

**Genetische Ablation von Pde6h und Kcnv2 in der Maus
zur Generierung neuer Modellsysteme für
hereditäre Netzhauterkrankungen**

DISSERTATION

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2010

vorgelegt von

Christina Brennenstuhl

Tag der mündlichen Prüfung:

20. April 2010

Dekan:

Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Bernd Wissinger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Auge und Netzhaut.....	1
1.1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen.....	1
1.1.2 Erbliche Netzhauterkrankungen	5
1.2 Phosphodiesterasen.....	7
1.2.1 Allgemeine Einteilung	7
1.2.2 Regulation über GAF-Domänen	7
1.2.3 Die PDE6-Familie.....	8
1.3 Kaliumkanäle.....	12
1.3.1 Allgemeines zu Kaliumkanälen.....	12
1.3.2 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle.....	13
1.3.3 KCNV2	15
1.4 Tiermodelle.....	16
1.4.1 <i>knockout</i> -Tiermodelle in der pharmakologischen Forschung	16
1.4.2 Gentechnisch modifizierte Mäuse durch homologe Rekombination	16
1.4.3 Tiermodelle für erbliche Netzhauterkrankungen.....	22
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	24
2 Material.....	25
2.1 Chemikalien.....	25
2.2 Kit-Systeme	26
2.2.1 DNS-Isolierung	26
2.2.2 Klonierung	26
2.2.3 PCR.....	26
2.2.4 Southern Blotting.....	26
2.3 Enzyme	27
2.3.1 Restriktionsendonukleasen	27
2.3.2 Polymerasen	27
2.3.3 DNS modifizierende Enzyme.....	27
2.3.4 Sonstige Enzyme.....	27
2.4 Oligonukleotide.....	28
2.5 Plasmide und BACs.....	29
2.6 Bakterien	30

2.7	Lösungen für die Stammzellkultur	30
2.8	Verbrauchsmaterial	30
2.8.1	Molekularbiologie	30
2.8.2	Zellkultur.....	31
2.8.3	Sonstiges Material.....	31
2.9	Wasser	31
2.10	Geräte	32
3	Methoden	34
3.1	Bakterienkultur	34
3.1.1	Medien.....	34
3.1.2	Kultivierung.....	35
3.1.3	Langzeitlagerung	35
3.2	Molekularbiologische Methoden	35
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNS.....	35
3.2.2	Isolierung genomischer DNS.....	39
3.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
3.2.4	Reinigung von Nukleinsäuren.....	42
3.2.5	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	43
3.2.6	Klonierung und Transformation	45
3.2.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	48
3.2.8	Amplifizierung von DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
3.2.9	Sequenzierung von DNS	54
3.2.10	Southern Blot.....	55
3.3	Methoden der Stammzellkultur	60
3.3.1	Erzeugung gentechnisch veränderter Stammzellen durch <i>gene-targeting</i>	60
3.3.2	Generelles zur Kultivierung embryonaler Stammzellen	60
3.3.3	Gewinnung und Kultur embryonaler Fibroblasten (Feederzellen)	63
3.3.4	Gewinnung embryonaler Stammzellen.....	66
3.3.5	Kultivierung embryonaler Stammzellen	67
3.3.6	Injektion genetisch veränderter Stammzellen in Blastozysten.....	83
3.4	Zucht gentechnisch veränderter Mäuse	84
3.4.1	Allgemeines zur Zucht der Mäuse	84
3.4.2	Testung der Chimären auf Keimbahngängigkeit	84
3.4.3	Etablierung von <i>knockout</i> -Mauslinien	85
3.4.4	Gendeletion durch Einkreuzen von „Cre-Deleter“-Mäusen.....	86

3.4.5	Genotypisierung mittels PCR	87
3.5	Methoden zur Herstellung von Antikörpern	92
3.5.1	PeptidAuswahl und –synthese	92
3.5.2	Antikörperproduktion in Kaninchen.....	92
4	Ergebnisse I (Pde6h-knockout).....	93
4.1	Entwicklung der <i>knockout</i> -Strategie	93
4.1.1	Erstellung einer Gen-Karte	93
4.1.2	<i>knockout</i> -Strategie.....	93
4.1.3	Nachweise der homologen Rekombination	96
4.1.4	Nachweis der Cre-Rekombination	98
4.2	Klonierung des Targeting-Konstrukts	99
4.2.1	BAC-Bibliothek-Analyse	99
4.2.2	Herstellung von Hilfsvektoren	100
4.2.3	Konstruktion des Targeting-Vektors	102
4.3	Herstellung und Testung der Sonden.....	109
4.3.1	5´-Sonde.....	109
4.3.2	3´-Sonde.....	109
4.4	Gentechnische Modifikation embryonaler Stammzellen	110
4.4.1	Das 1. Targeting	110
4.4.2	Das 2. Targeting	113
4.4.3	Blastozysteninjektion	120
4.5	Etablierung der <i>knockout</i> -Mauslinie	121
4.5.1	Verpaarung der Chimären	121
4.5.2	Gendeletion mit „Cre-Deleter“-Mäusen.....	122
4.5.3	Auskreuzen des Cre-Transgens	123
4.5.4	Etablierung der konstitutiven Pde6h- <i>knockout</i> -Linie.....	123
4.6	Generierung eines Pde6h-spezifischen Peptid-Antikörpers	124
4.6.1	Peptiddesign.....	124
4.6.2	Immunisierung von Kaninchen und Test der Antiseren	125
4.7	Analyse des retinalen Phänotyps	126
4.7.1	Immunhistochemische Analyse	126
4.7.2	Visuelle Funktionsanalyse mittels Elektroretinogramm.....	128
4.7.3	<i>in vivo</i> morphologische Analysen mittels SLO und OCT	131
5	Ergebnisse II (Kcnv2-knockout-lacZ-knockin).....	133
5.1	Vorarbeiten	133
5.1.1	<i>knockout</i> -Strategie.....	133

5.1.2	Nachweis der homologen Rekombination	134
5.1.3	Nachweis der Cre-Rekombination	134
5.2	Testung der Sonden	136
5.3	Gentechnische Modifikation embryonaler Stammzellen	137
5.3.1	Das 1. Targeting	137
5.3.2	Das 2. Targeting	142
6	Diskussion	147
6.1	Mausmodelle für erbliche Netzhauterkrankungen	147
6.2	<i>Pde6h-knockout</i>	150
6.3	<i>Kcnv2-knockout/lacZ-knockin</i>	154
6.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	156
7	Literaturverzeichnis	158
	Danksagung	169
	Lebenslauf.....	172

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro- (10^{-6})
A	Absorption
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
Ca	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDSRR	Cone dystrophy with supernormal rod response
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Ci	Curie
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
CNG	Cyclic nucleotide gated
CO₂	Kohlendioxid
cpm	Counts per minute
Cre	Causes recombination
CSNB	Congenitale stationäre Nachtblindheit
d	Tag (day)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP)
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP oder dTTP)
dNTPs	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP, äquimolar
dsDNS	Doppelsträngige DNS
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EF	Embryonale Fibroblasten, „Feeder“-Zellen
ERG	Elektroretinogramm
esDNS	Einzelsträngige DNS
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FCS	Fötale Rinderserum (fetal calf serum)
fw	Forward
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GC	Guanylatcyclase
GCAP	Guanylatcyclase aktivierendes Protein
GCL	Ganglienzellschicht (ganglion cell layer)
GDP	Guanosindiphosphat
Gray	Energiedosis (1 J/kg)

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (hour)
H₂O	Wasser
HCl	Salzsäure
HV	Hilfsvektor
INL	Innere Körnerschicht (inner nuclear layer)
IPL	Innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer)
IS	Innensegmente (inner segments)
J	Joule
K⁺	Kalium-Ion
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanine
KO	Knockout
l	Liter
L1, L2, L3	Eine, zwei oder drei loxP-Seiten
LB	Luria-Bertani
LD-PCR	Long Distance-Polymerasekettenreaktion
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
loxP	Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase (locus of crossing over in phage P1)
m	Masse, Milli- (10^{-3})
M	Molare Masse
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCS	Klonierungsstelle (multiple cloning site)
Milli-Q	Umkehrosiose-System (Fa. Millipore) zur Gewinnung von Reinstwasser
min	Minute
mol	Stoffmenge
mRNS	Boten-RNS (messenger-RNS)
n	Stoffmenge, Anzahl, Nano- (10^{-9})
Na	Natrium
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Neo	Neomycin-Resistenzgen
OD	Optische Dichte
OK	Opsinkinase
ONL	Äußere Körnerschicht (outer nuclear layer)
OPL	Äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer)
OS	Außensegmente (outer segments)
p	Plasmid
p.c.	Post coitum
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDE	Phosphodiesterase
pH	Potentia hydrogenii, negativ dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
RNS	Ribonukleinsäure
RP	Retinitis pigmentosa
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
rv	Reverse

s, sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
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
tg	Transgen
TK	Thymidinkinase-Gen
T_m	Schmelztemperatur
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl-)methylamin
U	Einheit (unit)
Ü/N	Über Nacht
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Auge und Netzhaut

1.1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen

1.1.1.1 Anatomie des Auges

Der Augapfel wird zum Schutz vor äußeren Einwirkungen von der weißen, derb bindegewebigen Lederhaut (Sklera) umgeben, die zusammen mit der durchsichtigen Hornhaut (Cornea) die Hülle des Auges bildet. Im Inneren grenzt die Aderhaut (Chorioidea) an, eine blutgefäßreiche Schicht des Auges, die der Versorgung der äußeren Netzhautschichten dient. Die innerste Schicht der Augapfelwand wird von der Netzhaut (Retina) gebildet, welche aus einem sensorischen Teil und dem Pigmentepithel besteht. Der transparente Glaskörper füllt schließlich den inneren Hohlraum des Auges aus. Über die Hornhaut fällt das Licht ins Auge ein, und die Linse und die Hornhaut fokussieren die einfallenden Lichtstrahlen auf die Netzhaut, sodass das Bild der Umgebung auf dieser abgebildet wird. Durch Kontraktion bzw. Entspannung der Ziliarmuskeln kann die Krümmung der Linse verändert und somit die Schärfe des Bildes gewährleistet werden. Die Iris bildet die Blende des Auges. Ihre zentrale Öffnung, die Pupille, zieht sich bei Helligkeit zusammen und dämpft den Lichteinfall. In der Netzhaut wird der ankommende Lichtreiz über die Photorezeptoren, also die Zapfen und Stäbchen, aufgenommen und die Impulse über verschiedene Zelltypen der Retina verarbeitet und weitergeleitet. Die Stelle des schärfsten Sehens stellt der „gelbe Fleck“ (Fovea centralis, Makula lutea) dar. Hier sind die Zapfen am dichtesten, während die Stäbchen fehlen. Der Bereich, an dem die Nervenfasern aus der Retina austreten (Papille) enthält keine Photorezeptoren und bildet dadurch den „blinden Fleck“.

1.1.1.2 Die Netzhaut

Die Retina stellt den sensorischen Teil des Auges dar. Hier findet sowohl die Detektion von Licht als auch die erste Signalverarbeitung statt. Die Netzhaut setzt sich bei allen Wirbeltieren aus mehreren Schichten zusammen und kleidet nahezu die gesamte Innenseite des Auges aus. Bei einem gesunden Menschen befinden sich in der Photorezeptorschicht ca. 7 Mio. Zapfen und 120 Mio. Stäbchen.

Nach außen zur Chorioidea hin ist diese Rezeptorschicht in Kontakt zum Pigmentepithel, welches der Ernährung der Photorezeptoren dient, ihre abgestoßenen Scheibchen verarbeitet (Young & Bok 1969) und gleichzeitig das einfallende Licht nach hinten abschirmt (Abbildung 1.1). Die äußere Körnerschicht (ONL, *outer nuclear layer*) wird durch die Somata der Photorezeptoren gebildet. Die Zellkörper der Stäbchen und Zapfen sind im ONL parallel nebeneinander gruppiert und erstrecken ihre verdickten lichtsensitiven Fortsätze, die Außensegmente, in Richtung des Pigmentepithels. Die visuellen Informationen der Photorezeptoren werden über Bipolarzellen, deren Zellkerne zusammen mit denen der Amakrin- und der Horizontalzellen die innere Körnerschicht (INL, *inner nuclear layer*)

bilden, an Ganglienzellen übermittelt. Die Axone der Ganglienzellen wiederum treffen sich alle an der Papille und bilden ab dort den Sehnerv, der zu verschiedenen Arealen im Gehirn projiziert, in denen dann die zentrale Verarbeitung der Reize erfolgt.

Die äußere Körnerschicht und die innere Körnerschicht werden durch die äußere plexiforme Schicht (OPL, *outer plexiform layer*) getrennt, in der praktisch keine Zellkörper, jedoch reichlich Neuronenkontakte zwischen Photorezeptoren, Horizontal- und Bipolarzellen zu finden sind. Die Horizontalzellen stehen über ihre Ausläufer in Kontakt mit den synaptischen Enden der Photorezeptoren, wobei eine einzige Horizontalzelle über ihre verzweigten synaptischen Enden Informationen von meist vielen hundert Photorezeptoren erhält. Horizontalzellen sind unter anderem für die Verstärkung der räumlichen Unterschiede der Lichtintensität durch laterale Inhibition zuständig. Die innere plexiforme Schicht (IPL, *inner plexiform layer*) trennt die innere Körnerschicht histologisch von der Ganglienzellschicht ab und beinhaltet die Synapsen der Bipolar-, der Amakrin- und der Ganglienzellen. Die Amakrinzellen interagieren synaptisch mit den Axonen der Bipolarzellen und den Dendriten der retinalen Ganglienzellen und sorgen ähnlich wie die Horizontalzellen für laterale Verbindungen innerhalb der Netzhaut. Amakrinzellen formen bzw. modulieren so den Signalfluss von den Photorezeptoren über die Bipolarzellen zu den Ganglienzellen (Kellner & Wachtlin 2008).

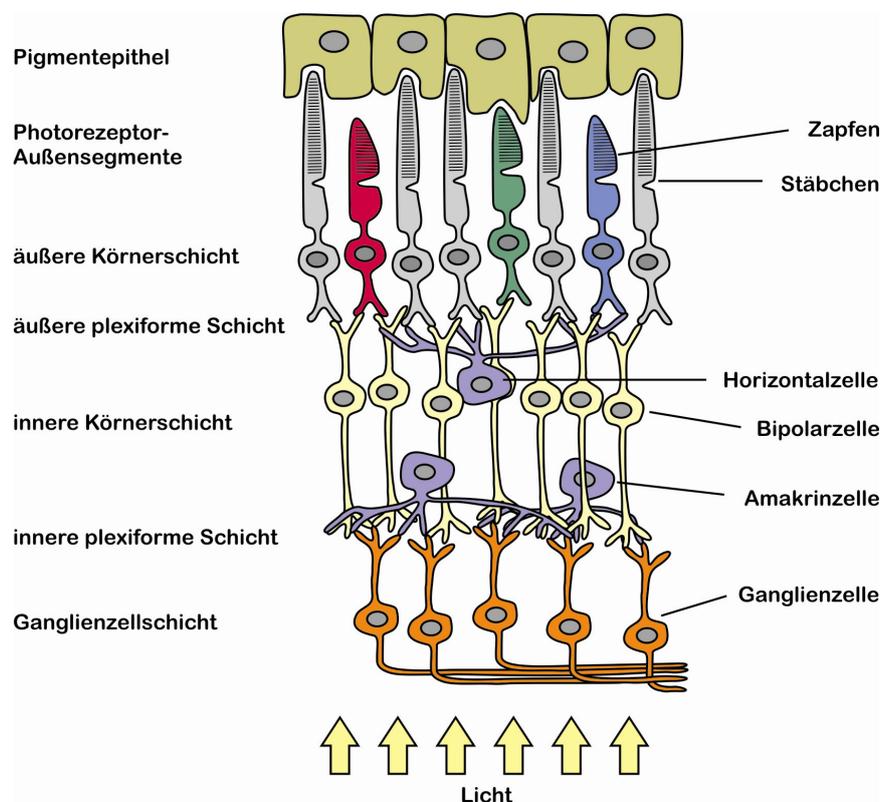


Abbildung 1.1: Aufbau der Netzhaut

1.1.1.3 Aufbau und Funktion der Photorezeptoren

Photorezeptoren bestehen aus einem äußeren Segment mit Stapeln von Membranen, die das lichtabsorbierende Photopigment (Rhodopsin in Stäbchen bzw. Rot-, Grün-, Blauopsin in Zapfen) enthalten, gefolgt von einem darunter liegenden inneren Segment mit Zellkern und einem synaptischen Terminal, über das Kontakt zu signalverarbeitenden Neuronen hergestellt wird. Die Retina besitzt zwei morphologisch und funktionell unterschiedliche Typen von Photorezeptoren: Die Zapfen mit einem konischen Außensegment stellen die Träger des photopischen Sehens, d.h. des Scharfsehens, etwa beim Lesen in heller Umgebungsbeleuchtung dar, sind für die räumliche Wahrnehmung sowie das Farbsehen verantwortlich und zeigen eine schnelle Reaktion auf Lichtreize (Kawamura & Tachibanaki 2008). Die Stäbchen mit schlankem, stabförmigem Außensegment sind für das skotopische Sehen, d.h. das Sehen bei schwachem Licht zur Unterscheidung von Grautönen, verantwortlich. Sie sind für die Verarbeitung von Kontrast, Helligkeit und Bewegung zuständig und ermöglichen eine äußerst empfindliche Detektion von sogar nur einzelnen Photonen pro Rezeptor (Schneeweis & Schnapf 1995). Ihre Signalverarbeitung ist dagegen deutlich langsamer als die der Zapfen (Kawamura & Tachibanaki 2008). In der zentralen Netzhaut sind normalerweise vorwiegend Zapfen zu finden, während in der Peripherie die Stäbchen überwiegen (Curcio et al. 1987). Die Retinae verschiedener Spezies zeigen in ihrem Aufbau allerdings eine deutliche Anpassung an die entsprechenden Lebensbedingungen. In der nachtaktiven Spezies Maus beispielsweise dominiert das stäbchenabhängige Sehen mit einem Zapfenanteil von nur ca. 3 - 5% (Carter-Dawson & LaVail 1979; Jeon et al. 1998).

