockout.

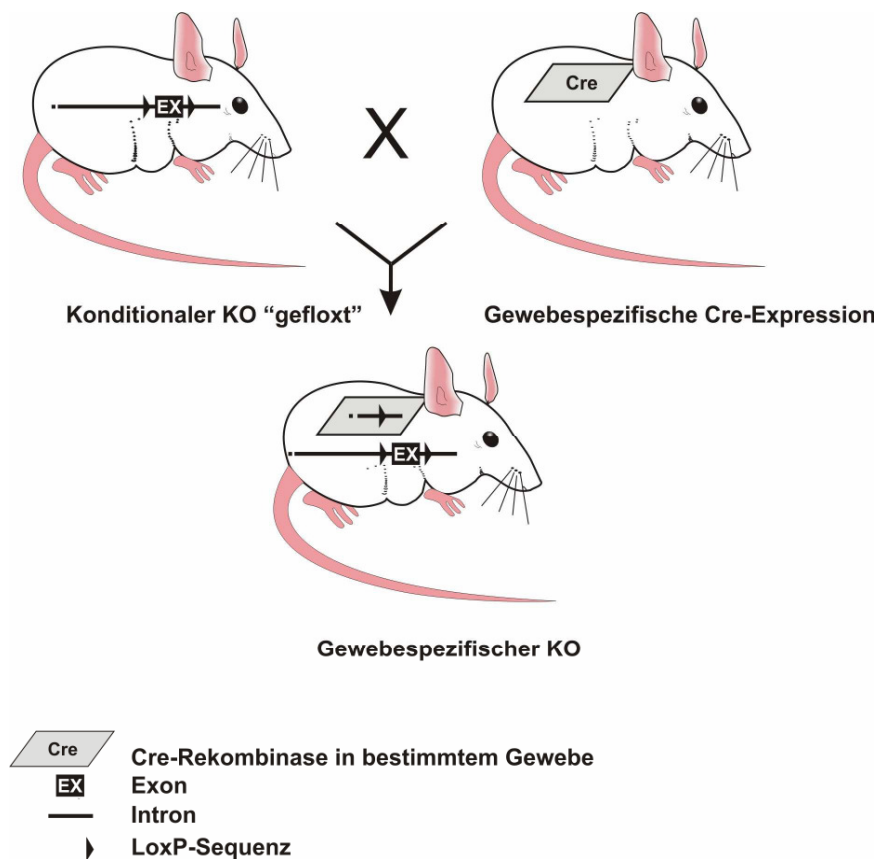


Abbildung 6-1 Gewebespezifischer Knockout

Durch Verpaarung konditionaler Knockout-Mäuse mit transgenen Cre-Mäusen können gewebespezifische Knockouts erzeugt werden (Erläuterungen im Text).

Die Durchführung eines totalen Gen-Knockouts ist mit einer Reihe von Nachteilen behaftet (Rajewsky et al. 1996):

Zum einen führt der totale Knockout eines lebenswichtigen Proteins bereits im Embryonalstadium zum Tod der Maus. Desweiteren erfüllt ein Gen seine Aufgabe nicht in allen Geweben auf die gleiche Weise. Ein totaler Knockout könnte beispielsweise Regulations- oder Kompensationsmechanismen hervorrufen, welche komplexe Phänotypen erzeugen, die eine Zuordnung zwischen Gen, Funktion und

Zelltyp erschweren. Auch das Verbleiben des Selektionsmarkers mit seinem eigenen Promotor stellt ein Problem dar, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass dies Einfluss auf das Ablesen anderer Gene hat. Dadurch könnte der Phänotyp der Knockout-Maus in unerwünschter Weise beeinflusst werden.

Eine Lösung dieser Probleme bot die Einführung des Cre/ LoxP-Systems (siehe 1.6) in die Knockout-Strategie. Mithilfe dieses Rekombinase-Systems ist es möglich, s.g. „konditionale“ Knockouts zu erzeugen (Rajewsky et al. 1996). Bei diesen Mäusen kann einerseits der Selektionsmarker wieder entfernt werden und andererseits ein Zelltyp-(Gewebe-)spezifischer Knockout generiert werden (Abbildung 6-1). Technisch werden sowohl das Zielgen, welches ausgeschaltet werden soll, als auch der Selektionsmarker durch LoxP-Erkennungsstellen flankiert („gefloxt“). Diese werden vom Enzym Cre-Rekombinase als Schnittstellen erkannt und der Bereich zwischen zwei LoxP-Seiten wird entfernt. Eine LoxP-Sequenz bleibt zurück. Die Cre-vermittelte Rekombination kann *in vitro*, durch transiente Expression des Enzyms in ES-Zellen, oder *in vivo*, durch Verpaarung der „gefloxten“ Tiere mit transgenen Cre-Mäusen erfolgen. Transgene Cre-Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors nur im gewünschten Gewebe. Handelt es sich um eine s.g. „Cre-deleter-Maus“, welche die Cre-Rekombinase mosaikartig in der Keimbahn exprimiert (Holzenberger et al. 2000), können die verschiedenen Mausvarianten aus einem ES-Zellklon mit 3 LoxP-Sequenzen erzeugt werden (Abbildung 6-2). Der Vorteil dieser Variante besteht darin, dass den ES-Zellen ein weiteres Targeting (Elektroporation, Kultur, Selektion) erspart bleibt, und die Zellen eher ihre Pluripotenz behalten, was wiederum die Wahrscheinlichkeit der Keimbahntransmission erhöht (Holzenberger et al. 2000; Glaser et al. 2005).

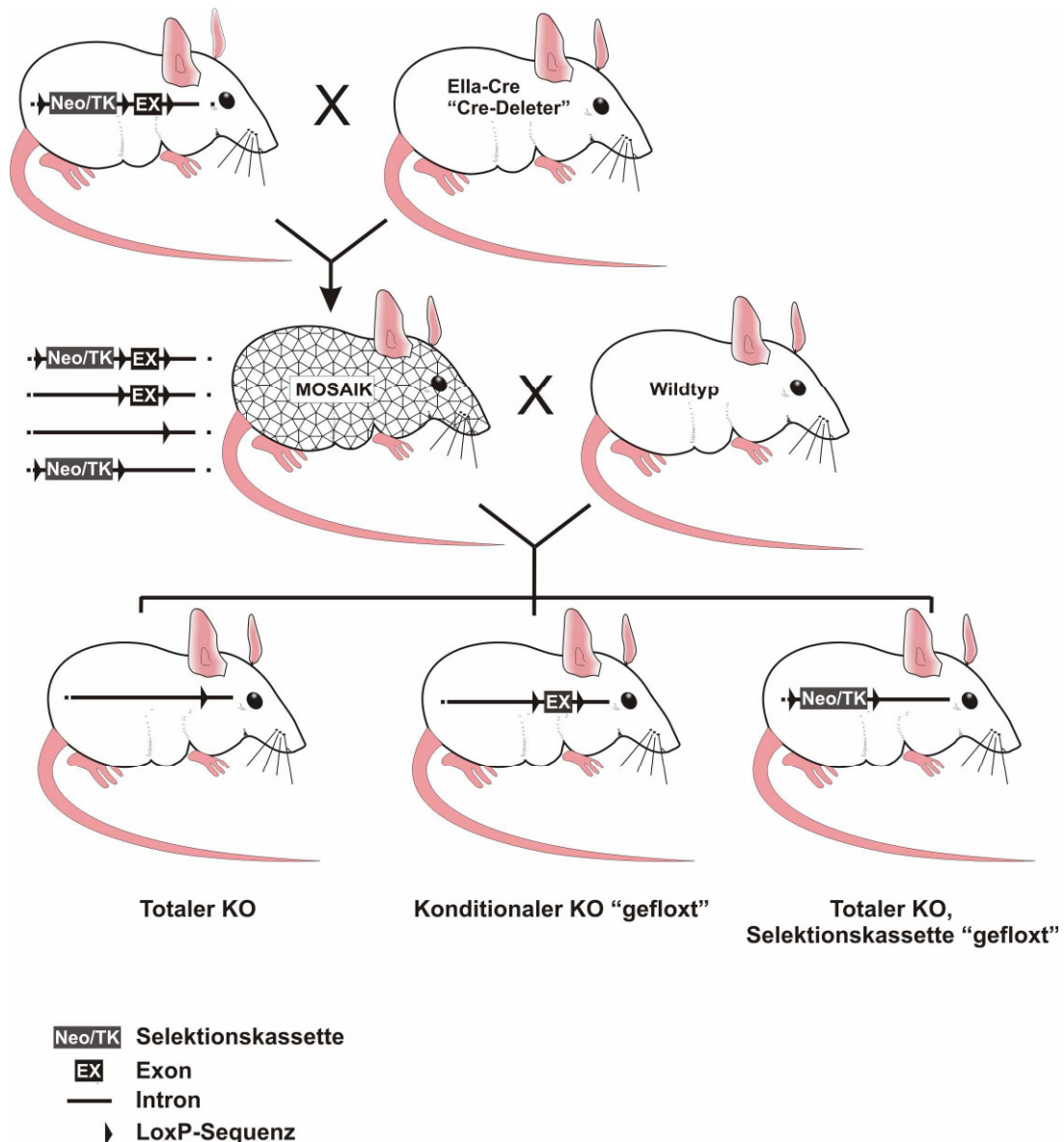


Abbildung 6-2 *In-vivo*-Knockouts durch Verpaarung mit Cre-deleter-Maus

Durch Verpaarung dreifach gefloxter Mäuse mit s.g. Cre-deleter-Mäusen können genereller und konditionaler Knopckout auch in vivo erzeugt werden (Erläuterungen im Text)

Der Na⁺- und Cl⁻-abhängige K⁺-Kanal Slo2.1, auch als SLICK bezeichnet, gehört zur Familie der Slo-Kanäle. Strukturell handelt es sich dabei um Kanäle, die sechs membrandurchspannende Domänen besitzen (6-TM-Kanäle). Alle Mitglieder der Slo-Familie zeichnen sich durch ihre ungewöhnlich hohen Kaliumleitfähigkeiten aus. Diese hohen Kaliumströme waren es, die zur Entdeckung des BK_{Ca}-Kanals (Slo1), des ersten Mitglieds und Namensgebers dieser Klasse von Kaliumkanälen, geführt haben (Elkins et al. 1986; Atkinson et al. 1991).

Nach und nach wurden weitere Slo-Kanäle entdeckt, so dass die Slo-Familie heute aus vier Mitgliedern besteht: Slo1, Slo2.1, Slo2.2, Slo3. Während Slo1 mittlerweile

sehr gut untersucht wurde, ist über die anderen, vor allem über deren biologische Funktion, nur sehr wenig bekannt.

Speziell zu Slo2.1, dem jüngsten Mitglied der Slo-Familie, liegen nur sehr wenige Daten vor. So konnte in elektrophysiologischen Experimenten gezeigt werden, dass der Kanal eine außergewöhnliche Aktivierung durch Na⁺- und Cl⁻-Ionen erfährt, durch ATP hingegen blockiert wird (Bhattacharjee et al. 2003). Auch seine breite Verteilung im ZNS ist bekannt (Bhattacharjee et al. 2005). Weitergehende immunhistochemische Untersuchungen förderten eine Kollokalisierung von Slo2.1 und G_q-Protein gekoppelten Rezeptoren zu Tage, die auch von funktioneller Bedeutung zu sein scheint (Santi et al. 2006).

Diese Beobachtungen zeichnen zwar ein charakteristisches Bild von Slo2.1, seine biologische Funktion ist aber weiterhin unklar. Die Art seiner Regulation über Neurotransmitter und sein Vorkommen in Neuronen und am Herzen lassen allenfalls spekulativ vermuten, dass Slo2.1 einen modulierenden Effekt auf die neuronale Erregbarkeit ausübt, oder eine protektive Rolle bei ischämischen Vorgängen spielt (Bhattacharjee et al. 2003;Santi et al. 2006). Um diese Vermutungen zu bestätigen, ist es nötig, den Kanal in seiner nativen Umgebung studieren zu können. Vor allem die Auswirkungen auf den Organismus, wenn der Kanal fehlt, sind interessant. Wie u.a. für den BK_{Ca} gezeigt wurde, ist die Knockout-Maus dafür ein geeignetes Modell. So wurden durch Vergleichstudien der BK-Knockout-Maus mit Wildtyp Tieren eine ganze Reihe neuer Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung dieses Kanals gewonnen (Sausbier et al. 2004;Meredith et al. 2004;Sausbier et al. 2005;Werner et al. 2005).

Aus diesem Grunde lag es nahe, die Funktion des Slo2.1 ebenfalls durch Entwicklung eines Knockout-Tiermodells zu ergründen.

Die grundlegende Strategie zur gezielten Inaktivierung des *slo2.1*-Gens in der Maus war es, basierend auf dem Cre/loxP-System einen Knockout-Vektor zu konstruieren, der durch homologe Rekombination in ES-Zellen sowohl den totalen, als auch den konditionalen, gewebespezifischen Knockout ermöglichte.

Da für das erfolgreiche Gene Targeting große Homologiebereiche erforderlich sind (Hasty et al. 1991), muss die Struktur des Zielgens im Detail bekannt sein. Zwar war nach Abschluss des Mausgenomprojekts (Waterston et al. 2002) die komplette Sequenz in Online-Datenbanken (z.B. www.ensembl.org) verfügbar, Informationen über bestimmte Gene aber nur ansatzweise vorhanden. Ausgehend von der Sequenz des Slo2.2 wurde über BLAST ein „putatives“ (mutmaßliches) Gen für Slo2.1 identifiziert (siehe 5.1). Da diese Information rein auf einem mathematischen Algorithmus für die Exon-Vorhersage („Exon-trapping“, „Exon prediction“) beruhte (Shepherd 1981;Gelfand 1990), musste die Sequenz aus der Datenbank zunächst

durch eigene Klonierungs- und Sequenzierungsarbeiten bestätigt werden. Mit der bekannten Sequenz konnte dann auch die korrekte Genstruktur von *slo2.1* identifiziert werden. Durch Anwendung der RT-PCR (4.3.10.2) war es schließlich gelungen, ein komplettes cDNS-Transkript von *slo2.1* zu erzeugen und zu klonieren. Der *slo2.1* cDNS-Klon wird zur Expression im Heterologen System verwendet. Ergebnisse dieser Expressionsstudien liegen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vor. Mit Kenntnis der Genstruktur von *slo2.1* waren die Voraussetzungen für die Entwicklung einer Knockout-Strategie geschaffen. Im Anschluss daran erfolgten aufwändige Klonierungen, in welchen ein Knockout-Konstrukt mit drei LoxP-Seiten erstellt wurde. Sowohl das Poren-Exon des Kanals, als auch die NeoTK-Selektionskassette lagen somit in „gefloxter“ Form vor. Mit diesem Targeting-Vektor wurden daraufhin ES-Zellen transfiziert (Elektroporation 4.3.15.3) und rekombinante Klone durch Selektion in G418-haltigem Medium angereichert. Nach mehreren Targeting-Experimenten konnte lediglich ein Klon isoliert werden, der nach Überprüfung durch Southern-Blot eine korrekte Integration aufwies (Abbildung 5-27, Tabelle 5-1)). Allerdings bestätigt dies auch die in der Literatur beschriebenen Rekombinationsraten von 1 ‰ (Thomas et al. 1986). Die verschiedenen Faktoren, welche die Effizienz der Homologen Rekombination beeinflussen, wurden bereits in Kapitel 1.5 beschrieben. Da schon bei der Konzeption auf große Homologiebereiche geachtet wurde und zur Anreicherung rekombinanter Klone doppelt selektioniert wurde (1.5.1), kann womöglich ein schlecht zugänglicher Locus des *slo2.1*-Gens ein Grund für die geringe Rekombinationsfrequenz sein.