1.1.1.4 Die Phototransduktion

Obwohl die Komponenten der Phototransduktionskaskade in Stäbchen und Zapfen aus unterschiedlichen Isoformen der einzelnen Proteine gebildet werden, basiert die Detektion des physikalischen Reizes Licht und die Umwandlung in ein elektrisches Nervensignal über die Phototransduktionskaskade in Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren auf dem gleichen biochemischen Reaktionsprinzip. Die Phototransduktion beginnt in den Außensegmenten mit der Absorption von Licht durch das Photopigment Rhodopsin in Stäbchen bzw. die Zapfen-Op sine in Zapfen (Abbildung 1.2). Bei den Opsinen handelt es sich um Sieben-Transmembranproteine, in denen über einen Lysinrest der Chromophor 11-cis-Retinal gebunden ist. Die einzelnen Opsine unterscheiden sich in ihrer Proteinstruktur voneinander, so dass unterschiedliche Absorptionsmaxima erreicht werden und somit das Farbsehen ermöglicht wird. Trifft ein Lichtquant auf ein Opsinmolekül mit 11-cis-Retinal, so findet die primäre photochemische Reaktion statt: die Isomerisierung von 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal (Okada et al. 2001) mit der Folge einer Konformationsänderung im Opsin. Das angeregte Photopigment bewirkt die Aktivierung des G-Proteins Transducin durch Abspaltung der inhibitorischen Untereinheiten und den damit gekoppelten Austausch von GDP durch GTP am aktivierten Transducinrest. Die aktivierte α -Untereinheit des Transducins interagiert dann mit der inhibitorischen γ -Untereinheit einer Phosphodiesterase (PDE), was zur Dissoziation der γ -Untereinheit vom katalytischen Teil mit nachfolgender Aktivierung der PDE führt. Die aktivierte Phosphodiesterase hydrolysiert cGMP und erniedrigt dadurch den intrazellulären cGMP-Spiegel. Der cGMP-regulierte Kationenkanal (*cyclic nucleotide gated*, CNG-Kanal), der zusammen mit dem $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher das Ruhemembranpotential

erzeugt, wird im Dunkelzustand durch cGMP offen gehalten. Das Absinken des intrazellulären cGMP-Spiegels schließt den CNG-Kanal, wodurch die Membran des Photorezeptors hyperpolarisiert, und der fortgeleitete Spannungsimpuls senkt die Glutamatfreisetzung an der Photorezeptorsynapse ab (Burns & Baylor 2001).

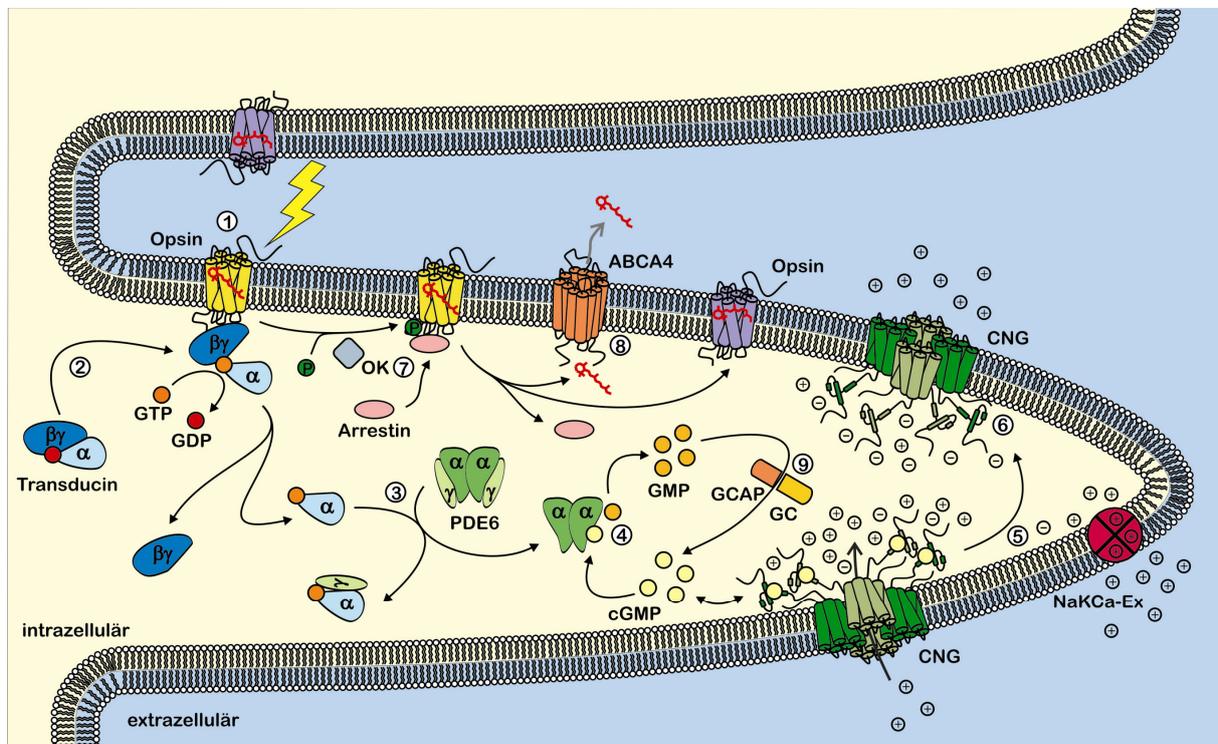


Abbildung 1.2: Die Phototransduktion im Außensegment der Zapfen

Lichteinfall in die Netzhaut resultiert in einer Isomerisierung des Chromophors 11-cis- zu all-trans-Retinal im Photopigment Opsin (1). Die Konformationsänderung des Opsins bewirkt die Aktivierung des G-Proteins Transducin durch Abspaltung der inhibitorischen Untereinheiten $\beta\gamma$ und dem damit gekoppelten Austausch von GDP durch GTP an der aktivierten α -Untereinheit des Transducins (2). Das aktivierte Transducin bindet an die inhibitorische γ -Untereinheit der Phosphodiesterase (PDE) mit nachfolgender Aktivierung der PDE (3). Diese hydrolysiert cGMP und erniedrigt dadurch den intrazellulären cGMP-Spiegel (4). Im Dunkeln wird der cGMP-regulierte Kationenkanal (CNG) durch cGMP offen gehalten und erzeugt zusammen mit dem $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NaKCa-Ex) das Ruhemembranpotential (5). Das Absinken des cGMP-Spiegels bewirkt ein Schließen des CNG-Kanals und damit eine Hyperpolarisation der Plasmamembran (6). Dieser Spannungsimpuls resultiert schließlich in einer verminderten Glutamatfreisetzung an der Photorezeptorsynapse. Inaktivierungsreaktionen: Das angeregte Opsin wird über die Opsinkinase (OK) phosphoryliert und durch die anschließende Bindung von Arrestin inaktiviert (7). Retinalderivate werden über den ABCA4-Transporter abtransportiert (8) und das Recycling des 11-cis-Retinals wird über das Pigmentepithel gesteuert (nicht dargestellt). Die Guanylatcyclase (GC), welche über ein Aktivatorprotein (GCAP) reguliert wird, ist verantwortlich für die Wiederherstellung des cGMP-Spiegels (9).

Trotz desselben biochemischen Reaktionsprinzips in der Phototransduktion weisen Zapfen und Stäbchen deutliche Unterschiede in ihren physiologischen Eigenschaften auf. Beide Typen von Photorezeptoren zeigen einen hohen Spezialisierungsgrad: Maximale Sensitivität und hohe Quantenausbeute in Stäbchen gegenüber hohem Adaptationsvermögen sowie hoher temporaler und räumlicher Auflösung in Zapfen. Diese Spezialisierung spiegelt sich auch in Unterschieden in den biochemisch-biophysikalischen Eigenschaften der homologen

Komponenten (Burns & Baylor 2001; Tachibanaki et al. 2001; Korenbrot & Rebrik 2002) sowie der genetischen Differenzierung der beiden Phototransduktionssysteme wider. Soweit bislang bekannt, werden die meisten der homologen Proteine in Zapfen und Stäbchen von unabhängigen, distinkten Genen kodiert.

1.1.2 Erbliche Netzhauterkrankungen

1.1.2.1 Grundlagen und Klassifikation

Erbliche Netzhauterkrankungen stellen eine heterogene Gruppe meist seltener Augenerkrankungen dar, bei denen es aufgrund von Mutationen in einem spezifischen Gen zu Störungen der Netzhaut- oder Sehbahnentwicklung oder zu Funktionsstörungen der reifen Netzhaut mit oft progredientem Verlauf kommt. Charakteristisch sind Funktionsausfälle in der Reizaufnahme und Reizweiterleitung innerhalb der Netzhaut, die zu verschiedenen Symptomen wie Verlust an Sehschärfe, Erhöhung der Reizschwellen, Einschränkungen im Gesichtsfeld und Farbsehschwäche führen können. Die Prävalenz liegt bei ca. 1:2500 (Rattner et al. 1999; Sohocki et al. 2001). Insgesamt werden über 190 Genorte derzeit mit Netzhautdystrophien assoziiert, hiervon wurden mehr als 150 Gene identifiziert (RetNet; „<http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>“). Erbliche Netzhauterkrankungen lassen sich grob unterteilen in generalisierte Netzhautdystrophien mit peripherer Betonung (z.B. Retinitis pigmentosa), generalisierte Netzhautdystrophien mit zentraler Betonung (z.B. Zapfendystrophien), Makuladystrophien (z.B. Morbus Stargardt) und stationäre Netzhautfunktionsstörungen (z.B. kongenitale stationäre Nachtblindheit) (Kellner et al. 2004a; Kellner et al. 2004b). Kennzeichnend ist eine zum Teil sehr ausgeprägte genetische Heterogenität der einzelnen Erkrankungen.

Ein klassisches Beispiel ist die Retinitis pigmentosa (RP), eine in der Netzhautperipherie beginnende, fortschreitende Degeneration primär der Stäbchen und anschließend auch der Zapfen. Charakteristisch sind Nachtsehstörungen und periphere Gesichtsfeldausfälle. Mutationen in Genen aus der Stäbchen-Phototransduktionskaskade können, wie im Falle der beiden katalytischen Untereinheiten der Phosphodiesterase (PDE6A, PDE6B) zu autosomal rezessiv vererbter RP führen (McLaughlin et al. 1993; Bayes et al. 1995; Huang et al. 1995; Danciger et al. 1996), ebenso wie Mutationen in den für die cGMP-gesteuerten Kationenkanäle kodierenden Genen CNGA1 (Dryja et al. 1995) und CNGB1 (Bareil et al. 2001). Auch Mutationen in Rhodopsin (RHO) wurden sowohl bei RP-Patienten mit rezessivem als auch mit dominantem Vererbungsmodus gefunden (Sohocki et al. 2001).

Auch die unterschiedlichen Arten der Makuladystrophien werden zu den degenerativen Netzhauterkrankungen gezählt, wobei hier vorwiegend das Netzhautzentrum, also die Makula mit ihren Zapfen betroffen ist. Gemeinsames Merkmal ist hier der progressive Verlauf der Erkrankung, der zu starken Sehbeeinträchtigungen, aber nur selten zur vollständigen Erblindung führt. Ein Beispiel hierfür ist der Morbus Stargardt (Stargardt 1909), verursacht hauptsächlich durch Mutationen im ABCA4-Gen, dessen Proteinprodukt für den Transport des all-trans-Retinal zuständig ist.

Die kongenitale stationäre Nachtblindheit (CSNB, *congenital stationary night blindness*) stellt ebenfalls eine genetisch heterogene Gruppe von Erkrankungen mit einer stationären

Stäbchenfunktionsstörung dar, die verschiedenen Vererbungsmodi folgen. Bei der autosomal dominanten Form wurden Mutationen in den Genen GNAT1 (Dryja et al. 1996), PDE6B (Gal et al. 1994) und RHO (al-Jandal et al. 1999) gefunden. Dem autosomal rezessiven Vererbungsmodus folgen Mutationen in den Genen RDH5 (Retinoldehydrogenase 5 (Gonzalez-Fernandez et al. 1999)) und RHOK (Rhodopsin Kinase (Yamamoto et al. 1997)).

1.1.2.2 Zapfen- und Zapfen-Stäbchendystrophien/Stäbchenmonochromasie

Die Zapfen- und Zapfen-Stäbchendystrophien bilden eine Untergruppe der erblichen Netzhauterkrankungen, die durch eine primäre oder sekundäre Störung der Funktion des Zapfensystems charakterisiert sind. Während bei der Zapfendystrophie keine wesentliche Beteiligung der Stäbchenfunktion zu finden ist, kommt es bei der Zapfen-Stäbchen-Dystrophie zu Beginn zum Absterben der Zapfen in der Netzhautmitte, welches sich dann langsam in den äußeren Bereich und auf die Stäbchen ausbreitet. Die Erkrankungen zeichnen sich aus durch reduzierte Sehschärfe, Farbsinnstörungen, zentrale Gesichtsfeldausfälle und eine ausgeprägte Blendungsempfindlichkeit. Ursachen sind hauptsächlich Mutationen in unterschiedlichen Genen, deren Genprodukte in den Photorezeptoren (z.B. ABCA4 (Maugeri et al. 2000) oder GUCA1A (Payne et al. 1998)) oder in Zellen des retinalen Pigmentepithels (z.B. RDH5 (Nakamura et al. 2000)) lokalisiert sind und damit Störungen der Phototransduktion oder der Funktionen des retinalen Pigmentepithels bewirken. Auch das KCNV2-Gen scheint bei der Entstehung einer bestimmten Form der Zapfendystrophie eine wesentliche Rolle zu spielen. Wu et al. identifizierten Mutationen im KCNV2-Gen als Ursache der *Cone Dystrophy with Supernormal Rod Response* (CDSRR) (Wu et al. 2006; Wissinger et al. 2008), einer pathophysiologisch eher ungewöhnlichen Form der Netzhautdystrophie. Neben einer ausgeprägten Funktionsbeeinträchtigung des Zapfensystems weisen die Patienten auch ein paradoxes skotopisches Elektretinogramm (ERG) auf (Gouras et al. 1983).

Von den Dystrophien abzugrenzen sind stationäre Störungen der Zapfenfunktion im Rahmen der Achromatopsie (Stäbchenmonochromasie, komplette Farbenblindheit), der Tritanopie (Fehlen der Blauzapfenfunktion) oder der Blauzapfenmonochromasie (Fehlen der Funktion der Rot- und Grünzapfen). Bei der Stäbchenmonochromasie weisen alle Zapfen eine vollständige Funktionsstörung (komplette Form) oder eine sehr stark herabgesetzte Funktion (inkomplette Form) auf. Durch die alleinig verbleibende Funktion der Stäbchen entstehen eine starke Blendungsempfindlichkeit bei fehlendem Farbsehen, eine stark verminderte Sehschärfe und ein ausgeprägter Nystagmus. Auch hierbei handelt es sich um eine seltene, genetisch sehr heterogene Erkrankung, ca. 40-50% der Fälle sind durch Mutationen im CNGB3-Gen und ca. 20-30% der Fälle durch Mutationen im CNGA3-Gen bedingt (Kohl et al. 1998; Winick et al. 1999; Kohl et al. 2000; Wissinger et al. 2001; Kohl et al. 2005). CNGA3 codiert hierbei für die α -Untereinheit des cGMP-gesteuerten Kationenkanals in Zapfen, CNGB3 codiert für die entsprechende β -Untereinheit desselben Kanals. Mutationen im GNAT2-Gen, welches für die α -Untereinheit des Transducins der Zapfen codiert, wurden ebenfalls beschrieben (Kohl et al. 2002).

Da nur etwa drei Viertel aller Patienten mit Achromatopsie diesen bislang bekannten Genen zugeordnet werden können, werden weitere Kandidatengene wie beispielsweise Gene, die für

Untereinheiten der Zapfen-PDE kodieren, beforcht. Bei einem Patienten mit einer seltenen Form der Zapfendystrophie (Zapfendystrophie mit Nyctalopie und supernormaler Stäbchenantwort) konnte eine heterozygote G-C-Substitution in der 5'-UTR (*untranslated region*) des PDE6H-Gens detektiert werden. Bei *in vitro* Transkriptions-/Translations-Experimenten konnte mit einem Konstrukt mit dieser Mutation eine erhöhte Genexpression von PDE6H im Vergleich zu einem wildtyp-Konstrukt detektiert werden. Dies könnte theoretisch *in vivo* zu einer verstärkten Hemmung der PDE6 und damit erhöhten cGMP-Spiegeln mit nachfolgender Photorezeptordegeneration führen (Piri et al. 2005). Auch Mutationen des PDE6C-Gens konnten kürzlich als Ursache für Achromatopsie identifiziert werden (Chang et al. 2009).

1.2 Phosphodiesterasen

1.2.1 Allgemeine Einteilung

Phosphodiesterasen gehören zur Klasse der Phosphohydrolasen und katalysieren selektiv die Hydrolyse der cyclischen 3'-Phosphatbindung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und/oder cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP), um daraus das entsprechende inaktive 5'-Monophosphat zu bilden. Sie sind somit zusammen mit den Adenylatcyclasen und Guanylatcyclasen an der Regulation der intrazellulären Spiegel an cyclischen Nukleotiden beteiligt (Bender & Beavo 2006). In Säugerzellen wurden 21 PDE-Gene identifiziert, und basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten wie Sequenzhomologie, Proteindomänen und enzymatischen Eigenschaften werden die Phosphodiesterasen der Säugetiere in insgesamt elf verschiedene Familien (PDE 1-11) eingeteilt (Francis et al. 2001; Omori & Kotera 2007). Innerhalb der Familien existieren mehrere Isoformen, die entweder von unterschiedlichen Genen codiert oder durch alternatives Spleißen bzw. variierende Transkriptionsstartpunkte gebildet werden. Somit besteht die gesamte Säuger-PDE-Familie aus insgesamt mehr als 50 Isoenzymen. Allen PDEs gemeinsam ist der Aufbau aus C-terminaler katalytischer Domäne und N-terminaler regulatorischer Domäne. Die katalytischen Domänen aller PDE-Familien sind hochkonserviert, während sich die regulatorischen Domänen voneinander unterscheiden (Bender & Beavo 2006). Eine Einteilung der Phosphodiesterasen kann unter anderem aufgrund ihrer Substratspezifität vorgenommen werden: es gibt cGMP-spezifische PDEs, PDEs mit gemischter Spezifität, und cAMP-spezifische PDEs. Drei der elf bekannten Familien, PDE5, PDE6 und PDE9, weisen eine hohe Spezifität für cGMP auf.