Der korrekte L3-Klon wurde mit einem Vektor, der transient die Cre-Rekombinase exprimiert, transfiziert, worauf nach Ganciclovir-Selektion ausschließlich L1-bzw. L2-Klone isoliert werden konnten (5.3.2). Dies bestätigt noch einmal die Richtigkeit des verwendeten „Master“- (L3)-Klons, ist vor allem aber ein Hinweis darauf, dass die Konzeption des Targeting-Konstruktes auf dem Papier stimmt, und das Cre/loxP-System auf gewünschte Weise in den ES-Zellen funktioniert.

In mehreren Sitzungen wurden daraufhin Injektionen mit ausgewählten L1- und L2-Klonen vorgenommen. Erst nach mehreren Anläufen war es gelungen, chimäre Nachkommen zu erzeugen (5.3.3). Dass in den ersten Versuchen keine chimären Mäuse generiert wurden, mag daran gelegen haben, dass die optimale Zahl der zu injizierenden ES-Zellklone pro Blastozyste erst experimentell ermittelt werden musste. Wird generell empfohlen, zwischen 15 und 25 ES-Zellen in eine Blastozyste zu injizieren (Hogan et al. 2000) schien das Optimum unserer Zellen zwischen 8 und 10 ES-Zellen pro Blastozyste zu liegen. Mit dieser Zahl von Stammzellen konnten männliche chimäre Mäuse erzeugt werden. Der Chimärismus liegt mit 5 -30 % relativ niedrig. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit finden Verpaarungsexperimente Chimäre/ Wildtyp statt, um eine Keimbahngängigkeit der

Mutation nachzuweisen. Eine Abschätzung des Chimärismus über die Zusammensetzung des Fells erlaubt Schlüsse auf den Beitrag der mutierten ES-Zellen am Gesamtorganismus. Je höher der Anteil der mutierten ES-Zellen an der Fellfarbe ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass auch die Keimbahnen von diesen Zellen gebildet werden und damit eine Weitervererbung stattfinden kann. Eine absolute Aussage ist dadurch allerdings nicht möglich. So wurde einerseits eine Keimbahngängigkeit bei Tieren mit 30% oder weniger Fellchimärismus beobachtet, während andererseits bei hochchimären Mäusen (80 – 100 %) keine Vererbung der Mutation vorhanden war (Suzuki et al. 1997). Die Zusammensetzung der Fellfarbe stellt somit ein wichtiges, aber keinesfalls entgeltiges Kriterium für die Wahrscheinlichkeit einer Keimbahntransmission dar. Letztendlich kann diese nur durch Verpaarung mit Wildtypmäusen und anschließende Genotypisierung der Nachkommen bewiesen werden.

Auch das Alter der Stammzellen scheint sich negativ auf die Keimbahngängigkeit auszuwirken, wobei sich in der Literatur widersprüchliche Aussagen finden. Für Nagy R1-Zellen (Nagy et al. 1993) wird eine Verschlechterung der Keimbahngängigkeit berichtet, wenn die Zellen öfter als 15 – 20 mal passagiert wurden. Auf der anderen Seite wurde aber auch mit Zellen, die sich bereits in der 32. Passage befanden, eine Keimbahntransmission erreicht (Fedorov et al. 1997). Die L1- und L2-Klone befinden sich zum Zeitpunkt der Injektion in der 28. Passage. Dies könnte eine Erklärung für die geringe Ausbeute an chimären Tieren darstellen. Daher sollen bei erneuten Injektionen optimale Zahlen von L3-Klonen injiziert werden, welche sich erst in der 18. Passage befinden. Dadurch könnte die Wahrscheinlichkeit, mehrere hochchimäre Mäuse zu erhalten, beträchtlich gesteigert werden. Konditionaler und Totaler Knockout müssten dann *in vivo* mithilfe einer Cre-deleter-Maus erzeugt werden.

7 Ausblick

Das nächstliegende Ziel ist die Etablierung der unterschiedlichen Knockout-Mauslinien. Voraussetzung dafür sind ausreichend Chimären mit hohem agoutifarbenen Fellanteil, da hierbei mit größerer Wahrscheinlichkeit eine Keimbahntransmission der mutierten Stammzellen zu erwarten ist. Zurzeit werden die bisherigen männlichen Chimären bereits mit Wildtyp-Mäusen verpaart und parallel dazu weitere Injektionen mit den einfach getargeten ES-Zellen (L3-Klon: I.3 2A5 12C) durchgeführt. Durch dieses zweigleisige Vorgehen kann bald mit den ersten Mausmutanten gerechnet werden.

Die gezielte phänotypische Untersuchung der Knockout-Mäuse wird zukünftig klären, welche Rolle der Slo2.1-Kanal *in vivo* besitzt. Von besonderem Interesse wird sein, ob sich die bislang gefundenen *In-vitro*-Messungen am lebenden Tier bestätigen lassen, und damit gezeigt wird, dass Slo2.1 tatsächlich die postulierte protektive Funktion bei der Ischämie (Bhattacharjee et al. 2003) oder der neuronalen Signaltransduktion (Santi et al. 2006) ausübt.

Mithilfe der konditionalen Knockout-Mäuse lassen sich durch Kreuzung mit Cre-Mäusen gewebespezifische Knockouts erzeugen. Damit können zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden, die in der Lage sind, einen weitaus genaueren Aufschluss über die biologische Funktion des Slo2.1 zu geben.

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird beschrieben, wie mithilfe molekularbiologischer Techniken gezielt das *slo2.1*-Gen in der Maus ausgeschaltet wird (*slo2.1*-Knockout-Maus). Das *slo2.1*-Gen codiert für den natrium- und chloridabhängigen Kaliumkanal, welcher in der Literatur als Slo2.1 oder SLICK (**S**equence **l**ike an **i**ntermediate **c**onductance **K**⁺-channel) bekannt ist. Slo2.1 zählt zur Familie der Slo-Kanäle. Hierbei handelt es sich um eine Unterfamilie von Kaliumkanälen, welche sich durch ihre hohen Leitfähigkeiten für Kaliumströme auszeichnen. Zwischenzeitlich sind vier Mitglieder der Slo-Kanalfamilie bekannt: Slo1, der kalziumaktivierte Kaliumkanal (BK_{Ca}), die beiden paralogen Slo2 Kanäle Slo2.1 (SLICK) und Slo2.2 (SLACK), sowie der pH-sensitive Kaliumkanal Slo3. Prinzipiell handelt es sich bei allen Kanälen um s.g. 6-Transmembran-Kanäle, was bedeutet, dass ihre Kernstruktur aus sechs transmembrandurchspannenden Regionen besteht. Auch Slo2.1 besitzt sechs Transmembrandomänen. N-terminaler und C-terminaler Teil liegen intrazellulär, im C-Terminus finden sich verschiedene funktionelle Domänen (RCK-Domänen, Phosphorylierungsstellen).

Da Slo2.1 als jüngstes Mitglied der Slo-Familie nur wenig erforscht und seine biologische Funktion unbekannt ist, sollte als Ziel dieser Arbeit ein Tiermodell entwickelt werden, in welchem genau dieser Kanal inaktiviert wird (Knockout). Damit können die physiologischen Besonderheiten (Phänotypen) dieser Tiere mit den entsprechenden unveränderten Wildtyp-Mäusen verglichen, und dadurch Rückschlüsse auf die biologische Funktion von *slo2.1* gezogen werden. Zusätzlich zum totalen Knockout, bei welchem im gesamten Organismus kein intaktes Protein mehr vorliegt, war es weiteres Ziel der Arbeit, s.g. konditionale Knockout-Mäuse zu erzeugen, mit welchen gewebespezifische Knockouts zu generieren wären. Basierend auf dem Cre/loxP-System, wurde eine Strategie entwickelt, mit welcher die Entwicklung sowohl des totalen, als auch des konditionalen Knockouts erreicht werden könnten.

Zunächst wurde dafür die komplette cDNS des Slo2.1 erzeugt, kloniert und damit die Genarchitektur des *slo2.1*-Gens ermittelt. Das Gen besteht aus 28 Exonen und umspannt einen Bereich von 370 kb. Um den Kanal funktionslos zu machen, sollte Exon Nr. 9, welches für die eigentliche Kanalpore codiert, gezielt verändert („ausgeknockt“) werden.

In mehreren Schritten wurde ein dafür geeignetes Knockout-Konstrukt erstellt. Dieses beinhaltet einen Selektionsmarker, welcher zur Positiv-/Negativselektion verwendet werden kann („Neo/TK-Kassette“) sowie insgesamt drei LoxP-Erkennungsstellen. Zwei davon flankieren das Poren-Exon Nr. 9 („gefloxt“) und erlauben die Herstellung des totalen und des konditionalen Knockouts. Dieses Konstrukt wurde für das „Gene-

Targeting“ durch Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) eingesetzt. Hierfür wurden ES-Zellen mit dem Knockoutvektor transfiziert und in Selektionsmedium kultiviert. Die überlebenden Klone wurden vereinzelt und durch Southern-Blot-Analyse auf korrekte Integration des mutierten Genabschnitts überprüft. Unter 1200 analysierten Zell-Klonen konnte einer identifiziert werden, bei welchem die homologe Rekombination auf die gewünschte Weise erfolgt war. Dieser Zellklon durchlief ein weiteres *Gene-Targeting*, in dessen Verlauf zwei Arten von mutierten Stammzellen erzeugt wurden, die entweder für den totalen, oder den konditionalen Knockout verwendet werden konnten. Mithilfe der Mikroinjektion dieser ES-Zellen in Blastozysten und anschließenden Embryotransfer in pseudoschwangere Ammenmäuse wurden daraufhin chimäre Tiere geboren. Die männlichen Chimären werden zurzeit mit weiblichen Wildtypmäusen verpaart um zu testen, ob eine Keimbahntransmission vorliegt und die Mutation des *slo2.1*-Gens an die nächste Generation weitervererbt wird, weil erst damit eine stabile *slo2.1*-Knockout-Mauslinie etabliert werden kann.

9 Literaturverzeichnis

- ABREMSKI, K., HOESS, R., & STERNBERG, N. (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* **32**(4), 1301-1311.
- AGGARWAL, S. K. & MACKINNON, R. (1996). Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* **16**(6), 1169-1177.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., & LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215**(3), 403-410.
- ARMSTRONG, C. M. (1975). Evidence for ionic pores in excitable membranes. *Biophys.J.* **15**(9), 932-933.
- ARMSTRONG, C. M. (1971). Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J.Gen.Physiol* **58**(4), 413-437.
- ARMSTRONG, C. M., SWENSON, R. P., JR., & TAYLOR, S. R. (1982). Block of squid axon K channels by internally and externally applied barium ions. *J.Gen.Physiol* **80**(5), 663-682.
- ATKINSON, N. S., ROBERTSON, G. A., & GANETZKY, B. (1991). A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science* **253**(5019), 551-555.
- AVERY, O., MACLEOD, C., & MCCARTY, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J.experim.Med.* **79**, 137-158.
- BEDDINGTON, R. S. & ROBERTSON, E. J. (1989). An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* **105**(4), 733-737.
- BERNARD, C., ANDERSON, A., BECKER, A., POOLOS, N. P., BECK, H., & JOHNSTON, D. (2004). Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science* **305**(5683), 532-535.
- BHATTACHARJEE, A., GAN, L., & KACZMAREK, L. K. (2002). Localization of the Slack potassium channel in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **454**(3), 241-54.
- BHATTACHARJEE, A., JOINER, W. J., WU, M., YANG, Y., SIGWORTH, F. J., & KACZMAREK, L. K. (2003). Slick (Slo2.1), a rapidly-gating sodium-activated potassium channel inhibited by ATP. *J Neurosci* **23**(37), 11681-91.
- BHATTACHARJEE, A., VON HEHN, C. A., MEI, X., & KACZMAREK, L. K. (2005). Localization of the Na⁺-activated K⁺ channel Slick in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **484**(1), 80-92.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**(6), 1513-1523.
- BLATZ, A. L. & MAGLEBY, K. L. (1984). Ion conductance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J.Gen.Physiol* **84**(1), 1-23.

- BRADDING, P. & CONLEY, E. C. (2002). Human mast cell ion channels. *Clin.Exp.Allergy* **32**(7), 979-983.
- BRENNER, R., JEGLA, T. J., WICKENDEN, A., LIU, Y., & ALDRICH, R. W. (2000). Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J.Biol.Chem.* **275**(9), 6453-6461.
- BUTLER, A., TSUNODA, S., MCCOBB, D. P., WEI, A., & SALKOFF, L. (1993). mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science* **261**(5118), 221-224.
- CAPECCHI, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**(4910), 1288-1292.
- CARLE, G. F., FRANK, M., & OLSON, M. V. (1986). Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* **232**(4746), 65-68.
- CHU, G., HAYAKAWA, H., & BERG, P. (1987). Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res.* **15**(3), 1311-1326.
- CLARK, J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **16**(20), 9677-9686.
- COETZEE, W. A., AMARILLO, Y., CHIU, J., CHOW, A., LAU, D., MCCORMACK, T., MORENO, H., NADAL, M. S., OZAITA, A., POUNTNEY, D., SAGANICH, M., VEGA-SAENZ DE, M. E., & RUDY, B. (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **868**, 233-285.
- DALE, N. (1993). A large, sustained Na⁽⁺⁾- and voltage-dependent K⁺ current in spinal neurons of the frog embryo. *J.Physiol* **462**, 349-372.
- DAVIES, J. & JIMENEZ, A. (1980). A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **29**(5 Suppl), 1089-1092.
- DAVIS, S., ALDRICH, T. H., STAHL, N., PAN, L., TAGA, T., KISHIMOTO, T., IP, N. Y., & YANCOPOULOS, G. D. (1993). LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* **260**(5115), 1805-1808.
- DIAZ, L., MEERA, P., AMIGO, J., STEFANI, E., ALVAREZ, O., TORO, L., & LATORRE, R. (1998). Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hSlo) channel. *J.Biol.Chem.* **273**(49), 32430-32436.
- DOYLE, D. A., MORAIS, C. J., PFUETZNER, R. A., KUO, A., GULBIS, J. M., COHEN, S. L., CHAIT, B. T., & MACKINNON, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**(5360), 69-77.
- DRYER, S. E. (1991). Na⁽⁺⁾-activated K⁺ channels and voltage-evoked ionic currents in brain stem and parasympathetic neurones of the chick. *J.Physiol* **435**, 513-532.
- DRYER, S. E., FUJII, J. T., & MARTIN, A. R. (1989). A Na⁺-activated K⁺ current in cultured brain stem neurones from chicks. *J.Physiol* **410**, 283-296.