1.2.2 Regulation über GAF-Domänen

Fünf der elf Säuger-PDE-Familien besitzen N-terminal angeordnete sogenannte GAF-Domänen (PDE 2, 5, 6, 10 und 11), die mit Ausnahme der PDE11 als Tandem (GAFa und GAFb) vorliegen (Zoraghi et al. 2004). Die Bezeichnung „GAF-Domäne“ wurde abgeleitet von den Namen der Proteine, in denen dieses Sequenzmotiv zuerst gefunden wurde: in cGMP-bindenden Phosphodiesterasen, *Anabaena* Adenylatcyclasen und im *E. coli* Transkriptionsfaktor FhlA. Spezifisches Merkmal der GAF-Domänen ist ein evolutionär

hochkonserviertes Aminosäuremotiv, das bisher in mehr als 1000 Proteinen in verschiedenen Organismen identifiziert werden konnte (Aravind & Ponting 1997).

Die GAF-Domänen der Phosphodiesterasen haben unterschiedliche Funktionen. Durch die Bindung von Liganden kann das katalytische Zentrum stimuliert werden (Okada & Asakawa 2002; Bruder et al. 2006), die Affinität des katalytischen Zentrums für Substrate und Inhibitoren kann erhöht werden (Corbin et al. 2003; Rybalkin et al. 2003) oder die Phosphorylierung entsprechender Phosphorylierungsstellen kann verstärkt werden (Thomas et al. 1990). Zudem können GAF-Domänen für eine Dimerisierung zuständig sein (Martinez et al. 2002; Martinez et al. 2005). Drei der fünf GAF-Domänen beinhaltenden PDEs (PDE2, PDE5, and PDE6) dienen durch Bindung von cAMP/cGMP an eine der Tandem-GAF-Domänen als Feedback-Regulationsstellen des Cyclonukleotid-Signaling. Die cAMP/cGMP-Bindung an die regulatorischen GAF-Domänen in PDE2, PDE5 und PDE6 haben verschiedene Effekte auf ihre enzymatische Aktivität. Die Bindung von cGMP an die GAFb-Domäne der PDE2 beispielsweise ist verantwortlich für eine Stimulation der enzymatischen Aktivität (Martins et al. 1982). Die Bindung von cGMP an die GAFa-Domäne der PDE5 erhöht ebenfalls die katalytische Aktivität des Enzyms (Rybalkin et al. 2003). Zudem induziert die Bindung von cGMP an die GAFa-Domäne der PDE5 eine Änderung der Konformation, welche einen Serin-Rest zur Phosphorylierung durch die Proteinkinase G oder Proteinkinase A bereitstellt, was folglich sowohl die katalytische als auch die allosterische cGMP-Bindungsaktivität der PDE5 aktiviert (Corbin et al. 2000). Im Gegensatz zu PDE2 und PDE5 führt die Besetzung der GAFa-Domäne der PDE6 durch cGMP zu einer reduzierten basalen Aktivität des Enzyms, ein Effekt, der einer erhöhten Affinität der inhibitorischen Untereinheit PDE6G/H zum katalytischen Teil der PDE6 zuzuschreiben ist (Yamazaki et al. 1990; DAmours & Cote 1999). Die Bindung der inhibitorischen Untereinheit PDE6G/H an den katalytischen Kern des Enzyms hingegen erhöht die cGMP-Bindung an die PDE6 GAFa-Domäne (Cote et al. 1994; Norton et al. 2000).

1.2.3 Die PDE6-Familie

1.2.3.1 Überblick über die Photorezeptor-Phosphodiesterasen

Die Phosphodiesterasen der Familie 6 fungieren als Schlüsselenzyme in der Phototransduktion (siehe 1.1.1.4). Sie werden hauptsächlich in den Außensegmenten der Photorezeptoren der Säuger-Retina exprimiert und sind an der Umwandlung des Lichtsignals in ein neuronales Signal wesentlich beteiligt (Gillespie & Beavo 1988). Das PDE6-Holoenzym setzt sich aus einem katalytisch aktiven Enzymkern und inhibitorischen Untereinheiten zusammen. Die Stäbchen-Phosphodiesterase besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten PDE6 α und PDE6 β , codiert durch die Gene PDE6A bzw. PDE6B, sowie zwei identischen inhibitorischen Untereinheiten PDE6 γ , codiert durch PDE6G (Baehr et al. 1979; Deterre et al. 1988). Das Zapfen-PDE-Holoenzym wird repräsentiert durch zwei identische katalytische Untereinheiten PDE6 α' , codiert durch das PDE6C-Gen und zwei identische Zapfen-spezifische inhibitorische Untereinheiten PDE6 γ' , codiert durch das PDE6H-Gen (Gillespie & Beavo 1988) (Abbildung 1.3).

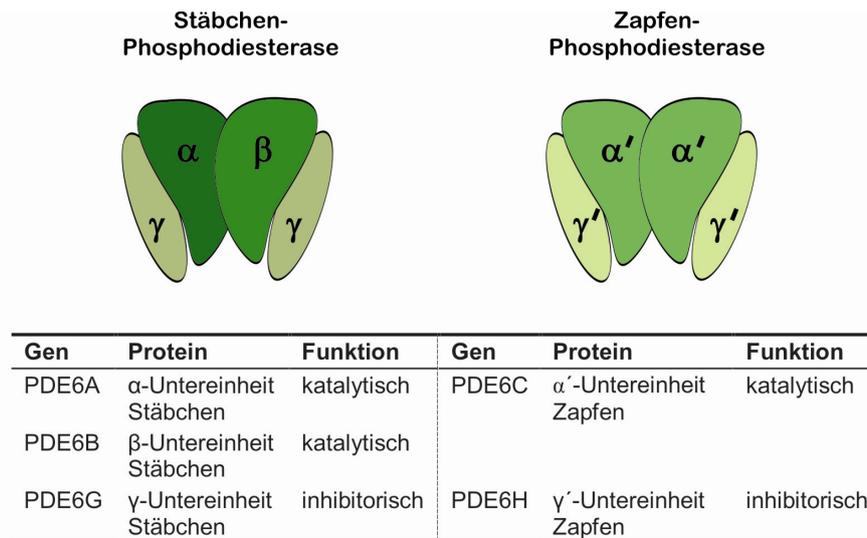


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau der Photorezeptor-Phosphodiesterasen

Die katalytischen Domänen sind teilweise zusätzlich mit einer regulatorischen Untereinheit PrBP/ δ (*prenyl binding protein*), codiert durch das PDE6D-Gen (Norton et al. 2005), assoziiert. PrBP/ δ wurde zunächst als putative Untereinheit der Stäbchen-PDE in der Retina identifiziert und PDE6 δ genannt (Gillespie et al. 1989). Zhang et al. zeigten, dass es sich um ein prenylbindendes Protein handelt (Zhang et al. 2004), und es wurde folglich in PrBP/ δ umbenannt (Norton et al. 2005). PrBP/ δ kann mit vielen Proteinen interagieren, beispielsweise mit GTPasen der Ras-Familie (Norton et al. 2005), mit dem Prostacyclin-Rezeptor (Wilson & Smyth 2006) aber auch wie schon erwähnt, mit retinalen Proteinen wie PDE6 α und PDE6 β (Zhang et al. 2004). In der Netzhaut kann PrBP/ δ an die C-terminale Region der katalytischen Untereinheiten der PDE6 binden, eine Solubilisierung der PDE6 wird in diesem Zusammenhang diskutiert (Gillespie et al. 1989). Die genaue physiologische Rolle sowie detaillierte Informationen zur Bindungsstelle von PrBP/ δ sind aber immer noch unbekannt. Es wurde postuliert, dass die lösliche Fraktion der PDE6 schlechter durch Transducin aktiviert werden kann und somit die Lichtsensitivität der Stäbchen gegenüber hohen Intensitäten ausgedehnt wird (Cook et al. 2001). Norton et al. zeigten eine mögliche Rolle von PrBP/ δ bei der Synthese und dem Transport von PDE6 zu den Discs oder zur Membran auf (Norton et al. 2005), was von Zhang et al. in der *Pde6d-knockout*-Maus bestätigt werden konnte (Zhang et al. 2007).

Die katalytischen Anteile sowohl der Zapfen- als auch der Stäbchen-PDE besitzen pro Monomer im N-terminalen Bereich zwei GAF-Domänen (GAFa und GAFb). Die GAFa-Domäne beinhaltet eine Bindungsstelle für cGMP, und über *cross-linking*-Experimente konnte eine Interaktionsstelle der γ -Untereinheit mit GAFa identifiziert werden (Muradov et al. 2002). An die GAF-Domäne gebundenes cGMP verursacht eine erhöhte Affinität der katalytischen Untereinheiten für die inhibitorischen Untereinheiten. Die Aktivität beider Familie 6-Phosphodiesterasen wird durch Transducin reguliert. Bei der durch Licht vermittelten Aktivierung der Phototransduktion bewirkt das aktivierte Opsin einen Austausch von gebundenem GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des Transducins. Diese aktivierte α -

Untereinheit interagiert mit der inhibitorischen Untereinheit der PDE6, wodurch deren inhibitorische Wirkung aufgehoben wird. Die Aktivierung der PDE6 führt zu einer Reduktion der intrazellulären cGMP-Konzentration mit folglich Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit der CNG-Kanäle (Gillespie und Beavo, 1988).

Obwohl die Phosphodiesterasen in Zapfen und Stäbchen strukturell sehr ähnlich aufgebaut sind und ähnliche Aktivierungsmechanismen in der Phototransduktion aufweisen, unterscheiden sie sich in ihren biochemischen Parametern deutlich. Die Effizienz der PDE-Aktivierung durch Transducin in Zapfen ist im Vergleich zum Stäbchensystem ca. 10fach geringer. Darüber hinaus ist die Kinetik der PDE-Inaktivierung in Zapfen deutlich höher als in Stäbchen (Tachibanaki et al. 2001; Kawamura & Tachibanaki 2008). Verschiedene Studien deuten außerdem darauf hin, dass Familie 6-Phosphodiesterasen zusätzlich zu ihrer Rolle in der Phototransduktion noch weitere wichtige Funktionen übernehmen können. Wang et al. berichteten beispielsweise, dass in Embryonalzellen der Maus der Wnt/Frizzled-Pathway an einen Abfall der cGMP-Konzentration gekoppelt ist und diese Kopplung über PDE6 reguliert wird (Wang et al. 2004).

1.2.3.2 Die inhibitorischen Untereinheiten der PDE6

Wie schon weiter oben beschrieben, werden die inhibitorischen PDE6-Untereinheiten γ in Stäbchen bzw. γ' in Zapfen von distinkten Genen (PDE6G bzw. PDE6H) kodiert. Die im Folgenden beschriebenen Interaktionsstudien und Regulationsmechanismen sind fast ausschließlich an der inhibitorischen Untereinheit in Stäbchen untersucht, potentiell wäre aber auf Grund der strukturellen Ähnlichkeiten eine Übertragung auf die Zapfen-Photorezeptoren denkbar.

Jede inhibitorische γ -Untereinheit kann über mindestens zwei verschiedene Regionen mit der katalytischen Untereinheit interagieren, und die Affinität der γ -Bindung wird über die cGMP-Bindung an die GAF-Domäne der katalytischen Untereinheit reguliert (Norton et al. 2000; Mou & Cote 2001). Die cGMP-Bindung an die GAFa-Domäne erhöht interessanterweise die intrinsische Affinität der γ -Untereinheit nur für eine, aber nicht für beide γ -Interaktionsstellen am katalytischen Dimer; die zweite γ -Bindungsstelle behält dieselbe Affinität für das katalytische Dimer, unabhängig von der cGMP-Bindung an die GAF-Domäne (Mou & Cote 2001). Die C-terminalen Bereiche der γ -Untereinheit binden direkt an das aktive Zentrum der katalytischen Domäne und blockieren den Zutritt der cyclischen Nukleotide (Granovsky et al. 1997). Sie interagieren außerdem mit der α -Untereinheit des Transducins (Slep et al. 2001). Der N-terminale Bereich von γ bindet an das katalytische Dimer mit 50fach höherer Affinität als der C-terminale Bereich und ist verantwortlich für die cGMP-abhängige Modulation der Affinität der γ -Untereinheit durch die GAF-Domäne (Mou & Cote 2001).

Der zentrale Bereich der γ -Untereinheit, vor allem die sogenannte polykationische Region, stellt die Hauptinteraktionsstelle mit der aktivierten Transducin- α -Untereinheit dar (Artemyev et al. 1992). Aktiviertes Transducin kann zur Aktivierung der PDE über zwei verschiedene Stellen mit der γ -Untereinheit interagieren, diese Ablösen und somit die cGMP-Hydrolyse in Gang setzen. Da Transducin die Stäbchen-PDE nur bis zu 50% der Gesamtaktivität des gereinigten katalytischen Dimers aktivieren kann, ist zu vermuten, dass nur eine der beiden katalytischen Untereinheiten während der Phototransduktion aktiviert wird. Außerdem kann

die inhibitorische Untereinheit nur dann komplett vom katalytischen Teil der PDE6 abdissoziieren, wenn cGMP von der GAF-Domäne der PDE6 abgelöst ist (DAmours & Cote 1999; Norton et al. 2000). Der α -helikale Bereich nahe des C-Terminus der γ -Untereinheit ist ebenfalls eine wichtige Interaktionsstelle für die aktivierte Transducin- α -Untereinheit und ist vor allem verantwortlich für die GTPase-beschleunigende Aktivität der γ -Untereinheit (Arshavsky et al. 1994; Slep et al. 2001).

In der Deaktivierungsphase bildet die γ -Untereinheit zusätzlich Teil eines Proteinkomplexes mit RGS9 und anderen Proteinen und beschleunigt die GTPase-Aktivität am aktivierten Transducinrest (Arshavsky & Bownds 1992; He et al. 1998; Slep et al. 2001). Die inhibitorische PDE-Untereinheit beinhaltet zudem eine Erkennungssequenz für die Bindung an SH3-Domänen-beinhalten Proteine (Morin et al. 2003), und sie stellt auch ein Substrat für verschiedene posttranslationale Modifizierungen dar (Hayashi 1994; Bondarenko et al. 1997).

PDE6G und PDE6H werden in hohem Ausmaß in der Retina exprimiert, Transkripte beider inhibitorischer Untereinheiten wurden aber auch in nichtretinalen Geweben gefunden. Über RT-PCR an Mausgewebe konnten Transkripte der Pde6g in Lunge, Niere, Hoden, Leber und Herz identifiziert werden, und auch Pde6h wurde mit derselben Methode in Lunge, Hoden und Leber nachgewiesen. Mittels Western Blot-Analyse wurde die Expression beider Proteine in der Lunge von Mäusen verifiziert (Tate et al. 2002). Bereits 1997 entdeckten Lochhead et al. zwei Proteine mit einer Molekülmasse von 14 kDa bzw. 18 kDa in der Lunge von Meerschweinchen, welche mit einem Antikörper, der gegen bovines Pde6 γ gerichtet ist, detektiert werden konnten. Diese Proteine wurden von Tate et al. als die inhibitorischen γ -Untereinheiten der Stäbchen- und Zapfen-PDE bestätigt. Lochhead et al. fanden zudem in vitro mit PDE5 aus der Lunge von Meerschweinchen, dass die über Proteinkinase A vermittelte Aktivierung der PDE5 durch die in *E. coli* rekombinant exprimierte γ -Untereinheit der Stäbchen-PDE gehemmt werden kann (Lochhead et al. 1997).

Auch in HEK 293-Zellen wurde die Expression der γ -Untereinheit nachgewiesen, und es wurde gezeigt, dass PDE γ an der Regulation der EGF- und Thrombin-abhängigen Aktivierung des p42/p44 MAPK-pathways (Mitogen aktivierte Proteinkinase) in HEK 293-Zellen beteiligt ist (Wan et al. 2001; Wan et al. 2003). Murray et al. fanden eine Expression von PDE γ in verschiedenen Pulmonalarterien-Abschnitten der Ratte und wiesen nach, dass chronische Hypoxie die Expression von PDE γ in allen untersuchten Lungenarterien-Abschnitten erhöht. Dabei war das Ausmaß der Zunahme der Expression von PDE γ korreliert mit einer verstärkten Aktivierung der p42/p44 MAPK in diesen Gefäßen. Auch in einem Zellkultur-Modell mit humanen Glattmuskelzellen aus Pulmonalarterien konnte nach chronischer Hypoxie über 14 Tage eine erhöhte mRNA-Translation von PDE γ detektiert werden. Die Zunahme der Translation war ebenfalls mit der Hypoxie-abhängigen Zunahme der p42/p44 MAPK-Aktivität korreliert (Murray et al. 2003). Verschiedene Arbeitsgruppen schreiben der p42/p44 MAPK-Aktivierung auf Grund ihrer Schlüsselrolle in der Regulation der Zellproliferation eine hohe Bedeutung beim vaskulären Remodeling bei pulmonaler Hypertonie zu (Jin et al. 2000; Minet et al. 2000). Es wird daher postuliert, dass die PDE γ in der Aktivierungskaskade der p42/p44 MAPK als ein zwischengeschaltetes Protein fungieren könnte, das unter hypoxischen Bedingungen das mitogene Signaling in Pulmonalarterien und

damit auch das vaskuläre Remodeling bei pulmonaler Hypertonie beeinflusst. Obwohl die inhibitorischen γ -Untereinheiten der PDE6 zusätzlich zur Lunge offensichtlich noch in zahlreichen anderen Geweben exprimiert werden (Tate et al. 2002), sind bislang noch keine weiteren Daten zur Bedeutung der PDE γ -Expression in nichtretinalen Geweben publiziert.