- DU, W., BAUTISTA, J. F., YANG, H., EZ-SAMPEDRO, A., YOU, S. A., WANG, L., KOTAGAL, P., LUDERS, H. O., SHI, J., CUI, J., RICHERSON, G. B., & WANG, Q. K. (2005). Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat.Genet.* **37**(7), 733-738.
- EGAN, T. M., DAGAN, D., KUPPER, J., & LEVITAN, I. B. (1992). Properties and rundown of sodium-activated potassium channels in rat olfactory bulb neurons. *J.Neurosci.* **12**(5), 1964-1976.
- ELKINS, T., GANETZKY, B., & WU, C. F. (1986). A *Drosophila* mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**(21), 8415-8419.
- EVANS, M. J. & KAUFMAN, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**(5819), 154-156.
- EXTON, J. H. (1996). Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **36**, 481-509.
- FEDOROV, L. M., HAEGEL-KRONENBERGER, H., & HIRCHENHAIN, J. (1997). A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. *Transgenic Res.* **6**(3), 223-231.
- FEINBERG, A. P. & VOGELSTEIN, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal.Biochem.* **137**(1), 266-267.
- FEINBERG, A. P. & VOGELSTEIN, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* **132**(1), 6-13.
- GALVEZ, A., GIMENEZ-GALLEGO, G., REUBEN, J. P., ROY-CONTANCIN, L., FEIGENBAUM, P., KACZOROWSKI, G. J., & GARCIA, M. L. (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J.Biol.Chem.* **265**(19), 11083-11090.
- GEARING, D. P., THUT, C. J., VANDEBOS, T., GIMPEL, S. D., DELANEY, P. B., KING, J., PRICE, V., COSMAN, D., & BECKMANN, M. P. (1991). Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J.* **10**(10), 2839-2848.
- GELFAND, M. S. (1990). Computer prediction of the exon-intron structure of mammalian pre-mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **18**(19), 5865-5869.
- GLASER, S., ANASTASSIADIS, K., & STEWART, A. F. (2005). Current issues in mouse genome engineering. *Nat.Genet.* **37**(11), 1187-1193.
- GOLDMAN, D. E. (1943). Potential, impedance, and rectification in membranes. *Journal of General Physiology* **27**, 37-60.
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C., & NAIRN, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* **36**(1), 59-74.
- GRIBKOFF, V. K., STARRETT, J. E., JR., & DWORETZKY, S. I. (2001). Maxi-K potassium channels: form, function, and modulation of a class of endogenous regulators of intracellular calcium. *Neuroscientist.* **7**(2), 166-177.

- GU, H., MARTH, J. D., ORBAN, P. C., MOSSMANN, H., & RAJEWSKY, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265**(5168), 103-106.
- GUAZZI, M., OLIVARI, M. T., POLESE, A., FIORENTINI, C., MAGRINI, F., & MORUZZI, P. (1977). Nifedipine, a new antihypertensive with rapid action. *Clin.Pharmacol.Ther.* **22**(5 Pt 1), 528-532.
- HASTY, P., RIVERA-PEREZ, J., & BRADLEY, A. (1991). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol.Cell Biol.* **11**(11), 5586-5591.
- HEGINBOTHAM, L., LU, Z., ABRAMSON, T., & MACKINNON, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys.J.* **66**(4), 1061-1067.
- HOGAN, B., BEDDINGTON, R. S., CONSTANTINI, F., & LACY, E. Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual (second edition). 2000. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Ref Type: Generic
- HOLZENBERGER, M., LENZNER, C., LENEUVE, P., ZAOUI, R., HAMARD, G., VAULONT, S., & BOUC, Y. L. (2000). Cre-mediated germline mosaicism: a method allowing rapid generation of several alleles of a target gene. *Nucleic Acids Res.* **28**(21), E92.
- HORRIGAN, F. T. & ALDRICH, R. W. (1999). Allosteric voltage gating of potassium channels II. Mslo channel gating charge movement in the absence of Ca(2+). *J.Gen.Physiol* **114**(2), 305-336.
- HORRIGAN, F. T., CUI, J., & ALDRICH, R. W. (1999). Allosteric voltage gating of potassium channels I. Mslo ionic currents in the absence of Ca(2+). *J.Gen.Physiol* **114**(2), 277-304.
- HU, G. (1993). DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA Cell Biol.* **12**(8), 763-770.
- INOUE, I., NAGASE, H., KISHI, K., & HIGUTI, T. (1991). ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**(6332), 244-247.
- ISH-HOROWICZ, D. & BURKE, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**(13), 2989-2998.
- ISHII, T. M., SILVIA, C., HIRSCHBERG, B., BOND, C. T., ADELMAN, J. P., & MAYLIE, J. (1997). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**(21), 11651-11656.
- JIANG, Y., PICO, A., CADENE, M., CHAIT, B. T., & MACKINNON, R. (2001). Structure of the RCK domain from the E. coli K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* **29**(3), 593-601.
- JOHNSTON, R. F., PICKETT, S. C., & BARKER, D. L. (1990). Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis* **11**(5), 355-360.
- JOINER, W. J., TANG, M. D., WANG, L. Y., DWORETZKY, S. I., BOISSARD, C. G., GAN, L., GRIBKOFF, V. K., & KACZMAREK, L. K. (1998). Formation of intermediate-conductance calcium-activated potassium channels by interaction of Slack and Slo subunits. *Nat.Neurosci.* **1**(6), 462-469.

- KAMEYAMA, M., KAKEI, M., SATO, R., SHIBASAKI, T., MATSUDA, H., & IRISAWA, H. (1984). Intracellular Na⁺ activates a K⁺ channel in mammalian cardiac cells. *Nature* **309**(5966), 354-356.
- KLENCHIN, V. A., SUKHAREV, S. I., SEROV, S. M., CHERNOMORDIK, L. V., & CHIZMADZHEV, Y. (1991). Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys.J.* **60**(4), 804-811.
- KNAUS, H. G., FOLANDER, K., GARCIA-CALVO, M., GARCIA, M. L., KACZOROWSKI, G. J., SMITH, M., & SWANSON, R. (1994). Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel from smooth muscle. *J.Biol.Chem.* **269**(25), 17274-17278.
- KOLLER, B. H., HAGEMANN, L. J., DOETSCHMAN, T., HAGAMAN, J. R., HUANG, S., WILLIAMS, P. J., FIRST, N. L., MAEDA, N., & SMITHIES, O. (1989). Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**(22), 8927-8931.
- LAKSO, M., PICHEL, J. G., GORMAN, J. R., SAUER, B., OKAMOTO, Y., LEE, E., ALT, F. W., & WESTPHAL, H. (1996). Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**(12), 5860-5865.
- LAZDUNSKI, M., FRELIN, C., & VIGNE, P. (1985). The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J.Mol.Cell Cardiol.* **17**(11), 1029-1042.
- LUK, H. N. & CARMELIET, E. (1990). Na(+)-activated K⁺ current in cardiac cells: rectification, open probability, block and role in digitalis toxicity. *Pflugers Arch.* **416**(6), 766-768.
- MANSOUR, S. L., THOMAS, K. R., & CAPECCHI, M. R. (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**(6197), 348-352.
- MARTIN, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78**(12), 7634-7638.
- MARTY, A. (1981). Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* **291**(5815), 497-500.
- MCMANUS, O. B. & MAGLEBY, K. L. (1991). Accounting for the Ca(2+)-dependent kinetics of single large-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in rat skeletal muscle. *J.Physiol* **443**, 739-777.
- MEERA, P., WALLNER, M., SONG, M., & TORO, L. (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**(25), 14066-14071.
- MEREDITH, A. L., THORNELOE, K. S., WERNER, M. E., NELSON, M. T., & ALDRICH, R. W. (2004). Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J.Biol.Chem.* **279**(35), 36746-36752.

- MILLER, C. (2000a). An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* **1**(4), REVIEWS0004.
- MILLER, C. (2000b). Ion channels: doing hard chemistry with hard ions. *Curr.Opin.Chem.Biol.* **4**(2), 148-151.
- MILLER, C., MOCZYDLOWSKI, E., LATORRE, R., & PHILLIPS, M. (1985). Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* **313**(6000), 316-318.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- NAGY, A., ROSSANT, J., NAGY, R., BRAMOW-NEWERLY, W., & RODER, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**(18), 8424-8428.
- NEHER, E. & SAKMANN, B. (1976). Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *J.Physiol* **258**(3), 705-729.
- NEUMANN, E., SCHAEFER-RIDDER, M., WANG, Y., & HOFSCHEIDER, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1**(7), 841-845.
- ORIO, P., ROJAS, P., FERREIRA, G., & LATORRE, R. (2002). New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci.* **17**, 156-161.
- PALCZEWSKI, K., KUMASAKA, T., HORI, T., BEHNKE, C. A., MOTOSHIMA, H., FOX, B. A., LE, T., I, TELLER, D. C., OKADA, T., STENKAMP, R. E., YAMAMOTO, M., & MIYANO, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**(5480), 739-745.
- PALLOTTA, B. S., MAGLEBY, K. L., & BARRETT, J. N. (1981). Single channel recordings of Ca²⁺-activated K⁺ currents in rat muscle cell culture. *Nature* **293**(5832), 471-474.
- PLASTERK, R. H. & GROENEN, J. T. (1992). Targeted alterations of the *Caenorhabditis elegans* genome by transgene instructed DNA double strand break repair following Tc1 excision. *EMBO J.* **11**(1), 287-290.
- RAJEWSKY, K., GU, H., KUHN, R., BETZ, U. A., MULLER, W., ROES, J., & SCHWENK, F. (1996). Conditional gene targeting. *J.Clin.Invest* **98**(3), 600-603.
- ROMMENS, J. M., IANNUZZI, M. C., KEREM, B., DRUMM, M. L., MELMER, G., DEAN, M., ROZMAHEL, R., COLE, J. L., KENNEDY, D., HIDAKA, N., & . (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**(4922), 1059-1065.
- RONG, Y. S. & GOLIC, K. G. (2001). A targeted gene knockout in *Drosophila*. *Genetics* **157**(3), 1307-1312.
- RUTTIGER, L., SAUSBIER, M., ZIMMERMANN, U., WINTER, H., BRAIG, C., ENGEL, J., KNIRSCH, M., ARNTZ, C., LANGER, P., HIRT, B., MULLER, M., KOPSCHALL, I., PFISTER, M., MUNKNER, S., ROHBOCK, K., PFAFF, I., RUSCH, A., RUTH, P., & KNIPPER, M. (2004). Deletion of the Ca²⁺-activated potassium (BK) alpha-subunit but not the BKbeta1-subunit leads to progressive hearing loss. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**(35), 12922-12927.

- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., & ERLICH, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839), 487-491.
- SALKOFF, L., BUTLER, A., FERREIRA, G., SANTI, C., & WEI, A. (2006). High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat.Rev.Neurosci.* **7**(12), 921-931.
- SANGER, F., NICKLEN, S., & COULSON, A. R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**, 104-108.
- SANTI, C. M., FERREIRA, G., YANG, B., GAZULA, V. R., BUTLER, A., WEI, A., KACZMAREK, L. K., & SALKOFF, L. (2006). Opposite regulation of Slick and Slack K⁺ channels by neuromodulators. *J Neurosci* **26**(19), 5059-68.
- SAUSBIER, M., ARNTZ, C., BUCURENCIU, I., ZHAO, H., ZHOU, X. B., SAUSBIER, U., FEIL, S., KAMM, S., ESSIN, K., SAILER, C. A., ABDULLAH, U., KRIPPEIT-DREWS, P., FEIL, R., HOFMANN, F., KNAUS, H. G., KENYON, C., SHIPSTON, M. J., STORM, J. F., NEUHUBER, W., KORTH, M., SCHUBERT, R., GOLLASCH, M., & RUTH, P. (2005). Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* **112**(1), 60-68.
- SAUSBIER, M., HU, H., ARNTZ, C., FEIL, S., KAMM, S., ADELSBERGER, H., SAUSBIER, U., SAILER, C. A., FEIL, R., HOFMANN, F., KORTH, M., SHIPSTON, M. J., KNAUS, H. G., WOLFER, D. P., PEDROARENA, C. M., STORM, J. F., & RUTH, P. (2004). Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**(25), 9474-9478.
- SAVALLI, N., KONDRATIEV, A., TORO, L., & OLCESE, R. (2006). Voltage-dependent conformational changes in human Ca(2+)- and voltage-activated K(+) channel, revealed by voltage-clamp fluorometry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**(33), 12619-12624.
- SCHEIN H.M. & ENDERS J.F (1962). Transformation induced by Simian Virus 40 in human renal cell cultures. I.Morphology and Growth characteristics. *PNAS* **48**, 1164-1172.
- SCHREIBER, M. & SALKOFF, L. (1997). A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys.J.* **73**(3), 1355-1363.
- SCHREIBER, M., WEI, A., YUAN, A., GAUT, J., SAITO, M., & SALKOFF, L. (1998). Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. *J.Biol.Chem.* **273**(6), 3509-3516.
- SCHREIBER, M., YUAN, A., & SALKOFF, L. (1999). Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat.Neurosci.* **2**(5), 416-421.
- SCHWARTZ, D. C. & CANTOR, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**(1), 67-75.
- SCHWINDT, P. C., SPAIN, W. J., & CRILL, W. E. (1989). Long-lasting reduction of excitability by a sodium-dependent potassium current in cat neocortical neurons. *J.Neurophysiol.* **61**(2), 233-244.

- SEOH, S. A., SIGG, D., PAPAZIAN, D. M., & BEZANILLA, F. (1996). Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* **16**(6), 1159-1167.
- SHEN, K. Z., LAGRUTTA, A., DAVIES, N. W., STANDEN, N. B., ADELMAN, J. P., & NORTH, R. A. (1994). Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflugers Arch.* **426**(5), 440-445.
- SHEPHERD, J. C. (1981). Method to determine the reading frame of a protein from the purine/pyrimidine genome sequence and its possible evolutionary justification. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78**(3), 1596-1600.
- SIGWORTH, F. J. (2003). Structural biology: Life's transistors. *Nature* **423**(6935), 21-22.
- SMITH, A. G., HEATH, J. K., DONALDSON, D. D., WONG, G. G., MOREAU, J., STAHL, M., & ROGERS, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**(6200), 688-690.
- SOUTHERN, E. M. (1992). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. 1975. *Biotechnology* **24**, 122-139.
- STRYER, L. & BOURNE, H. R. (1986). G proteins: a family of signal transducers. *Annu.Rev.Cell Biol.* **2**, 391-419.
- SUKHAREV, S. I., KLENCHIN, V. A., SEROV, S. M., CHERNOMORDIK, L. V., & CHIZMADZHEV, Y. (1992). Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys.J.* **63**(5), 1320-1327.
- SUZUKI, H., KAMADA, N., UEDA, O., JISHAGE, K., KURIHARA, Y., KURIHARA, H., TERAUCHI, Y., AZUMA, S., KADOWAKI, T., KODAMA, T., YAZAKI, Y., & TOYODA, Y. (1997). Germ-line contribution of embryonic stem cells in chimeric mice: influence of karyotype and in vitro differentiation ability. *Exp.Anim* **46**(1), 17-23.
- THOMAS, K. R. & CAPECCHI, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**(3), 503-512.
- THOMAS, K. R., FOLGER, K. R., & CAPECCHI, M. R. (1986). High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* **44**(3), 419-428.
- TSENG-CRANK, J., FOSTER, C. D., KRAUSE, J. D., MERTZ, R., GODINOT, N., DICHIARA, T. J., & REINHART, P. H. (1994). Cloning, expression, and distribution of functionally distinct Ca(2+)-activated K⁺ channel isoforms from human brain. *Neuron* **13**(6), 1315-1330.
- TSENG-CRANK, J., GODINOT, N., JOHANSEN, T. E., AHRING, P. K., STROBAEK, D., MERTZ, R., FOSTER, C. D., OLESEN, S. P., & REINHART, P. H. (1996). Cloning, expression, and distribution of a Ca(2+)-activated K⁺ channel beta-subunit from human brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**(17), 9200-9205.
- VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W., LI, P. W., MURAL, R. J., SUTTON, G. G., SMITH, H. O., YANDELL, M., EVANS, C. A., HOLT, R. A., GOCAYNE, J. D., AMANATIDES, P., BALLEW, R. M., HUSON, D. H., WORTMAN, J. R., ZHANG, Q., KODIRA, C. D., ZHENG, X. H., CHEN, L., SKUPSKI, M., SUBRAMANIAN, G., THOMAS, P. D., ZHANG, J., GABOR MIKLOS, G. L.,