1.3 Kaliumkanäle

1.3.1 Allgemeines zu Kaliumkanälen

Ionenkanäle steuern in ihrer Form als membrandurchspannende, porenbildende Proteine selektiv den Transport von Ionen durch die Zellmembran und sind daher unerlässlich für die Funktion eines lebenden Organismus. Sie sind unter anderem die Voraussetzung für neuronale Signalleitung, für die Generierung muskulärer Aktionspotentiale und für die Ionenhomöostase des Organismus.

Kaliumkanäle, die häufigsten und vielfältigsten aller bekannten Ionenkanäle, werden in fast allen erregbaren und nicht erregbaren Zellen exprimiert und bilden somit eine nahezu ubiquitär vorkommende Familie von Membranproteinen, welche an einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse beteiligt sind. Hierzu gehören beispielweise die Kontrolle des Membranruhepotentials, die Steuerung der Sekretion von Hormonen, die Regulation elektrischer Erregbarkeit von Neuronen und deren synaptische Plastizität (Rudy 1988). Inzwischen wurde eine große Anzahl an Kaliumkanälen identifiziert, die sowohl strukturell als auch funktionell eingeteilt werden können. Grundsätzlich lassen sich drei große Klassen von Kaliumkanälen unterscheiden: jene mit sechs Transmembransegmenten und diejenigen mit nur vier oder zwei Transmembransegmenten. Sämtliche bekannten Kaliumkanäle lassen sich einer dieser Klassen zuordnen, und innerhalb dieser Klassen erfolgt eine weitere Unterteilung in Familien und Unterfamilien. Allen Kanälen gemeinsam ist ein hochkonserviertes Aminosäuresequenzmotiv, das sich zwischen den beiden letzten Transmembransegmenten befindet und die eigentliche Kanalpore bildet (Heginbotham et al. 1994). Die Aminosäuren ordnen sich räumlich so an, dass ein wassergefüllter Tunnel durch die Membran entsteht. Der „Selektivitätsfilter“ des Kanals determiniert dabei, welche Ionen den Kanal passieren dürfen. Vor dem Durchtritt durch die Pore muss die Hydrathülle der Ionen abgestreift werden. Dafür übernehmen die Carbonyl-Sauerstoffe des Kanalproteins die Rolle der Wasserstoffmoleküle, sie stabilisieren das Kaliumion und definieren durch ihre Anordnung die Öffnung, welche exakt der Größe eines dehydratisierten Kaliumions entspricht. Im Inneren der Pore wird das Kalium-Ion sofort wieder rehydratisiert. Andere Ionen können diesen Filter nicht passieren, da sie entweder zu groß sind oder der Transport energetisch nicht stabilisiert wird (Miller 2000).

Die Aktivität der Kaliumkanäle kann durch Änderung des Membranpotentials, durch regulatorische Moleküle wie beispielsweise ATP oder durch Konzentrationsänderungen bestimmter Ionen wie Na^+ , Cl^- oder Ca^{2+} reguliert werden. Die Gruppe der Kaliumkanäle mit sechs Transmembrandomänen (sechs membrandurchspannende Segmente und eine porenbildende Domäne) beinhaltet beispielsweise die spannungsgesteuerten sowie die Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle, während zur Gruppe mit zwei Transmembrandomänen (zwei

membrandurchspannende Segmente und eine porenbildende Domäne) die einwärtsgerichtenden K^+ -Kanäle („*inward rectifier*“, Kir) gehören. Die letzte Gruppe mit vier Transmembrandomänen beinhaltet die „Leck“- K^+ -Kanäle („*leak*“), auch „Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle“ genannt, da sie pro Untereinheit zwei porenbildende Domänen sowie vier Transmembrandomänen besitzen. Nachfolgend sollen insbesondere die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle näher beleuchtet werden, da sich die vorliegende Arbeit mit der Ausschaltung der durch *Kcv2* codierten regulatorischen Untereinheit des spannungsgesteuerten Kaliumkanals in Photorezeptoren in der Maus beschäftigt.

1.3.2 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

Spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle (Kv) sind tetramere Transmembranproteine, die aus vier α -Untereinheiten zusammengesetzt sind und mit unterschiedlichen modulatorischen β -Untereinheiten assoziiert sein können. Jede α -Untereinheit besteht aus sechs Transmembrandomänen (S1 – S6) sowie einer Porenschleife, die wie oben beschrieben durch ihre Aminosäuresequenz die Kaliumselektivität determiniert. Die 4. Transmembrandomäne (S4) enthält in der Regel an jeder dritten Position positiv geladene Aminosäuren und stellt den Hauptteil des Spannungssensors dar (Papazian et al. 1991) (Abbildung 1.4).

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle haben viele verschiedenen Funktionen, unter anderem die Regulation des Ruhemembranpotentials und die Kontrolle der Form, Dauer und Frequenz von Aktionspotentialen (Hille 1978; Barry & Nerbonne 1996; Pongs 1999). In eukaryontischen Zellen öffnen spannungsabhängige Kaliumkanäle bei Depolarisation und fördern so die Repolarisation. Diese auswärtsgerichtenden Kaliumkanäle lassen sich entsprechend ihrer Inaktivierungsgeschwindigkeit in zwei Unterformen einteilen: den schnell inaktivierenden A-Typ und die langsam oder nicht inaktivierenden Kanäle (*delayed rectifier*).

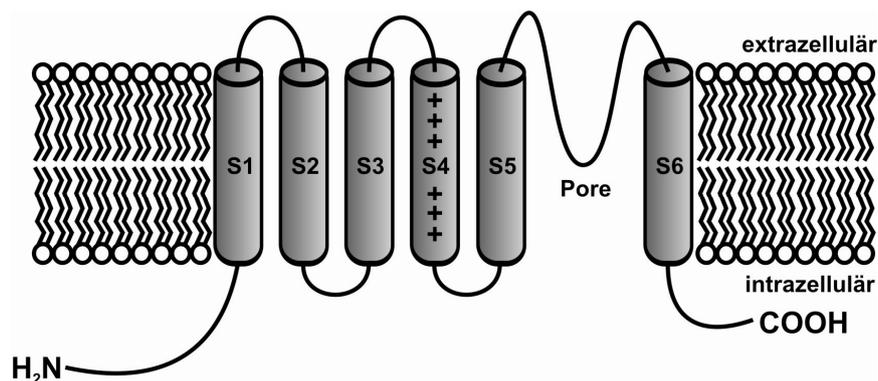


Abbildung 1.4: Aufbau einer Untereinheit spannungsgesteuerter Kaliumkanäle

Der als erstes identifizierte spannungsgesteuerte K^+ -Kanal wurde aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* durch die Klonierung des *Shaker*-Gens identifiziert. Eine Mutation in diesem Gen bewirkt ein „Schütteln“ in den Beinen der Fliegen, wenn sie Äther ausgesetzt werden (Papazian et al. 1987). Anschließend konnten weitere Familien von verwandten Kanälen aus der Fruchtfliege kloniert werden, nämlich *Shab*, *Shaw* und *Shal*. Abhängig von strukturellen Ähnlichkeiten wurden die entsprechenden Säugerfamilien initial ebenfalls in

vier Unterfamilien Kv1 (*shaker*), Kv2 (*shab*), Kv3 (*shaw*) und Kv4 (*shal*) unterteilt (Dolly & Parcej 1996). Diese Untereinheiten bilden funktionelle homotetramere K⁺-Kanäle aus, wenn sie heterolog beispielsweise in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert werden (Coetzee et al. 1999). Die Coexpression von Mitgliedern derselben Unterfamilie resultiert in funktionalen heterotetrameren Kanälen und Strömen, die sich von denen der homotetrameren Kanäle unterscheiden (Czirjak et al. 2007). Die Ströme dieser heteromeren Kv-Kanäle konnten zudem auch in nativen Geweben identifiziert werden (Sheng et al. 1993; Wang et al. 1993).

In der Literatur finden sich verschiedene Angaben zur Nomenklatur von Kaliumkanälen. Nach der *International Union of Pharmacology* (IUPHAR) werden die spannungsabhängigen Kaliumkanäle mit „Kv n.m“ bezeichnet, wobei n die Subfamilie und m das Mitglied bezeichnet. Nach dem *HUGO Gene Nomenclature Committee* (HGNC) werden die Kanäle hingegen mit den Genbezeichnungen KCNxy abgekürzt, wobei hier x die Subfamilie und y das einzelne Mitglied bezeichnet. Eine Übersicht über die verschiedenen Bezeichnungen spannungsabhängiger Kaliumkanäle findet sich beispielsweise in Gutman et al. (Gutman et al. 2005) bzw. eine für die vorliegende Arbeit relevante Auswahl in Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1: Nomenklatur spannungsgesteuerter Kaliumkanäle

Aufgeführt sind die für die vorliegende Arbeit relevanten Bezeichnungen und Synonyme spannungsabhängiger Kaliumkanäle entsprechend den Richtlinien der jeweiligen Gesellschaft.

IUPHAR	HGNC	weitere Bezeichnungen
Kv2.1	KCNB1	Mitglied der <i>shab</i> -Familie
Kv8.2/früher Kv11.1	KCNV2	Modulatorische Untereinheit

Die Kv2-Unterfamilie, die an der Bildung von Kanälen beteiligt ist, welche verzögerte Gleichrichtereigenschaften (*delayed rectifier*) aufweisen, beinhaltet nur zwei Mitglieder: Kv2.1 und Kv2.2. Trotzdem zeigen die verzögerten Gleichrichter-Kaliumströme abhängig vom jeweils untersuchten Gewebe starke Variabilitäten. Diese Diversität kann durch weitere, modulatorische Untereinheiten der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (Kv5 - Kv9) erklärt werden. Mitglieder der Familie Kv5 - Kv9 zeigen strukturell alle Eigenschaften von funktionsfähigen K⁺-Kanal α -Untereinheiten, aber sie induzieren keine K⁺-Ströme, wenn sie alleine heterolog exprimiert werden. Andererseits können diese sogenannten „stillen“ Untereinheiten mit Mitgliedern der Kv2-Unterfamilie Tetramere und somit Kanäle mit veränderten Eigenschaften bilden. Die Coexpression von „stillen“ Kv-Untereinheiten reduziert im Allgemeinen die Amplitude des Kv2-Stroms (Hugnot et al. 1996; Salinas et al. 1997a; Salinas et al. 1997b). Zudem wurden Veränderungen der Aktivierung und Inaktivierung sowie der Deaktivierungskinetik (Post et al. 1996; Patel et al. 1997; Stocker et al. 1999) und anderer Gating-Eigenschaften (Kramer et al. 1998) von Kv2.1 durch die modulatorischen Untereinheiten beschrieben. Diese heteromeren „verzögerten Gleichrichter“ modulieren das Aktionspotential und andere elektrophysiologische Prozesse abhängig vom speziellen Bedarf des jeweiligen Zelltyps.

1.3.3 KCNV2

Über die Funktion von KCNV2 ist bislang sehr wenig bekannt. Man vermutet, dass es für eine modulatorische Untereinheit (Kv8.2) eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals kodiert. Ottshytsch et al. klonierten KCNV2 aus humaner cDNA und untersuchten die Expression von Kv8.2 in verschiedenen Geweben durch RT-PCR. Demnach ist Kv8.2 in Pankreas und Hoden stark exprimiert, schwächere Expression konnte in Lunge, Leber, Niere, Milz, Thymus, Prostata und in den Ovarien detektiert werden (Ottshytsch et al. 2002). Zudem wurde durch *in situ*-Hybridisierung von Wu et al. eine hohe Expression von Kv8.2 in den Innensegmenten der Zapfen und Stäbchen in humaner Retina gezeigt. Das KCNV2-Gen scheint bei der Entstehung einer bestimmten Form erblicher Netzhauterkrankungen eine wesentliche Rolle zu spielen, da Mutationen im KCNV2-Gen als Ursache der *Cone Dystrophy with Supernormal Rod Response* (CDSRR) identifiziert wurden (Wu et al. 2006). Dieses Ergebnis konnte von einer zweiten Arbeitsgruppe an einer größeren Serie von CDSRR-Patienten bestätigt werden (Wissinger et al. 2008). CDSRR-Patienten zeichnen sich durch eine ausgeprägte Funktionsbeeinträchtigung des Zapfensystems mit paradoxem skotopischem ERG aus: Bei niedrigen Lichtintensitäten sind die ERG-Amplituden reduziert und die Latenzen verlängert, während bei höheren Lichtintensitäten die Amplitude der b-Welle überschüssig ist und deutlich über dem Normalwert liegt (Gouras et al. 1983). Außer den beschriebenen retinalen Schäden konnten bei diesen Patienten bislang keine anderen offensichtlichen phänotypischen Veränderungen nachgewiesen werden, was die Vermutung nahe legt, dass die Kv8.2-Untereinheit eine entscheidende Rolle in Photorezeptoren spielt.

Eine spezielle Eigenschaft des elektrischen Antwortsystems in Photorezeptoren ist die Generierung von verstärkten Membranpotential-Änderungen als Antwort auf schnelle Änderungen des Einwärtsstroms. Der Einfall von Licht bewirkt eine vorübergehend verstärkte Hyperpolarisation, welche diejenige Hyperpolarisation, die bei andauerndem Lichteinfall erzeugt wird, übersteigt. Diese dynamische Antwort erhöht die Sensitivität der Photorezeptoren gegenüber Veränderungen der Lichtintensität. Der Mechanismus, der für diese Über-Hyperpolarisation verantwortlich ist, wurde erstmals in Amphibien-Photorezeptoren untersucht und einem undefinierten spannungsabhängigen Kaliumstrom (IKx) zugeschrieben (Beech & Barnes 1989). Wie Ottshytsch et al. zeigten, bildet Kv8.2 alleine keine funktionalen Kanäle, heteromerisiert aber in Coexpressions-Untersuchungen mit Kv2.1 (Ottshytsch et al. 2002). Die heterologe Expression des Kv2.1/Kv8.2-Heteromers in *Xenopus* Oozyten bewirkte im Gegensatz zum Kv2.1-Homotetramer einen permanenten K⁺-Ausstrom innerhalb des Membranpotentialbereichs, der für Photorezeptorzellen typisch ist. Das beobachtete pharmakologische und elektrophysiologische Profil des Heterotetramers Kv8.2/Kv2.1 entspricht dabei in hohem Maße dem des von Beech und Barnes beschriebenen IKx und lässt vermuten, dass Kv2.1 die primäre Kaliumkanal-Untereinheit sein könnte, mit der Kv8.2 assoziiert ist. Es wird postuliert, dass dieser spannungsgesteuerte Kaliumkanal in Photorezeptoren mit der modulatorischen Untereinheit Kv8.2 an der Signalverstärkung bzw. -dämpfung der lichtinduzierten Membranpotentialänderungen im Innensegment beteiligt ist (Czirjak et al. 2007).

1.4 Tiermodelle

1.4.1 *knockout*-Tiermodelle in der pharmakologischen Forschung

Seit langer Zeit werden in der biomedizinischen Forschung Tiere als Modellorganismen für Krankheiten eingesetzt, um die Pathophysiologie von Erkrankungen zu erforschen und therapeutische Strategien zu entwickeln. Mit Abschluss des humanen Genomprojekts im Jahr 2001 (Venter et al. 2001) und des Mausgenomprojekts 2002 (Waterston et al. 2002) konnten ca. 30.000 Gene im jeweiligen Organismus identifiziert werden, aber nur ein Bruchteil dieser Gene konnte bislang bezüglich seiner genauen Funktion *in vivo* charakterisiert werden. Hier bietet die Methode des *gene targeting* eine Möglichkeit, die biologische Funktion eines Gens durch gezielte Inaktivierung (*knockout*) aufzuklären oder Auswirkungen von Mutationen durch gezieltes Einfügen der entsprechenden Mutation ins Genom des Modellorganismus (*knockin*) zu studieren. Unterschiede im Phänotyp zwischen *knockout* beziehungsweise *knockin* (mutiertes Genom) und Wildtyp (unverändertes Genom) können analysiert und somit die Funktion des Gens *in vivo* ermittelt werden. *Gene targeting* ist grundsätzlich in jedem Organismus möglich, *knockout*-Experimente wurden unter anderem an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Rong & Golic 2001), am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Plasterk & Groenen 1992) und am Zebrafisch *Danio rerio* (Nasevicius & Ekker 2001) durchgeführt. Ein besseres Modell für menschliche Erkrankungen stellt allerdings die Maus *Mus musculus* dar, da es sich hierbei ebenfalls um ein Säugetier handelt und die Maus eine große genetische Ähnlichkeit mit dem Menschen besitzt. Beide Organismen weisen ungefähr dieselbe Anzahl an proteincodierenden Genen auf, und für die überwiegende Anzahl konnte bislang Orthologie nachgewiesen werden. Nur für ca. 1% der Gene gibt es kein entsprechendes Orthologon in der jeweils anderen Spezies (Waterston et al. 2002). Hinzu kommt die geringe Größe und relativ einfache Handhabung der Mäuse sowie eine kurze Generationszeit bei hoher Reproduktionsrate.

1.4.2 Gentechnisch modifizierte Mäuse durch homologe Rekombination

1.4.2.1 Stammzell-Technologie

Die Voraussetzung für ein erfolgreiches *gene targeting* ist die Verfügbarkeit von embryonalen Stammzellen (ES). ES-Zellen besitzen die Eigenschaft der Pluripotenz, sie sind also noch nicht ausdifferenziert und können sich abhängig von den äußeren Bedingungen zu fast allen Geweben und Körperzelltypen entwickeln. Pluripotente embryonale Stammzellen von Mäusen wurden erstmals von Evans und Kaufmann sowie Martin erfolgreich isoliert und kultiviert (Evans & Kaufman 1981; Martin 1981), und schon wenige Jahre später gelang Bradley erstmalig die Generierung chimärer Mäuse mit Keimbahngängigkeit (Bradley et al. 1984). Die Gewinnung muriner embryonaler Stammzellen erfolgt in der Regel aus der inneren Zellmasse einer 3,5 Tage alten Blastozyste. Diese ES-Zellen können durch die Wahl der Kulturbedingungen in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden. Da die Entnahme der Zellen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste erfolgt, können sie sich allerdings nicht zu Geweben differenzieren, die aus dem Trophoblast (äußere Zellmasse der

Blastozyste) entstehen, wie beispielsweise die Nabelschnur oder die Plazenta (Beddington & Robertson 1989).