- NELSON, C., BRODER, S., CLARK, A. G., NADEAU, J., MCKUSICK, V. A., ZINDER, N., LEVINE, A. J., ROBERTS, R. J., SIMON, M., SLAYMAN, C., HUNKAPILLER, M., BOLANOS, R., DELCHER, A., DEW, I., FASULO, D., FLANIGAN, M., FLOREA, L., HALPERN, A., HANNENHALLI, S., KRAVITZ, S., LEVY, S., MOBARRY, C., REINERT, K., REMINGTON, K., BUTHREIDEH, J., BEASLEY, E., BIDDICK, K., BONAZZI, V., BRANDON, R., CARGILL, M., CHANDRAMOULISWARAN, I., CHARLAB, R., CHATURVEDI, K., DENG, Z., DI, F., V. DUNN, P., EILBECK, K., EVANGELISTA, C., GABRIELIAN, A. E., GAN, W., GE, W., GONG, F., GU, Z., GUAN, P., HEIMAN, T. J., HIGGINS, M. E., JI, R. R., KE, Z., KETCHUM, K. A., LAI, Z., LEI, Y., LI, Z., LI, J., LIANG, Y., LIN, X., LU, F., MERKULOV, G. V., MILSHINA, N., MOORE, H. M., NAIK, A. K., NARAYAN, V. A., NEELAM, B., NUSSKERN, D., RUSCH, D. B., SALZBERG, S., SHAO, W., SHUE, B., SUN, J., WANG, Z., WANG, A., WANG, X., WANG, J., WEI, M., WIDES, R., XIAO, C., YAN, C., YAO, A., YE, J., ZHAN, M., ZHANG, W., ZHANG, H., ZHAO, Q., ZHENG, L., ZHONG, F., ZHONG, W., ZHU, S., ZHAO, S., GILBERT, D., BAUMHUETER, S., SPIER, G., CARTER, C., CRAVCHIK, A., WOODAGE, T., ALI, F., AN, H., AWE, A., BALDWIN, D., BADEN, H., BARNSTEAD, M., BARROW, I., BEESON, K., BUSAM, D., CARVER, A., CENTER, A., CHENG, M. L., CURRY, L., DANAHER, S., DAVENPORT, L., DESILETS, R., DIETZ, S., DODSON, K., DOUP, L., FERRIERA, S., GARG, N., GLUECKSMANN, A., HART, B., HAYNES, J., HAYNES, C., HEINER, C., HLADUN, S., HOSTIN, D., HOUCK, J., HOWLAND, T., IBEGWAM, C., JOHNSON, J., KALUSH, F., KLINE, L., KODURU, S., LOVE, A., MANN, F., MAY, D., MCCAWLEY, S., MCINTOSH, T., MCMULLEN, I., MOY, M., MOY, L., MURPHY, B., NELSON, K., PFANNKOCH, C., PRATTS, E., PURI, V., QURESHI, H., REARDON, M., RODRIGUEZ, R., ROGERS, Y. H., ROMBLAD, D., RUHFEL, B., SCOTT, R., SITTER, C., SMALLWOOD, M., STEWART, E., STRONG, R., SUH, E., THOMAS, R., TINT, N. N., TSE, S., VECH, C., WANG, G., WETTER, J., WILLIAMS, S., WILLIAMS, M., WINDSOR, S., WINN-DEEN, E., WOLFE, K., ZAVERI, J., ZAVERI, K., ABRIL, J. F., GUIGO, R., CAMPBELL, M. J., SJOLANDER, K. V., KARLAK, B., KEJARIWAL, A., MI, H., LAZAREVA, B., HATTON, T., NARECHANIA, A., DIEMER, K., MURUGANUJAN, A., GUO, N., SATO, S., BAFNA, V., ISTRAIL, S., LIPPERT, R., SCHWARTZ, R., WALENZ, B., YOOSEPH, S., ALLEN, D., BASU, A., BAXENDALE, J., BLICK, L., CAMINHA, M., CARNES-STINE, J., CAULK, P., CHIANG, Y. H., COYNE, M., DAHLKE, C., MAYS, A., DOMBROSKI, M., DONNELLY, M., ELY, D., ESPARHAM, S., FOSLER, C., GIRE, H., GLANOWSKI, S., GLASSER, K., GLODEK, A., GOROKHOV, M., GRAHAM, K., GROPMAN, B., HARRIS, M., HEIL, J., HENDERSON, S., HOOVER, J., JENNINGS, D., JORDAN, C., JORDAN, J., KASHA, J., KAGAN, L., KRAFT, C., LEVITSKY, A., LEWIS, M., LIU, X., LOPEZ, J., MA, D., MAJOROS, W., MCDANIEL, J., MURPHY, S., NEWMAN, M., NGUYEN, T., NGUYEN, N., & NODELL, M. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**(5507), 1304-1351.
- VOGELSTEIN, B. & GILLESPIE, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**(2), 615-619.
- WALLNER, M., MEERA, P., & TORO, L. (1999). Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**(7), 4137-4142.
- WATERSTON, R. H., LINDBLAD-TOH, K., BIRNEY, E., ROGERS, J., ABRIL, J. F., AGARWAL, P., AGARWALA, R., AINSCOUGH, R., ALEXANDERSSON, M., AN, P., ANTONARAKIS, S. E., ATTWOOD, J., BAERTSCH, R., BAILEY, J., BARLOW, K., BECK, S., BERRY, E., BIRREN, B., BLOOM, T., BORK, P., BOTCHERBY, M., BRAY, N., BRENT, M. R., BROWN, D. G., BROWN, S. D., BULT, C., BURTON, J., BUTLER, J., CAMPBELL, R. D., CARNINCI, P., CAWLEY, S., CHIAROMONTE, F., CHINWALLA, A. T., CHURCH, D. M.,