Nach dem Einführen einer gewünschten Veränderung ins Genom der embryonalen Stammzellen durch homologe Rekombination (siehe 1.4.2.2) können diese anschließend mittels Mikroinjektion in Blastozysten eingebracht werden. Bereits 1984 konnten Bradley und Mitarbeiter zeigen, dass embryonale Stammzellen zu allen Geweben in chimären Tieren beitragen können, die durch Injektion der ES-Zellen in Blastozysten erzeugt wurden (Bradley et al. 1984). Nach Reimplantation in eine Ammenmaus entstehen in der F0-Generation also chimäre Nachkommen, die mosaikartig aus Zellen der Blastozyste und genetisch manipulierten ES-Zellen aufgebaut sind. Wenn die verwendeten embryonalen Stammzellen und die Blastozyste aus Tieren mit unterschiedlichen Fellfarben stammen, kann man anhand der Fellfarbe der chimären Nachkommen den Grad des Chimärismus abschätzen. Ein hoher Grad an Chimärismus bedeutet, dass ein großer Anteil der Gewebe aus den eingebrachten, veränderten ES-Zellen hervorgegangen ist. Tragen die Keimbahnzellen die gewünschte Mutation, so können durch Verpaarung mit wildtyp-Mäusen heterozygote Nachkommen generiert werden.

1.4.2.2 *gene targeting* durch homologe Rekombination

Beim sogenannten *gene targeting* macht man sich das Prinzip der homologen Rekombination in Säugerzellen zu Nutze. Dabei lagern sich homologe Genabschnitte aneinander und werden durch *crossing over* ausgetauscht, was physiologisch in der Meiose stattfindet. Mit Hilfe der homologen Rekombination können durch künstliches Einbringen von homologen DNS-Sequenzen ganz gezielt Erbgutabschnitte auf Chromosomen durch manipulierte Kopien ersetzt werden (Thomas et al. 1986; Capecchi 1989). Die erste homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen wurde im Hprt-Genlocus beschrieben, der für das am Purinstoffwechsel beteiligte Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase kodiert (Thomas & Capecchi 1987). Schließlich gelang 1989 die Generierung von genetisch veränderten Mäusen durch homologe Rekombination (Koller et al. 1989).

Zur Durchführung des *gene targeting* ist ein DNS-Konstrukt erforderlich, welches die gewünschte Veränderung trägt. Über dieses Plasmid, auch als „Targeting-Konstrukt“ bezeichnet, wird die gewünschte Manipulation durch Elektroporation in ES-Zellen von Mäusen eingebracht. Es gliedert sich in insgesamt vier Bereiche: 1) einen Homologiebereich, der sich in 5'-Richtung des zu deletierenden/zu verändernden DNS-Abschnitts befindet, 2) den Abschnitt, welcher die Veränderung beinhaltet, 3) einen 3'-Homologie-Bereich und 4) das Vektor-Grundgerüst. Nach Linearisierung kann sich das Targeting-Konstrukt mit seinen homologen Bereichen, oft auch als „Arme“ bezeichnet, an die Zielsequenz anlagern, worauf es anschließend zum Austausch der entsprechenden DNS-Abschnitte durch doppeltes *crossing over* kommt (Abbildung 1.5).

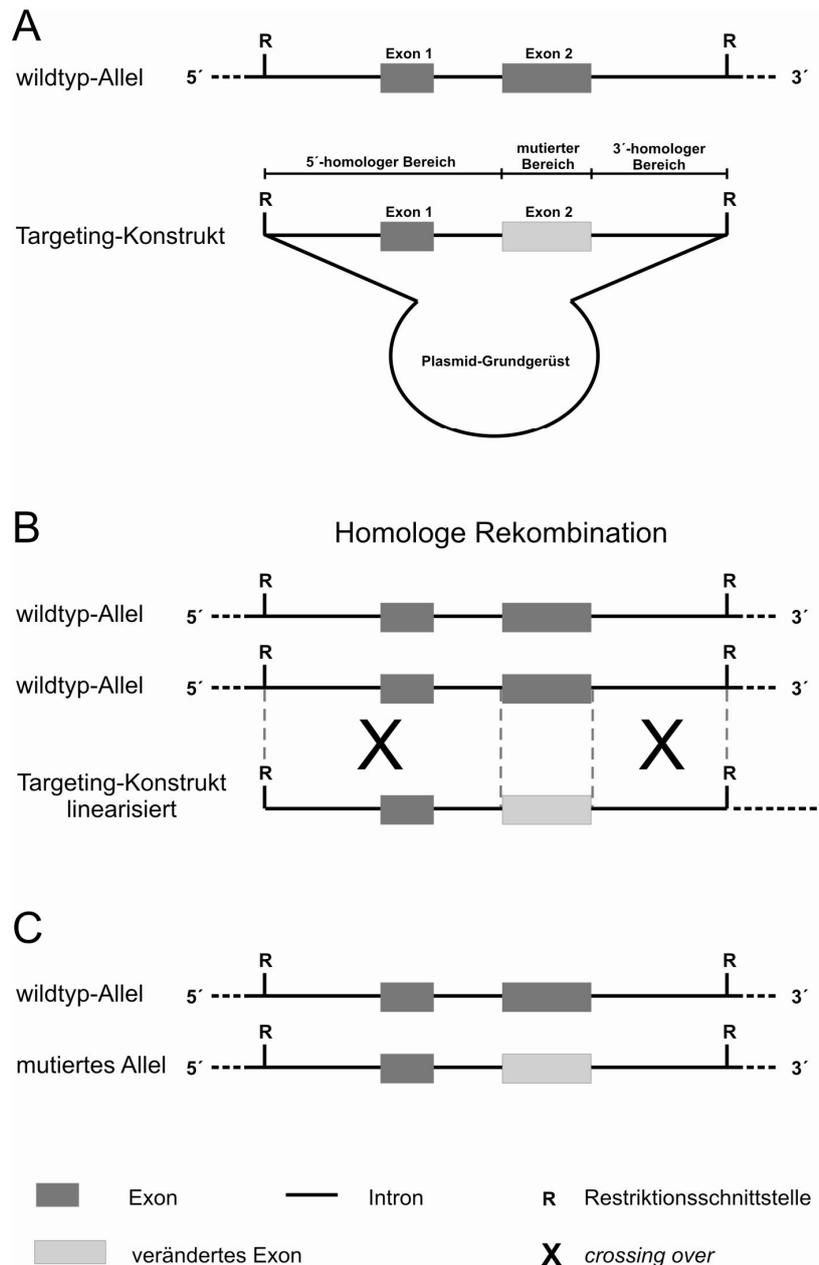


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung eines *gene targeting*

(A) Aufbau des Targeting-Konstrukts im Vergleich zu einem wildtyp-Allel. (B) Homologe Rekombination durch *crossing over* auf einem Allel. (C) Zustand nach homologer Rekombination.

Die Effizienz der homologen Rekombination ist dabei von mehreren Faktoren abhängig, unter anderem spielt die Länge der homologen Bereiche eine wichtige Rolle (Hasty et al. 1991), auch die Zugänglichkeit des Zielgenorts ist von hoher Bedeutung. Optimale Längen der homologen Arme liegen bei ca. 3-10 kb, so dass das Gesamtkonstrukt eine Größe von mindestens ca. 20 kb besitzt. Durch größere Homologiebereiche würde die Effizienz der homologen Rekombination zwar weiter erhöht werden, in ihrer Handhabung speziell bei Klonierungen sind derartig große Fragmente aber wenig praktikabel. Die homologe Rekombination ist grundsätzlich ein sehr seltenes Ereignis, die Raten für eine korrekte Rekombination liegen bei etwa 0,1% (Thomas et al. 1986).

Zusätzlich beinhaltet das Targeting-Konstrukt oft noch positive und/oder negative Selektionsmarker in Form einer Resistenzgenkassette. Mit Hilfe des positiven Selektionsmarkers können Klone mit integriertem Targeting-Konstrukt von nicht-transfizierten Zellen unterschieden werden. Hierfür kommt häufig das Neomycin-Phosphotransferase-Gen (Neo) zum Einsatz, welches Resistenz gegenüber dem Neomycin-Analogon G418 (Geneticin) vermittelt. Wenn ES-Zellen nach der Elektroporation in G418-haltigem Medium kultiviert werden, so überleben nur diejenigen Zellen die Selektion, welche das Konstrukt mit Selektionskassette ins Genom integriert haben. Die verbleibenden Klone müssen dann zusätzlich noch mittels Southern Blot oder PCR auf korrekte homologe Rekombination überprüft werden.

1.4.2.3 Konstitutive und konditionale Mutagenese durch das Cre/loxP-System

Für geraume Zeit war die Inaktivierung von Genen durch das Ersetzen eines für die Genfunktion wichtigen Teils durch die Neomycin-Resistenzgenkassette eine gängige Methode zur Generierung von *knockout*-Mäusen. Nachteilig hierbei ist allerdings die Tatsache, dass beispielsweise der Phänotyp durch veränderte Genexpression beeinflusst werden kann, Unterschiede zwischen Wildtyp und *knockout* können nicht eindeutig dem Fehlen des Gens zugeordnet werden. So ist beispielsweise für das Neomycin-Resistenzgen bekannt, dass es zu hypomorphen Allelen führen kann. Dies bedeutet, dass bei ansonsten unverändertem Allel allein die Anwesenheit des Neomycin-Resistenzgens zu einer verminderten Expression desjenigen Gens führt, in dessen Intron das Neomycin-Resistenzgen inseriert wurde (Meyers et al. 1998; Nagy et al. 1998; Xu et al. 2001).

Bereits 1983 etablierten Abremski et al. das Cre/loxP-System, welches die Möglichkeit eröffnet, die Resistenzgenkassette noch in Zellkultur zu entfernen oder auch verschiedene andere Genabschnitte in Zellkultur zu deletieren (Abremski et al. 1983). Es handelt sich um ein Rekombinase-System, bei dem das Enzym Cre-Rekombinase (Cre = *causes recombination*) eine spezifische Erkennungssequenz detektieren und schneiden kann (Sauer & Henderson 1989). Diese Erkennungssequenz wird als loxP-Sequenz (*locus of crossing over* (x) des Phagen P1) bezeichnet. Die Cre-Rekombinase erkennt diese Abfolge von 34 Basenpaaren, bei der jeweils 13 palindromisch angeordnete Basen eine unsymmetrische Sequenz aus acht Basen flankieren (Hoess & Abremski 1984). Über die Orientierung der loxP-Sequenzen wird die Art der Rekombination bestimmt. DNS-Abschnitte zwischen zwei loxP-Sequenzen in gleicher Orientierung werden unter Zyklisierung aus dem Genom ausgeschnitten, wobei eine singuläre loxP im Genom erhalten bleibt. Sind die loxP-Sequenzen gegensätzlich orientiert, kommt es zu einer Inversion der flankierten Sequenz (Branda & Dymecki 2004) (Abbildung 1.6). Die Cre-Rekombinase benötigt keine weiteren Kofaktoren oder akzessorische Proteine und weist bei 37°C optimale Aktivität auf, so dass sie sich sehr gut für die genetische Manipulation in ES-Zellen und Mäusen eignet (Kilby et al. 1993).

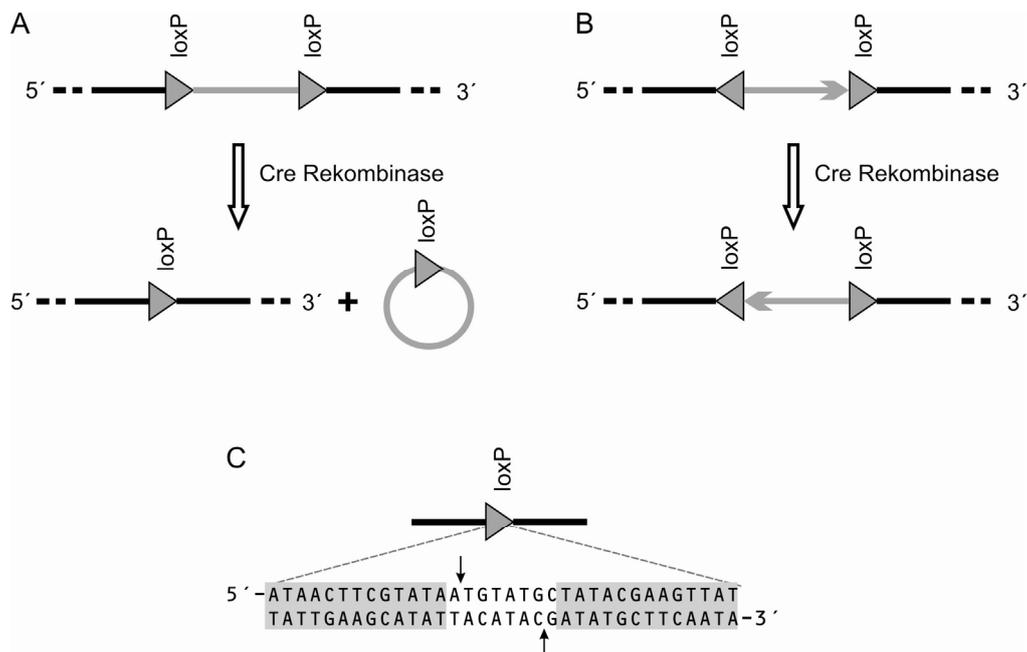


Abbildung 1.6: Das Cre/loxP-System

(A) Cre-Rekombinase vermittelte Gendeletion bei gleichgerichteten loxP-Erkennungssequenzen. (B) Rekombination zwischen gegensätzlich orientierten loxP-Sequenzen mit Inversion des flanked Bereichs. (C) loxP-Erkennungssequenz mit palindromischen Basen (grau hinterlegt) und Schnittstellen der Cre-Rekombinase (Pfeile).

Das Cre/loxP-System ermöglicht zudem die Generierung des sogenannten „konditionalen“ *knockouts* (Gu et al. 1994; Rajewsky et al. 1996). Hierbei werden funktional wichtige Genabschnitte von zwei loxP-Erkennungssequenzen flankiert („*floxed*“), das Gen selbst aber bleibt zunächst intakt. Der Selektionsmarker wird ebenfalls von zwei loxP-Sequenzen flankiert, so dass das mutierte Allel insgesamt drei loxP-Sites (L3) sowie die Selektionskassette aufweist. In einem sogenannten 1. Targeting werden embryonale Stammzellen mit dem gewünschten Targeting-Konstrukt mit „geflochten“ Genabschnitten transfiziert, mit G418 selektiert und die generierten Zellklone auf homologe Rekombination überprüft. In einem 2. Targeting werden Zellen mit homologer Rekombination dann mit einem Cre-Expressionsvektor transfiziert, die Cre-Rekombinase wird transient exprimiert und schneidet Genabschnitte zwischen gleichgerichteten loxP-Sequenzen aus. Durch Rekombination von jeweils zwei loxP-Stellen können bei einem solchen Konstrukt also theoretisch insgesamt drei Rekombinationsereignisse eintreten. Beim konstitutiven *knockout* (L1) ist nur noch eine loxP-Sequenz im Genom vorhanden, der konditionale *knockout* hingegen besitzt noch zwei Erkennungssequenzen (L2), die den zu deletierenden Genabschnitt flankieren. Unter Verwendung einer geflochten, kombinierten positiv-negativ-Selektionskassette mit dem *Herpes simplex* Thymidinkinase-Gen (TK), welches Empfindlichkeit gegenüber Ganciclovir vermittelt, können diejenigen Klone, bei denen nur noch die geflochte Kassette im Genom vorhanden ist, durch Verwendung von Ganciclovir-haltigem Medium eliminiert werden. Es handelt sich im 2. Targeting also um eine Negativselektion. Mittels Southern Blot oder PCR können die überlebenden Zellklone dann auf die eingetretene Rekombination hin überprüft werden, hierbei sollten nur noch der konstitutive und der konditionale *knockout* auftreten (Abbildung 1.7).

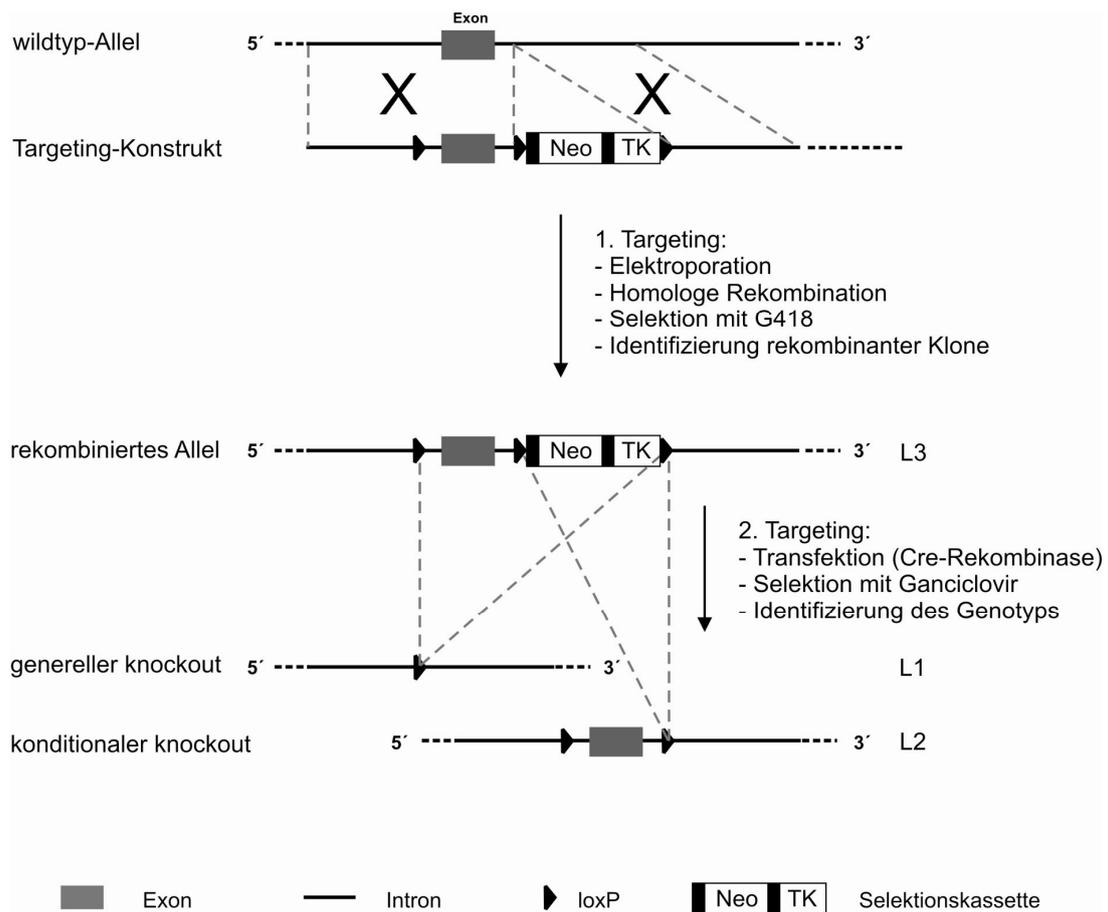


Abbildung 1.7: Konstitutive und konditionale Mutagenese mittels Cre/loxP

Schematische Darstellung eines wildtyp-Locus und des zugehörigen Targeting-Konstrukts mit drei loxP-Erkennungssequenzen sowie einer Selektionskassette. Im ersten Targeting wird das DNS-Konstrukt durch homologe Rekombination in embryonale Stammzellen der Maus eingebracht und eine Selektion mit G418 durchgeführt (oben). Korrekt rekombinierte Klone (L3) werden anschließend in einem zweiten Targeting mit einem Cre-Expressionsvektor transfiziert und eine Negativselektion mit Ganciclovir gestartet. Bei überlebenden Zellklonen handelt es sich entweder um den konstitutiven *knockout* (L1) mit kompletter Gendeletion oder um den konditionalen *knockout* (L2) ohne Selektionskassette, aber mit durch loxP-Sequenzen flankierten Genabschnitten (unten).

Vorteil des konditionalen *knockouts* ist, dass die Deletion des entsprechenden Gens ausschließlich in bestimmten Geweben oder zu bestimmten Zeitpunkten erreicht werden kann (Rajewsky et al. 1996). Damit ist auch die Untersuchung der Funktion von Genprodukten, deren Verlust eigentlich embryonal oder postnatal letal wäre, möglich. Zunächst müssen hierfür die gewünschten Veränderungen, also die „gefloxten“ Genbereiche wie oben beschrieben über homologe Rekombination in ES-Zellen von Mäusen eingebracht werden. Tiere mit konditionalem *knockout* unterscheiden sich nur durch die beiden loxP-Sequenzen vom Wildtyp, und bislang wurde kein Einfluss dieser kurzen DNS-Sequenzen auf die Genexpression bekannt (Babinet & Cohen-Tannoudji 2001). Um eine Deletion des Gens mit Hilfe der Cre-Rekombinase in der Maus zu erreichen, bedient man sich transgener Mäuse, welche die Cre-Rekombinase unter einem entsprechenden, beispielsweise gewebespezifischen Promotor exprimieren. Durch Verpaarung der „gefloxten“ Tiere mit den Cre-transgenen Mäusen entfernt die Cre-Rekombinase den Genabschnitt zwischen zwei loxP-Sequenzen in allen Geweben, in denen sie exprimiert wird (Gu et al. 1994). Zur zeitabhängigen

Inaktivierung kann eine ligandenaktivierte Cre-Rekombinase zum Einsatz kommen (Feil et al. 1996; Kellendonk et al. 1996; Danielian et al. 1998). Hierfür wird beispielsweise die Ligandenbindungsdomäne des Estrogenrezeptors an die Cre-Rekombinase fusioniert, so dass die Aktivität der Rekombinase abhängig wird von der Anwesenheit des Östrogenrezeptormodulators Tamoxifen – erst durch Zufuhr von Tamoxifen über die Nahrung oder durch Injektion wird die Rekombinase aktiv und somit der *knockout* zeitabhängig generiert. Durch Verpaarung mit „Cre-Deleter“-Mäusen, welche die Cre-Rekombinase in Keimzellen oder in frühen Embryonalstadien exprimieren, können aus Mäusen mit konditionalem *knockout* (L2) oder zusätzlich der NeoTK-Kassette (L3) auch Nachkommen mit konstitutivem *knockout* generiert werden.

1.4.3 Tiermodelle für erbliche Netzhauterkrankungen

Die Generierung von Tiermodellen für erbliche Netzhauterkrankungen eröffnet die Möglichkeit, den Krankheitsprozess unter kontrollierten Bedingungen auf zellulärer Ebene und im nativen System der Netzhaut mit funktionellen und invasiven Methoden zu analysieren. Seit der Entwicklung erster Mausmutanten für erbliche Netzhauterkrankungen (al-Ubaidi et al. 1992; Olsson et al. 1992) sind zahlreiche *knockout*- und *knockin*-Mutanten entwickelt und charakterisiert worden. Neben den natürlichen Mutanten wie beispielsweise der rd1-Maus (Chang et al. 2002) und systematischen Mutageneseansätzen wie den ENU-Screens (Balling 2001) konnten mit gezielt erzeugten Mausmutanten auf dem Gebiet der erblichen Netzhauterkrankungen wichtige Fortschritte in der Erforschung der Pathogenese der Erkrankungen erzielt werden. In der aktuellen Literatur finden sich zahlreiche Publikationen, die sich mit der Etablierung und der Analyse von Tiermodellen für erbliche Netzhauterkrankungen beschäftigen. Übersichtsarbeiten wurden beispielsweise von Chang et al. oder Fauser et al. erstellt (Chang et al. 2002; Fauser et al. 2002).

Im Folgenden werden einige für die vorliegende Arbeit interessanten Tiermodelle mit Mutationen oder Deletionen in Genen, die für Untereinheiten der Photorezeptor-Phosphodiesterasen kodieren, erläutert. Mutationen in PDE6A beziehungsweise PDE6B beim Menschen verursachen autosomal-rezessiv vererbte Formen der Retinitis pigmentosa oder auch Nachtblindheit (McLaughlin et al. 1993; Gal et al. 1994; Huang et al. 1995). Klassisches Beispiel eines natürlichen Mausmodells für eine Mutation im Pde6b-Gen ist die rd1-Maus (Chang et al. 2002), die eine *nonsense*-Mutation in Pde6b aufweist und eine früh beginnende, schwere retinale Degeneration zeigt. Auch für Pde6a wurden kürzlich die ersten Mausmutanten mit Photorezeptordegeneration publiziert. Zwei verschiedene in ENU-Screenings identifizierte *missense*-Mutationen in hochkonservierten Regionen von Pde6a führten hierbei zu reduzierter Aktivität der PDE, veränderten cGMP-Spiegeln und progressiver Photorezeptor-Degeneration (Sakamoto et al. 2009).

Krankheitsassoziierte Mutationen im PDE6G-Gen sind beim Menschen bislang nicht bekannt. Bei der Deletion des Pde6g-Gens in der Maus zeigen sich allerdings pathologische Veränderungen der Stäbchenfunktion sowie eine der Retinitis pigmentosa ähnliche Netzhautdegeneration. Im Elektroretinogramm findet sich bei diesen Mäusen eine altersabhängig verminderte Antwort sowohl in der a-Welle als auch der b-Welle, was auf einen progressiven Verlust der Photorezeptorfunktion hindeutet. Im Alter von drei Monaten

war ein ERG praktisch nicht mehr zu detektieren. Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass die Außensegmente der Photorezeptoren nicht normal entwickelt waren, und mit zunehmendem Alter verschwanden diese völlig, es kam zum Verlust der gesamten Photorezeptorzellschicht. Interessanterweise war bei den *Pde6g-knockout*-Tieren der cGMP-Spiegel zu einem Zeitpunkt, an dem noch Photorezeptoren vorhanden waren, wider Erwarten erhöht. Es wird postuliert, dass ein funktionaler Enzymkomplex der Photorezeptor-PDE nur bei Anwesenheit aller Untereinheiten gebildet werden kann (Tsang et al. 1996).

Eine Punktmutation im *Pde6g*-Gen der Maus führt zu Veränderungen im ERG, die dem Erscheinungsbild der humanen kongenitalen stationären Nachtblindheit ähneln. Die Tiere weisen elektoretinographisch altersunabhängig eine desensitisierte, verzögerte Stäbchen-b-Welle im Bereich der Reizschwelle und bei höheren Lichtintensitäten eine verlängerte b-Welle auf. Das Zapfen-ERG bleibt dabei vergleichbar mit den wildtyp-Kontrollen (Salchow et al. 1999). Auch ein über AAV (*adenoassociated virus*) vermittelter Ribozym-*knockdown* der inhibitorischen γ -Untereinheit der Stäbchen-PDE in wildtyp-Mäusen resultiert in einer verminderten elektoretinographischen Antwort und morphologischen Veränderungen der Retina (Liu et al. 2005).

Chang und Mitarbeiter konnten kürzlich Mutationen im *Pde6c*-Gen bei der *cpfl1*-Maus (*cone photoreceptor function loss*) identifizieren (Chang et al. 2009). Bei der *cpfl1*-Maus handelt es sich um eine natürliche Mutante mit Komplettverlust der Zapfenfunktion (Chang et al. 2002). Die dunkeladaptierten ERG-Antworten der Mäuse sind normal, während die lichtadaptierten Antworten, welche die Zapfenfunktion repräsentieren, fast abwesend sind. Morphologisch zeigt sich ein schnell voranschreitender Zapfenverlust. In einem Screening von Patienten mit Achromatopsie, die keine Mutationen in schon bekannten Achromatopsie-Genen trugen, konnten ebenfalls verschiedene Mutationen in *PDE6C* identifiziert werden (Chang et al. 2009). Auch beim Zebrafisch führen Mutationen im *pde6c*-Gen zu unterschiedlich ausgeprägten Zapfen-Degenerationen (Stearns et al. 2007; Nishiwaki et al. 2008).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Erbliche Netzhauterkrankungen sind eine klinisch und auch genetisch sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen, die zu schweren visuellen Funktionsausfällen bis hin zur Erblindung führen können. Die Mehrzahl der bei erblichen Netzhauterkrankungen betroffenen Gene sind in ihrer zellulären Funktion bei Mensch und Maus weitgehend homolog, so dass Tier- bzw. speziell Mausmodelle häufig zum Einsatz kommen, um die Pathophysiologie der Erkrankungen zu evaluieren, neue Krankheitsgene zu identifizieren oder auch um die Funktion von bislang wenig erforschten Proteinen zu untersuchen.

In der biomedizinischen Forschung werden *knockout*-Mäuse sehr häufig verwendet, um die biologische Funktion eines Proteins zu evaluieren. Durch gezielte Inaktivierung des für das entsprechende Protein codierenden Gens können Tiere generiert werden, denen genau das gewünschte Protein fehlt. Im Vergleich zwischen *knockout*- und wildtyp-Geschwistertieren kann der Phänotyp der Mäuse bestimmt und daraus Rückschlüsse auf die Protein- und Genfunktion gezogen werden. Gegenüber *in vitro*-Untersuchungen besteht hierbei der Vorteil, dass die Physiologie direkt am lebenden Organismus studiert werden kann. Zudem dienen *knockout*-Mäuse auch der Etablierung neuer Behandlungsmethoden oder der Testung von neu entwickelten Medikamenten, bevor diese am Menschen zur Anwendung kommen.

Mit dem Ziel, die biologische Funktion der inhibitorischen Untereinheit der Zapfen-Phosphodiesterase (Pde6h) sowie einer modulatorischen Untereinheit des spannungsgesteuerten Kaliumkanals (Kcnv2) in Photorezeptoren zu evaluieren und ihre Bedeutung im Rahmen der Entstehung erblicher Netzhauterkrankungen zu erforschen, sollten in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene *knockout*-Mausmodelle entwickelt werden.

Zur Generierung der Pde6h-*knockout*-Maus wurde der Pde6h-Genort genau analysiert und eine geeignete Strategie zur Generierung sowohl einer konstitutiven als auch einer konditionalen Gendeletion entworfen. Mit Hilfe dieser Strategie sollte ein Targeting-Vektor mittels molekularbiologischer Methoden konstruiert und dieser durch homologe Rekombination in embryonale Stammzellen der Maus eingebracht werden. Unter Verwendung des Cre/loxP-Systems sollte dann der jeweilige *knockout* generiert und so die entsprechenden Mauslinien etabliert werden. Zum Nachweis des Fehlens des entsprechenden Proteins war zudem die Generierung eines polyklonalen Antikörpers erforderlich, welcher spezifisch Pde6h in Zapfen detektiert, so dass durch Immunfluoreszenz-Analyse der *knockout* bestätigt und die Expression der Pde6h zukünftig auch in weiteren Geweben untersucht werden kann.

Für die Generierung des Kcnv2-*knockout*-Modells stand schon ein fertiges Targeting-Konstrukt zur Verfügung, so dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Konstrukt ebenfalls durch homologe Rekombination in embryonale Stammzellen der Maus eingebracht wurde. Mittels Cre-Rekombinase sollten auch hier in Zellkultur entsprechende *knockout*-Klone generiert werden, und nach Blastozysteninjektion im weiteren Verlauf werden diese Klone dann zukünftig in Ammenmäuse eingebracht und so die entsprechende Mauslinie aufgebaut.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Adenosintriphosphat	Roth, Karlsruhe
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
Casein Hydrolysat	Gerbu, Gaiberg
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ficoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ganciclovir-Natrium (Cymeven [®])	Roche Pharma, Grenzach-Wyhlen
Geneticinlösung (G418)	Calbiochem, Darmstadt
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
LIF (ESGRO [®])	Chemicon/Millipore GmbH, Schwalbach
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, Berlin
Trypton	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	SERVA, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

Radiochemikalie	Bezugsquelle
α -32P dATP	GE-Healthcare, Freiburg Hartmann Analytic, Braunschweig
α -32P dCTP	GE-Healthcare, Freiburg Hartmann Analytic, Braunschweig

2.2 Kit-Systeme

2.2.1 DNS-Isolierung

Kit	Bestellnummer	Bezugsquelle
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	K0503	Fermentas, St. Leon-Rot
High Pure PCR Template Preparation Kit	11 769 828 001	Roche Diagnostics, Mannheim
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	12662	Qiagen, Hilden
Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	28903470	GE Healthcare, München
MinElute Gel Extraction Kit	28604	Qiagen, Hilden
peqGOLD Fastfilter Plasmid Maxi Kit	12-6924-02	peqlab, Erlangen
Perfectprep Plasmid Mini Kit	0032 005 500	Eppendorf, Hamburg
Qiagen Large-Construct Kit	12462	Qiagen, Hilden

2.2.2 Klonierung

Kit	Bestellnummer	Bezugsquelle
TOPO TA Cloning Kit	K4500-01	Invitrogen, Karlsruhe
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	K2750-20	Invitrogen, Karlsruhe

2.2.3 PCR

Kit	Bestellnummer	Bezugsquelle
Long PCR Enzyme Mix	K0182	Fermentas, St. Leon-Rot
Mycoplasma Plus PCR Primer Set	302008	Stratagene, Amsterdam, NL

2.2.4 Southern Blotting

Kit	Bestellnummer	Bezugsquelle
NEBlot Kit	N1500L	New England Biolabs, Frankfurt

2.3 Enzyme

2.3.1 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungssequenz	Bestellnummer	Bezugsquelle
Acl I	AA/CGTT	R0598S	New England Biolabs, Frankfurt
BamH I	G/GATCC	R0136S	New England Biolabs, Frankfurt
Cla I	AT/CGAT	R0197S	New England Biolabs, Frankfurt
EcoR I	G/AATTC	R0101S	New England Biolabs, Frankfurt
Hind III	A/AGCTT	R0104S	New England Biolabs, Frankfurt
Kpn I	GGTAC/C	R0142S	New England Biolabs, Frankfurt
Nde I	CA/TATG	R0111S	New England Biolabs, Frankfurt
Not I	GC/GGCCGC	R0189S	New England Biolabs, Frankfurt
Pst I	CTGCA/G	R0140S	New England Biolabs, Frankfurt
Sal I	G/TCGAC	R0138S	New England Biolabs, Frankfurt
Spe I	A/CTAGT	R0133S	New England Biolabs, Frankfurt
Xba I	T/CTAGA	R0145S	New England Biolabs, Frankfurt

2.3.2 Polymerasen

Enzym	Bestellnummer	Bezugsquelle
Platinum Pfx Polymerase	11708-013	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNS Polymerase	11435094001	Roche Diagnostics, Mannheim

2.3.3 DNS modifizierende Enzyme

Enzym	Bestellnummer	Bezugsquelle
Antarctic Phosphatase	M0289S	New England Biolabs, Frankfurt
CIP (Calf Intestinal Phosphatase)	M0290S	New England Biolabs, Frankfurt
T4 DNS Ligase	M0202S	New England Biolabs, Frankfurt

2.3.4 Sonstige Enzyme

Enzym	Bestellnummer	Bezugsquelle
Proteinase K	14581200	Roche Diagnostics, Mannheim