- CLAMP, M., CLEE, C., COLLINS, F. S., COOK, L. L., COPLEY, R. R., COULSON, A., COURONNE, O., CUFF, J., CURWEN, V., CUTTS, T., DALY, M., DAVID, R., DAVIES, J., DELEHAUNTY, K. D., DERI, J., DERMITZAKIS, E. T., DEWEY, C., DICKENS, N. J., DIEKHANS, M., DODGE, S., DUBCHAK, I., DUNN, D. M., EDDY, S. R., ELNITSKI, L., EMES, R. D., ESWARA, P., EYRAS, E., FELSENFELD, A., FEWELL, G. A., FLICEK, P., FOLEY, K., FRANKEL, W. N., FULTON, L. A., FULTON, R. S., FUREY, T. S., GAGE, D., GIBBS, R. A., GLUSMAN, G., GNERRE, S., GOLDMAN, N., GOODSTADT, L., GRAFHAM, D., GRAVES, T. A., GREEN, E. D., GREGORY, S., GUIGO, R., GUYER, M., HARDISON, R. C., HAUSSLER, D., HAYASHIZAKI, Y., HILLIER, L. W., HINRICHS, A., HLAVINA, W., HOLZER, T., HSU, F., HUA, A., HUBBARD, T., HUNT, A., JACKSON, I., JAFFE, D. B., JOHNSON, L. S., JONES, M., JONES, T. A., JOY, A., KAMAL, M., KARLSSON, E. K., KAROLCHIK, D., KASPRZYK, A., KAWAI, J., KEIBLER, E., KELLS, C., KENT, W. J., KIRBY, A., KOLBE, D. L., KORF, I., KUCHERLAPATI, R. S., KULBOKAS, E. J., KULP, D., LANDERS, T., LEGER, J. P., LEONARD, S., LETUNIC, I., LEVINE, R., LI, J., LI, M., LLOYD, C., LUCAS, S., MA, B., MAGLOTT, D. R., MARDIS, E. R., MATTHEWS, L., MAUCELI, E., MAYER, J. H., MCCARTHY, M., MCCOMBIE, W. R., MCLAREN, S., MCLAY, K., MCPHERSON, J. D., MELDRIM, J., MEREDITH, B., MESIROV, J. P., MILLER, W., MINER, T. L., MONGIN, E., MONTGOMERY, K. T., MORGAN, M., MOTT, R., MULLIKIN, J. C., MUZNY, D. M., NASH, W. E., NELSON, J. O., NHAN, M. N., NICOL, R., NING, Z., NUSBAUM, C., O'CONNOR, M. J., OKAZAKI, Y., OLIVER, K., OVERTON-LARTY, E., PACHTER, L., PARRA, G., PEPIN, K. H., PETERSON, J., PEVZNER, P., PLUMB, R., POHL, C. S., POLIAKOV, A., PONCE, T. C., PONTING, C. P., POTTER, S., QUAIL, M., REYMOND, A., ROE, B. A., ROSKIN, K. M., RUBIN, E. M., RUST, A. G., SANTOS, R., SAPOJNIKOV, V., SCHULTZ, B., SCHULTZ, J., SCHWARTZ, M. S., SCHWARTZ, S., SCOTT, C., SEAMAN, S., SEARLE, S., SHARPE, T., SHERIDAN, A., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., SINGER, J. B., SLATER, G., SMIT, A., SMITH, D. R., SPENCER, B., STABENAU, A., STANGE-THOMANN, N., SUGNET, C., SUYAMA, M., TESLER, G., THOMPSON, J., TORRENTS, D., TREVASKIS, E., TROMP, J., UCLA, C., URETA-VIDAL, A., VINSON, J. P., VON NIEDERHAUSERN, A. C., WADE, C. M., WALL, M., WEBER, R. J., WEISS, R. B., WENDL, M. C., WEST, A. P., WETTERSTRAND, K., WHEELER, R., WHELAN, S., WIERZBOWSKI, J., WILLEY, D., WILLIAMS, S., WILSON, R. K., WINTER, E., WORLEY, K. C., WYMAN, D., YANG, S., YANG, S. P., ZDOBNOV, E. M., ZODY, M. C., & LANDER, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**(6915), 520-562.
- WERNER, M. E., ZVARA, P., MEREDITH, A. L., ALDRICH, R. W., & NELSON, M. T. (2005). Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel. *J.Physiol* **567**(Pt 2), 545-556.
- WILLIAMS, R. L., HILTON, D. J., PEASE, S., WILLSON, T. A., STEWART, C. L., GEARING, D. P., WAGNER, E. F., METCALF, D., NICOLA, N. A., & GOUGH, N. M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**(6200), 684-687.
- XIA, X. M., DING, J. P., & LINGLE, C. J. (1999). Molecular basis for the inactivation of Ca²⁺- and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. *J.Neurosci.* **19**(13), 5255-5264.
- XIA, X. M., DING, J. P., ZENG, X. H., DUAN, K. L., & LINGLE, C. J. (2000). Rectification and rapid activation at low Ca²⁺ of Ca²⁺-activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel beta subunit. *J.Neurosci.* **20**(13), 4890-4903.

- XIA, X. M., ZHANG, X., & LINGLE, C. J. (2004). Ligand-dependent activation of Slo family channels is defined by interchangeable cytosolic domains. *J.Neurosci.* **24**(24), 5585-5591.
- XU, X., LI, C., GARRETT-BEAL, L., LARSON, D., WYNSHAW-BORIS, A., & DENG, C. X. (2001). Direct removal in the mouse of a floxed neo gene from a three-loxP conditional knockout allele by two novel approaches. *Genesis.* **30**(1), 1-6.
- YANG, B., DESAI, R., & KACZMAREK, L. K. (2007). Slack and Slick K(Na) channels regulate the accuracy of timing of auditory neurons. *J.Neurosci.* **27**(10), 2617-2627.
- YUAN, A., DOURADO, M., BUTLER, A., WALTON, N., WEI, A., & SALKOFF, L. (2000). SLO-2, a K⁺ channel with an unusual Cl⁻ dependence. *Nat Neurosci* **3**(8), 771-9.
- YUAN, A., SANTI, C. M., WEI, A., WANG, Z. W., POLLAK, K., NONET, M., KACZMAREK, L., CROWDER, C. M., & SALKOFF, L. (2003). The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. *Neuron* **37**(5), 765-773.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2003 bis Juni 2007 unter wissenschaftlicher Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Peter Ruth am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Ruth für die Bereitstellung des Themas und die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis. Mit seinen hervorragenden Kenntnissen auf dem Gebiet der Molekularbiologie stand er mir stets hilfreich zur Seite und weckte dadurch mein Interesse an dieser spannenden Forschungsdisziplin.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Oliver Werz für die Erstellung des Zweitgutachtens, Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und Frau PD Dr. Martina Düfer als weiteres Mitglied der Prüfungskommission.

Herrn PD Dr. Matthias Sausbier und Dr. Ulrike Sausbier danke ich für ihre Unterstützung bei allem, was die Kultur embryonaler Stammzellen betrifft, sowie für die Durchführung der Blastozysteninjektionen.

Ein großer Dank gilt im Besonderen Isolde und Clement. Durch die beiden „Guten Seelen des Labors“ war dieses immer bestens mit Geräten und Material ausgestattet. Mit einer großen Portion ansteckender Fröhlichkeit und guter Laune brachten sie Farbe in den manchmal recht grauen Laboralltag.

Ich danke weiterhin allen meinen anderen Kolleginnen und Kollegen der Pharmakologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die gemeinsamen Erlebnisse innerhalb und außerhalb der Labormauern. Ohne dieses Miteinander und die gegenseitige Unterstützung in schwierigen Phasen, wäre es kaum möglich gewesen, diese Arbeit durchzuführen.

Meine akademischen Lehrer an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg waren:

Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories

Prof. Dr. Andreas Bechtholt

Prof. Dr. August W. Frahm

Prof. Dr. Rolf Jackisch

Prof. Dr. Irmgard Merfort

Prof. Dr. Dieter Meyer

Prof. Dr. Rolf Schubert

Prof. Dr. Horst Rimpler

Prof. Dr. Klaus Starke

Prof. Dr. Bela Szábo

Prof. Dr. Bernhard Wünsch

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Claus Gassner
Geburtsdatum	07.09.1976
Geburtsort	Bad Waldsee
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig

Schulbildung

09/ 1983- 07/ 1987	Eugen-Bolz-Schule, Bad Waldsee
09/ 1987- 07/ 1996	Döchtbühlgymnasium, Bad Waldsee

Studium und beruflicher Werdegang

10/ 1997- 03/ 2002	Pharmaziestudium, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
03/ 2000	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
03/ 2002	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
05/ 2002- 10/ 2002	Praktikum, Caritas-Krankenhaus St. Josef, Regensburg
11/ 2002- 04/ 2003	Praktikum, Schnetztor-Apotheke, Konstanz
06/ 2003	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Approbation als Apotheker
06/ 2003- 08/ 2003	Angestellter Apotheker, Nikolaus-Apotheke, Allensbach
09/ 2003- 06/ 2007	Dissertation bei Herrn Prof. Dr. Peter Ruth, Pharmazeutisches Institut, Pharmakologie & Toxikologie, Universität Tübingen, zum Thema: Genetische Ablation des Na ⁺ -und Cl ⁻ -abhängigen K ⁺ -Kanals Slo2.1 (SLICK) in der Maus.