2.4 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	T _m (°C)	Verwendung
Pde6h			
CB_F3	GAGCGACTGCTGCTCTTGAGAGT	64,2	Screening BAC-DNS-Bank
CB_R3	GGATGGTCTCACATCTAGCTAGTCT G	64,8	Screening BAC-DNS-Bank
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG		Ansequenzierung BAC-Insert
T7	TAATACGACTCACTATAGGG		Ansequenzierung BAC-Insert
CB_F4	GTCACTCTAGAACTAGTATAACTTCG TATAATGTATGCTATACGAAGTTATA ATGCTTGTGTCCAGATGGC	>75	Generierung des PCR-Fragments mit loxP und Spe I-Schnittstelle
CB_R4	TTTGTGCGACTAAAAGATTTTGAA	51,7	Generierung des PCR-Fragments mit loxP und Spe I-Schnittstelle
CB_F7	TTTCAATAAATCTAAATGTGCTT	50,0	Generierung der 3'-Sonde
CB_R7	AGATTTCTTGAAATTGACAGTC	55,3	Generierung der 3'-Sonde
CB_R6	AACTTCAGCAATCAAGTTTG	54,0	Generierung der 5'-Sonde
CB_F20	GCATCTGGTTTGGTGCCC	58,2	Generierung der 5'-Sonde
CB_A_F9	AATTCATGCTAGCGGCCGCCAGTGA GGTAC	70,9	Neue MCS Hilfsvektor 1
CB_A_R9	CTCACTGGCGGCCGCTAGCATG	67,7	Neue MCS Hilfsvektor 1
CB_A_F10	TCGACAGTCACATCGATGATCTAGG ATCCTACCAGCA	71,7	Neue MCS Hilfsvektor 2
CB_A_R10	TATGCTGGTAGGATCCTAGATCATC GATGAGACTG	69,5	Neue MCS Hilfsvektor 2
CB_A_F11	TCGACAGAACGTTGTATCGATACAA CGTTGCCA	68,2	Neue MCS Hilfsvektor 3
CB_A_R11	TATGGCAACGTTGTATCGATACAAC GTTCTG	65,5	Neue MCS Hilfsvektor 3
CB_F16	CCAGTCCCCAGCATCCAATC	61,4	Sequenzierung des <i>knockout</i> - Konstrukts
CB_R17	CAGAAGCTTGGCATTGTTGTG	55,3	Sequenzierung des <i>knockout</i> - Konstrukts
CB_Neo1	CGATATCAAGCTTGGCTGGACG	62,1	Sequenzierung des <i>knockout</i> - Konstrukts
TK_IA_UI_FW	GTCGACTAGAGCTTGCGGAAC	54,0	Sequenzierung des <i>knockout</i> - Konstrukts
CB_F18	CACAAAATGCCAAGCTTCTG	55,3	Sequenzierung des <i>knockout</i> - Konstrukts
CB_F19	CCCATGCCTTCCAGCAATG	61,4	Sequenzierung des <i>knockout</i> - Konstrukts
CB_Geno_F1	TCCATGTGAACAGGGAGCCAG	61,8	Genotypisierungs-PCR L1/L2
CB_Geno_F2	CGATGTGAGCTTAGGGCTCTG	61,8	Genotypisierungs-PCR L1/L2
CB_Geno_R1	AATCCATCTTGTTCAATGGCCG	58,4	Genotypisierungs-PCR L1/L2
CB_Geno_R2	GCCTTCCCTACCCATCCTC	61,0	Genotypisierungs-PCR L1/L2/L3
CB_Geno_F3	GCCGTTTGCTTCACCCCAG	63,5	Genotypisierungs-PCR L3
CB_Geno_R3	CCTCGATATCAAGCTTGGCTG	59,8	Genotypisierungs-PCR L3

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	T _m (°C)	Verwendung
Kcnv2			
V2KO-SP1fw	GACGCAGTCATAGTTTTGATG	55,9	Generierung der 5'-Sonde; 5'-Long Distance-PCR
V2KO-SP1rev	TTTACTTCAAGGGTGGTTCAC	55,9	Generierung der 5'-Sonde
V2KO-SP2fw	GGTGGACCAAGCACTGC	57,6	Generierung der 3'-Sonde
V2KO-SP2rev	GGAAACCACTGCTTAGAGC	56,7	Generierung der 3'-Sonde
V2KO_LDF	CGACTAGAGCTTGCGGAACCCT	64,0	3'-Long Distance-PCR
V2KO_LDR	GGAAGTTTCAACCACAGCTTCCTG	62,7	3'-Long Distance-PCR
IacZ_SR1	GATAACTGCCGTCACTCCA	56,7	5'-Long Distance-PCR
CB_KCNV2_F1	CGACTCCTGGAGCCCGTCAGT	65,7	Genotypisierungs-PCR L1
CB_KCNV2_F2	GTGCACCGACAGGGTGGTGG	65,5	Genotypisierungs-PCR L1
CB_KCNV2_R2	TCTGTTGCCAGGAGGGGACC	63,5	Genotypisierungs-PCR L1
Cre			
CB_Cre_1	ACCTGAAGATGTTGCGGATTATCT	59,3	Genotypisierungs-PCR CMV-Cre-Deleter
CB_Cre_2	ACCGTCAGTACGTGAGATATCTT	58,9	Genotypisierungs-PCR CMV-Cre-Deleter

2.5 Plasmide und BACs

Plasmid	Eigenschaften	Resistenz	Bezugsquelle
pSP72	Standard-Klonierungsvektor	<i>Amp^r</i>	Promega, Mannheim
pGEM5Zf(+)	Standard-Klonierungsvektor	<i>Amp^r</i>	Promega, Mannheim
pUC19 Xba I	Standard-Klonierungsvektor, kommerziell mit Xba I geschnitten und dephosphoryliert	<i>Amp^r</i>	nicht mehr kommerziell erhältlich
pUC19 Sal I	Standard-Klonierungsvektor, kommerziell mit Sal I geschnitten und dephosphoryliert	<i>Amp^r</i>	nicht mehr kommerziell erhältlich
pBSloxPNeoTKloxP	Abgeleitet von pBluescript; trägt die NeoTK-Selektionskassette flankiert von zwei loxP-Sequenzen	<i>Amp^r</i>	nicht kommerziell erhältlich
pCR 2.1 TOPO	TOPO-Vektor mit A-Überhängen, direkte PCR-Klonierung	<i>Amp^r, Kan^r</i>	Invitrogen, Karlsruhe
pCR Blunt TOPO	TOPO-Vektor für direkte blunt end PCR-Klonierung	<i>Kan^r</i>	Invitrogen, Karlsruhe
pBeloBAC11	Klon der Library Nr. 124 (Mouse BAC) mit geeignetem Insert	<i>Chlor^r</i>	ImaGenes, ehemals RZPD, Berlin
pIC CRE	Cre-Expressionsvektor	<i>Amp^r</i>	

2.6 Bakterien

Bakterienstamm	Bestellnummer	Bezugsquelle
E. coli XL10 Gold	200315	Stratagene, Amsterdam
BAC DNS Bank	Mouse BAC (REG)	
Genomic DNA Primary Pool	Library No. 124	
Secondary DNA Pool	REG_B124PP40	
BAC-Einzelklon	REG_B124E01315Q2	ImaGenes, ehemals RZPD, Berlin

2.7 Lösungen für die Stammzellkultur

Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)	FG 0445	Biochrom
FCS (Fötale Kälberserum)		Biochrom
Ganciclovir-Na (Cymeven®)		Roche
Geneticin-Lösung	345810	Calbiochem
LIF (ESGRO®)	ESG1106	Chemicon
PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , mit EDTA	L1825	Biochrom
10xTrypsin/EDTA	L2153	Biochrom
β-Mercaptoethanol	4227.3	Roth

2.8 Verbrauchsmaterial

2.8.1 Molekularbiologie

Material	Größe	Bestellnummer	Bezugsquelle
Blottingpapier	0,36 mm	CL67.1	Roth, Karlsruhe
CHROMA SPIN+TE - Säulen	1000	636079	Clontech, Saint-Germain-En-Laye, F
Einmalpipetten	2 ml	4486	Corning, Schiphol-Rijk, NL
	5 ml	4487	Corning, Schiphol-Rijk, NL
	10 ml	4488	Corning, Schiphol-Rijk, NL
	25 ml	4489	Corning, Schiphol-Rijk, NL
Filterspitzen	P10	771 288	Greiner, Frickenhausen
	P20	774 288	Greiner, Frickenhausen
	P200	739 288	Greiner, Frickenhausen
	P1000	740 288	Greiner, Frickenhausen
Illustra NICK Columns		17085502	GE Healthcare, Freiburg
Kryoröhrchen	1,8 ml	368632	Nunc, Langensfeld
Nylon-Membran (Hybond N)		RPN303N	GE Healthcare, Freiburg
Parafilm		H666.1	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	ungestopft	4522	Roth, Karlsruhe
	gestopft	E327.1	Roth, Karlsruhe
Petrischalen	10 cm	821472	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	200 µl	70760002	Sarstedt, Nümbrecht
	1000 µl	70762200	Sarstedt, Nümbrecht

Material	Größe	Bestellnummer	Bezugsquelle
Reaktionsgefäße	1,5 ml	4182.1	Roth, Karlsruhe
	1,5 ml safelock	0030 120 086	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
	2,0 ml safelock	0030 120 094	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
	12 ml	352059	Nunc, Langenselbold
	15 ml	430766	Corning, Schiphol-Rijk, NL
	50 ml mit Fuß	430897	Corning, Schiphol-Rijk, NL
	50 ml ohne Fuß	430291	Corning, Schiphol-Rijk, NL
	0,5 ml PCR	0030 124 502	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Saran-Folie		9068.1	Roth, Karlsruhe
UV-Küvetten		0030 106 300	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

2.8.2 Zellkultur

Material	Größe	Bestellnummer	Bezugsquelle
Elektroporationsküvetten		165-2081	Bio-Rad, München
Pipettenspitzen (Etips)	300 µl	0030 000 897	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
	1200 µl	0030 000 935	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reagenzien-Trog (Tip-Tub)		0030 058 607	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zellkulturflaschen	25 cm ²	430639	Corning, Schiphol-Rijk, NL
	75 cm ²	430641	Corning, Schiphol-Rijk, NL
	175 cm ²	431080	Corning, Schiphol-Rijk, NL
Zellkulturschalen	10 cm	430167	Corning, Schiphol-Rijk, NL
Zellkulturplatten	6-Loch	3516	Corning, Schiphol-Rijk, NL
	24-Loch	3526	Corning, Schiphol-Rijk, NL
	96-Loch	3599	Corning, Schiphol-Rijk, NL

2.8.3 Sonstiges Material

Material	Bestellnummer	Bezugsquelle
Salmon Sperm DNA	201190	Stratagene, Amsterdam, NL
2-log DNA Ladder	N3200S	New England Biolabs, Frankfurt
Chef DNA Size Standard 8-48kb	170-3707	BioRad, München

2.9 Wasser

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

2.10 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	Subcell Systems, BioRad, München; i-Mupid, Cosmo Bio, Tokyo
Autoklav	Sanoclav, Adolf Wolf, Bad Überkingen-Hausen; 3870 ELV, Tuttnauer Systec, Wetztenberg
Brutschrank	Hera Cell, Heraeus, Hanau; WTB Binder, Tuttlingen
DNS Konzentrator	Concentrator 5301, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Drehofen	OV1, Biometra, Göttingen
Elektroporator	Gene Pulser II, BioRad, München
Gasbrenner	Gasprofi 1, Wild-Tec, Göttingen
Geldokumentationssystem	BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen
Handmonitor	LB122, Berthold, Bad Wildbad
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Magnetrührer	Ikamag RCT, IKA, Staufen
Mikroskop	Hund Wilovert 30, Hund, Wetzlar
Mikrowelle	MWG 800, FiF
PCR-Maschinen	Mastercycler, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; Mastercycler gradient, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
pH-Meter	pH-Meter 761 Calimatic, Knick, Berlin
Phosphorimager	BAS-1500, Fuji, Düsseldorf
Phosphorimagerplatten	BAS-MP 2040s, Fuji, Düsseldorf
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipetten 1-Kanal	Pipetman 10 µl, Gilson, Middleton, USA Pipetman 20 µl, Gilson, Middleton, USA Pipetman 200 µl, Gilson, Middleton, USA Pipetman 1000 µl, Gilson, Middleton, USA
Pipetten 8-Kanal	ResearchPro 20-300 µl, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf ResearchPro 50-1200 µl, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettierhilfe	Accu-Jet, Brand, Wertheim
Schüttelinkubator	KS-10/TH 10, Edmund Bühler, Hechingen
Schüttler	Unimax 1010, Heidolph Instruments, Schwabach Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach
Spannungsquelle	Standard Power Pack, P15, BioRad, München
Sterilwerkbank	Herasafe, Heraeus, Hanau
Stickstoffbehälter	RS series, tec-lab, Königstein
Stickstoff-Vorratstank	XL-100, Taylor-Wharton, Husum
Szintillationszähler	Liquid Scintillation Analyzer1500 TR, Packard, Frankfurt
Trockenschrank	Binder FD, Binder, Tuttlingen
UV-Crosslinker	Biolink DNA Crosslinker, Biometra, Göttingen
Vakuumpumpe	KNF Laboport, KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Vortex	MS1 Minishaker, IKA, Staufen; Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, Bruchsal
Waagen	Mettler PM 4600 Delta Range, Giessen; Sartorius Handy, Sartorius, Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Biocel, Millipore GmbH, Schwalbach
Wasserbad	C10 Thermo Haake, Karlsruhe; T Lauda, Lauda GmbH, Lauda-Königshofen
Weißlicht-Lampe	Konrad Bender, Wiesloch

Gerät	Hersteller
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; Centrifuge 5804, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; Centrifuge 5417 C, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf; MIKRO 22R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen; RC 5C Plus, Sorvall, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifugenrotoren	A6.9, Kontron Hermle, Gosheim; SS34, Sorvall, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3 Methoden

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Medien

Zur Kultivierung von Bakterien wurden abhängig von Verwendungszweck und Bakterienstamm verschiedene Medien eingesetzt. Sämtliche zur Bakterienkultur verwendeten Medien wurden nach der Herstellung bei 121°C und 2 bar Druck für 20 min autoklaviert und anschließend bei RT oder -20°C im Dunkeln gelagert. Durch Zusatz eines geeigneten Antibiotikums in ausreichender Menge wurde die positive Selektion plasmidtragender Bakterien ermöglicht.

Für Mini- und Maxipräparationen von Plasmid-DNS sowie für BAC-Präparationen aus *E. coli* wurde Luria-Bertani (LB)-Medium verwendet. Die Kultivierung von Bakterien nach einer Transformation erfolgte mit NZY⁺-Medium.

Medium	Zusammensetzung	
LB	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
NZY ⁺	Casein Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
	<i>autoklavieren, pH-Einstellung mit NaOH auf 7,5</i>	
	1 M MgCl ₂ sterilfiltriert	12,5 ml
	1 M MgSO ₄ sterilfiltriert	12,5 ml
Glucose 20%(w/v) sterilfiltriert	20 ml	

Für die Herstellung von Festmedium (LB-Agar) wurde dem LB-Medium vor der Sterilisation Agar hinzugefügt und das Medium anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde das jeweilige Antibiotikum in der erforderlichen Menge zugesetzt und die Lösung in Petrischalen ausgegossen. Die Lagerung der fertigen Platten erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Medium	Zusammensetzung	
LB-Agar	Agar	13,5 g
	LB-Medium	ad 1000 ml

Die Antibiotika wurden in entsprechender Menge Millipore-H₂O oder Ethanol (100%) gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C als 1 ml-Aliquots gelagert.

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin-Na	50 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml (1:500)
Kanamycin	10 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml (1:200)
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	170 µg/ml (1:200)

3.1.2 Kultivierung

Für Flüssigkulturen wurde die benötigte Menge LB-Medium (Minipräparation und Starterkultur 3 ml, Maxipräparation 200 ml, BAC-Präparation 500 ml) mit der entsprechenden Menge Antibiotikum versetzt. Diese Mischung wurde anschließend mit einer Einzelkolonie oder einer kleinen Menge der Starterkultur des gewünschten Bakteriums angeimpft und unter aeroben Bedingungen bei 37°C und 225 rpm für 8-16 h inkubiert.

Nach erfolgter Transformation oder zur Vereinzelnung von Bakterien aus Glycerolstocks (3.1.3) wurde die Bakteriensuspension mit Hilfe eines Drigalskispatels oder einer Impföse auf antibiotikahaltigen Festagarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Diese Plattenkulturen konnten bei 4°C im Dunkeln für ca. 4 Wochen gelagert werden.

3.1.3 Langzeitlagerung

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden 300 µl einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kultur mit 600 µl autoklaviertem Glycerol gemischt und bei -80°C eingefroren.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNS

Die Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterienkulturen beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly 1979). Zunächst werden DNS, RNS und Proteine durch Lyse mit NaOH/SDS denaturiert und die RNS mit Hilfe von RNase A verdaut. Durch anschließende Neutralisation mit Kaliumacetat renaturiert die relativ kleine Plasmid-DNS und bleibt deshalb in Lösung, während die genomische DNS denaturiert bleibt und mit Zelltrümmern, Proteinen und SDS abzentrifugiert werden kann. Die im Überstand gelöste Plasmid-DNS wird dann über eine Silikamatrix in mehreren Waschschritten von Verunreinigungen befreit und mit einem kleinen Volumen Puffer oder Wasser eluiert.

3.2.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNS

Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNS wurden zwei verschiedene kommerziell erhältliche Kits verwendet: das GeneJet Plasmid Miniprep Kit von Fermentas, sowie das Perfectprep Plasmid Mini Kit von Eppendorf. Die Durchführung erfolgte gemäß der vom jeweiligen Hersteller beigefügten Anleitung. Da die Mehrzahl der Präparationen mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit durchgeführt wurde, wird nur diese Methode hier näher beschrieben:

Vorgehensweise:

- Kultivierung der Bakterien (3 ml Medium-Ansatz in einem 12 ml Falcon-Röhrchen) wie in 3.1 beschrieben
- Zentrifugation 4000 rpm, 5 min, 4°C
- Abgießen des Überstands, resuspendieren des Pellets in der restlichen Flüssigkeit, überführen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß
- Zentrifugation 10000 rpm, 1 min, RT
- Überstand abnehmen, resuspendieren des Pellets in 250 µl „Resuspension Solution“ (Kit)
- Zugabe von 250 µl „Lysis solution“ (Kit), mischen durch Invertieren des Reaktionsgefäßes
- Zugabe von 350 µl „Neutralization Solution“ (Kit), intensives Mischen
- Zentrifugation 13000 rpm, 5 min, RT; Durchfluss verwerfen
- Überstand in eine GeneJET™ Säule (Kit) überführen
- Zentrifugation 13000 rpm, 1 min, RT; Durchfluss verwerfen
- Waschen mit 500 µl „Wash Solution“ (Kit)
- Zentrifugation 13000 rpm, 1 min, RT; Durchfluss verwerfen
- Wiederholen des Waschens mit 500 µl „Wash Solution“ (Kit)
- Zentrifugation 13000 rpm, 1 min, RT; Durchfluss verwerfen
- Erneute Zentrifugation 13000 rpm, 1 min, RT
- Zugabe von 50 µl Wasser, Inkubation für 2 min bei RT
- Elution der Plasmid-DNS in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß durch Zentrifugation bei 13000 rpm, 1 min, RT
- Lagerung bei -20°C

3.2.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNS

Größere Ausbeuten an Plasmid-DNS konnten durch Präparation mit dem peqGOLD Fastfilter Plasmid Maxi Kit von Peqlab oder dem HiSpeed Plasmid Maxi Kit von Qiagen erreicht werden. Für die Mehrzahl der Isolierungen wurde das Kit von Peqlab verwendet, dessen Durchführung im Folgenden beschrieben werden soll:

Vorgehensweise:

- Ansetzen einer Starterkultur (3 ml Medium-Ansatz in einem 12 ml Falcon-Röhrchen) wie in 3.1 beschrieben; Inkubation für ca. 8 h bei 37°C und 225 rpm
- Animpfen von 400 ml antibiotikahaltigem LB-Medium mit ca. 1 ml der Starterkultur; Inkubation für ca. 16 h bei 37°C und 225 rpm
- Zentrifugation 6000 rpm, 20 min, 4°C

- Überstand abgießen
- Bakterienpellet in 10 ml „Lösung I/RNase A“ (Kit) resuspendieren und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- Lyse der Bakterien durch Zugabe von 10 ml „Lösung II“ (Kit), vorsichtiges Mischen und Inkubation bei RT bis ein klares Lysat entsteht
- Zugabe von 10 ml „Neutralisierungspuffer“ (Kit), Mischen und Inkubation bei RT bis ein weißer, flockiger Niederschlag entsteht
- Zugabe von 10 ml „GBT-Puffer“ (Kit), vorsichtig mischen und in eine zuvor vorbereitete Filterspritze (Kit) überführen
- Inkubation bei RT für 5 min, dann den Kolben auf die Spritze aufsetzen und das Filtrat in einem 50 ml-Tube aufnehmen
- Vorbereiten der HiBind[®]-Maxi-Säule: 10 ml „GPS-Puffer“ (Kit) in die Säule füllen und diese in ein Sammel-Tube stecken, Zentrifugation 4000 rpm, 2 min, RT; Durchfluss verwerfen
- 20 ml des geklärten Lysats auf die HiBind[®]-Maxi-Säule geben, Zentrifugation 4000 rpm, 2 min, RT; Durchfluss verwerfen. Diesen Schritt so lange wiederholen, bis das gesamte Lysat auf die Säule geladen wurde
- Waschen mit 20 ml „HB-Puffer“ (Kit), Zentrifugation 4000 rpm, 2 min, RT; Durchfluss verwerfen
- Waschen mit 15 ml „Waschpuffer“ (Kit), Zentrifugation 4000 rpm, 2 min, RT; Durchfluss verwerfen
- Waschen mit 10 ml „Waschpuffer“ (Kit), Zentrifugation 4000 rpm, 15 min, RT; Durchfluss und Sammeltube verwerfen
- 1,5 ml H₂O auf die Säule geben, Inkubation bei RT für 2 min
- Plasmid-DNS durch Zentrifugation (4000 rpm, 5 min, RT) in ein frisches 50 ml-Tube eluieren
- Elution mit derselben Menge Wasser wiederholen

3.2.1.3 Präparation von BAC-DNS

BACs (*bacterial artificial chromosomes*) eignen sich für die Arbeit mit sehr großen DNS-Fragmenten. Es handelt sich um zirkuläre, doppelsträngige Plasmide, die bis zu 300 kb an fremder DNS aufnehmen können und auf dem f-Faktor (Fertilitäts)-Plasmid aus *E. coli* beruhen. Sie unterscheiden sich von herkömmlichen Plasmidvektoren vor allem durch ihre niedrige Kopienzahl in der Bakterienzelle, weshalb bei der BAC-DNS-Isolierung im Vergleich zur Maxipräparation nur geringe Mengen an DNS gewonnen werden können. Die Isolierung von BAC-DNS erfolgte mit Hilfe des QIAGEN Large-Construct Kit.

Vorgehensweise:

- Ansetzen einer Starterkultur (3 ml Medium-Ansatz in einem 12 ml Falcon-Röhrchen) wie in 3.1 beschrieben; Inkubation für ca. 8 h bei 37°C und 225 rpm
- Animpfen von 2x 250 ml antibiotikahaltigem LB-Medium mit je 0,5 ml der Starterkultur; Inkubation für ca. 14 h bei 37°C und 225 rpm
- Überführen in je einen 500 ml Zentrifugenbecher; Zentrifugation 6000 rpm, 20 min, 4°C; Überstände abgießen
- Bakterienpellets in je 10 ml „Puffer P1“ (Kit) resuspendieren und in je ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- Zugabe von je 10 ml „Puffer P2“ (Kit), mischen, Inkubation bei RT für 5 min
- Zugabe von je 10 ml des auf 4°C vorgekühlten „Puffers P3“ (Kit), vorsichtiges Mischen
- Inkubation für 10 min auf Eis bis zur Bildung eines weißen, voluminösen Niederschlags; erneutes Mischen
- Zentrifugation 11.000 rpm, 30 min, 4°C
- Überstand abnehmen, über einen Papierfilter, der zuvor mit autoklaviertem Wasser befeuchtet wurde, aufreinigen und in drei 50 ml Zentrifugenröhrchen auffangen
- Fällung durch Zugabe von je 0,6 Volumenteilen kalten Isopropanols (-20°C), Lagerung bei -20°C für ca. 1 h
- Zentrifugation 11.000 rpm, 30 min, 4°C; Überstände abgießen
- DNS-Pellets mit je ca. 2 ml kaltem Ethanol 70% (-20°C) waschen
- Zentrifugation 11.000 rpm, 15 min, 4°C; Überstände vorsichtig abnehmen
- Pellets 2-3 min an der Luft trocknen lassen, Flüssigkeitsreste vorsichtig entfernen
- DNS in 3,2 ml „Puffer EX“ aufnehmen (Kit), Lösungen vereinigen
- Zugabe von 200 µl „ATP-abhängiger Exonuclease“ (Kit) und 300 µl ATP-Lösung (100 mM), vorsichtiges Mischen
- Inkubation für 1 h bei 37°C im Brutschrank
- Vorbereitung der „QIAGEN-tip 500 Säule“ (Kit) durch Zugabe von 10 ml „Puffer QBT“ (Kit), Lösung durchtropfen lassen
- DNS-Lösung aus dem Brutschrank mit 10 ml „Puffer QS“ (Kit) versetzen, mischen und auf die Säule überführen; Durchfluss verwerfen
- Zweimaliges Waschen der Säule mit je 30 ml „Puffer QC“ (Kit)
- Elution der DNS mit 15 ml auf 65°C vorgewärmtem „Puffer QF“ (Kit) in ein 50 ml Zentrifugengefäß
- Fällung durch Zugabe von 1,5 ml 5 M NaCl-Lösung und ca. 36 ml kalten Ethanol 100% (-20°C), mischen

- Lagerung über Nacht bei -20°C
- Zentrifugation 4000 rpm, 4°C, 120 min; Überstand verwerfen
- Waschen des Pellets mit 2 ml kaltem Ethanol 70% (-20°C); dabei Pellet resuspendieren und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugation 13.000 rpm, 4°C, 30 min; Überstand verwerfen
- Waschen des ursprünglichen Pellets im 50 ml Zentrifugengefäß mit 2 ml kaltem Ethanol 70% (-20°C) noch zweimal wiederholen; dabei Reste resuspendieren und in das 2 ml-Reaktionsgefäß mit abzentrifugiertem Pellet überführen
- Zentrifugation je 13.000 rpm, 4°C, 30 min; Überstände verwerfen
- Pellet bei 37°C trocknen
- Lösen der BAC-DNS mit 0,5x TE-Puffer

3.2.2 Isolierung genomischer DNS

Genomische DNS ist auf Grund ihrer Größe ungleich schwieriger zu präparieren als Plasmid-DNS. Zunächst werden die Zellverbände mit Hilfe eines Lysepuffers, der N-Laurylsarcosin als Detergens enthält, aufgeschlossen. Ziel ist die Solubilisierung der Zellmembranen sowie die Denaturierung von Proteinen. Zusätze wie Proteinase K und EDTA führen zum Proteinabbau beziehungsweise zur Komplexbildung mehrwertiger Kationen mit der Folge der Inaktivierung vorhandener DNasen. Schließlich erfolgt die Aufreinigung der DNS durch alkoholische Fällung oder über eine Säule.

3.2.2.1 Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen

ES-Zellen wurden zur Gewinnung genomischer DNS in 96-Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend direkt im well lysiert. Nach alkoholischer Fällung wurde die DNS getrocknet und bei -20°C eingefroren oder mit einem Restriktionsenzym verdaut, dieses dann durch Zugabe eines Gelladepuffers inaktiviert und der gesamte Ansatz ebenfalls bei -20°C bis zum Gelauftrag gelagert.

Vor Verwendung des Lysepuffers wurde diesem jeweils frisch Proteinase K in der benötigten Menge zugesetzt. Für eine 96-Loch-Platte wird eine Mischung aus 6 ml Lysepuffer und 75 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) benötigt.

Herstellung des Lysepuffers:

Zusammensetzung		Endkonzentration
NaCl	1 ml 5 M NaCl	10 mM
Tris-HCl	10 ml 0,5 M Tris/HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	10 ml EDTA pH 8	10 mM
N-Laurylsarcosin	2,5 g Sarcosyl ad 500 ml	0,5%
Proteinase K		0,25 mg/ml

Proteinase K wird in entsprechender Menge Wasser gelöst (20 mg/ml), aliquotiert und bei -20°C gelagert. Immer frisch zugeben!

Vorgehensweise:

- Kultivierung der ES-Zellen ohne Mediumwechsel bis zur Konfluenz bzw. Gelbfärbung des Mediums
- ES-Medium über eine Ecke der 96-Loch-Platte abkippen
- 2x Waschen mit je 180 µl PBS, Reste mit Papiertüchern absaugen
- Platten mit Parafilm abdichten und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C lagern. Alternativ sofortige Lyse der Zellen durch Zugabe von je 50 µl Lysepuffer mit Proteinase K pro well
- Platten mit Parafilm verschließen und in Frischhaltefolie einwickeln
- Gut schließende Plastikbehältnisse mit feuchten Papiertüchern auslegen und die Platten darin bei 55°C über Nacht inkubieren
- Zugabe von je 100 µl einer Mischung aus 10 ml Ethanol 100% und 150 µl 5 M NaCl-Lösung
- Inkubation bei RT für mindestens 1 h, Ethanol vorsichtig abgießen
- 2x Waschen mit Ethanol 70%, vorsichtig abkippen
- Platten auf Papierhandtüchern trockensaugen, ca. 30 min trocknen lassen
- Platten mit Parafilm verschließen, Lagerung bei -20°C oder Durchführung eines Restriktionsverdau mit 40 µl Restriktionsenzymmik (50 U) pro well
- Inkubation bei 37°C im Brutschrank für 30 min, erneut mischen
- Platte mit Parafilm verschließen und in Frischhaltefolie einwickeln
- Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank
- Zugabe von 8-10 µl 6x Dye pro well
- Platte mit Parafilm verschließen und bis zum Gelauftrag bei -20°C lagern

3.2.2.2 Isolierung genomischer DNS aus Mausgewebe

Zur Bestimmung des Genotyps von Mäusen wurde aus der Schwanzspitze (ca. 25-50 mg) genomische DNS nach Vorschrift des High Pure PCR Template Preparation Kits (Roche) isoliert und anschließend direkt für die Genotypisierungs-PCR verwendet.

Vorgehensweise:

- Gewebeprobe in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 200 µl Lysepuffer (Kit) und 40 µl Proteinase K-Lösung (Kit), mischen
- Verdau über Nacht bei 55°C im Thermoschüttler
- Gewebe mit Hilfe einer Pipette mit aufgesetzter Spitze zerreiben und zerkleinern
- Zugabe von 200 µl Bindungspuffer (Kit) sowie von 100 µl Isopropanol, mischen
- Zentrifugation 13.000 rpm, RT, 5 min

- Überstand auf Säule (Kit) überführen; Zentrifugation 8.000 rpm, RT, 1 min; Durchfluss verwerfen
- Zugabe von 500 µl Waschpuffer (Kit)
- Zentrifugation 8.000 rpm, RT, 1 min; Durchfluss verwerfen
- Erneutes Waschen mit 500 µl Waschpuffer (Kit)
- Zentrifugation 8.000 rpm, RT, 1 min; Durchfluss verwerfen
- Zentrifugation 13000 rpm, 10 sec
- Säule auf ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß transferieren
- Zugabe von 200 µl Elutionspuffer (70°C, Kit)
- Zentrifugation 8.000 rpm, RT, 1 min
- Lagerung der eluierten DNS bei -20°C

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.2.3.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Konzentration lässt sich über folgende Formel berechnen:

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

c = Konzentration der Ausgangslösung

OD₂₆₀ = Optische Dichte bei 260 nm

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor : 50 für dsDNS

40 für RNS

33 für esDNS

20 für Oligonukleotide

Aus dem Verhältnis der OD₂₆₀/OD₂₈₀ kann zudem eine Aussage über die Reinheit der Lösung getroffen werden. Bei einem Wert zwischen 1,8 und 2,0 ist die Proteinkontamination der Lösung als gering anzusehen.

3.2.3.2 Konzentrationsbestimmung durch Agarose-Gelelektrophorese

Neben der photometrischen Bestimmung lässt sich die Konzentration von Nukleinsäurelösungen auch halbquantitativ über eine Agarose-Gelelektrophorese abschätzen. Dazu wird ein Aliquot der zu vermessenden Lösung gemeinsam mit einer Verdünnungsreihe von DNS bekannter Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen und die Konzentration der Probe nach elektrophoretischer Auftrennung durch Vergleich der Bandenintensitäten abgeschätzt. Alternativ kann auch ein kommerziell erhältlicher DNS-Größenmarker, der DNS-Fragmente in bekannter Konzentration enthält, als interner Standard verwendet werden.

Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 5 ng DNS pro Bande, und im Vergleich zur Photometrie werden nur relativ kleine DNS-Mengen zur Messung benötigt.

3.2.4 Reinigung von Nukleinsäuren

3.2.4.1 Alkoholfällung

DNS ist in organischen Lösungsmitteln nur schwer löslich. Diese Eigenschaft wird bei der Aufreinigung oder Aufkonzentrierung von DNS durch Fällung mit Ethanol oder Isopropanol genutzt. Der Effekt kann durch die Anwesenheit einwertiger Kationen zusätzlich erhöht werden, da die negativ geladenen Phosphatgruppen durch die Kationen neutralisiert werden und die nun ungeladene DNS schwerer löslich ist. Bei der alkoholischen Fällung wird der DNS Wasser entzogen und sie fällt aus, während störende Salze im Überstand gelöst bleiben. Anschließend wird die DNS durch Zentrifugation pelletiert, mit 70% Ethanol von Salz- und Alkoholresten gereinigt, das Pellet bei RT getrocknet und schließlich in Wasser aufgenommen.

Vorgehensweise:

- Zugabe von 0,1 Volumen 5 M NaCl zur DNS-Lösung
- Zugabe von 2,5 Volumen kaltem Ethanol_{absolut} (Endkonzentration ca. 70% V/V; -20°C) oder 0,7 Volumen kaltem Isopropanol (-20°C), mischen
- Inkubation bei -80°C für 30 min oder -20°C Ü/N
- Zentrifugation 13.000 rpm, 4°C, 30 min; Überstand abgießen
- Zugabe von 2,5 Volumen kaltem Ethanol 70% (-20°C)
- Zentrifugation 13.000 rpm, 4°C, 15 min; Überstand abnehmen
- Pellet bei RT trocknen und in geeignetem Volumen H₂O aufnehmen

3.2.4.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Eine zweite Methode zur Entfernung von Proteinen und weiteren Verunreinigungen aus Nukleinsäurelösungen stellt die Extraktion mit Phenol und Chloroform dar. Diese organischen Lösungsmittel sind nicht mit Wasser mischbar und fällen Proteine aus. Beim Ausschütteln sammeln sich die denaturierten Verunreinigungen in der organischen Phase an bzw. bilden an der Grenzschicht eine Interphase, während die DNS aus der wässrigen Phase durch eine Alkoholfällung präzipitiert werden kann.

Vorgehensweise:

- Zugabe von 1 Volumen Phenol zur wässrigen DNS-Lösung, mischen
- Zentrifugation 8.000 rpm, 1 min
- Obere wässrige Phase vorsichtig abnehmen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 1 Volumen Chloroform, mischen
- Zentrifugation 8.000 rpm, 1 min

- Obere wässrige Phase vorsichtig abnehmen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Durchführung einer Alkoholfällung wie in 3.2.4.1 beschrieben

3.2.4.3 Säulen-Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNS-Lösungen nach Restriktionsverdau oder Dephosphorylierung mit dem Ziel einer nachfolgenden Ligation erfolgte entweder durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.7.2), oder mit Hilfe von CHROMA SPIN™ Säulen von Clontech. Diese Methode beruht auf der Gelfiltrations-Chromatographie, bei der Verunreinigungen auf Grund ihrer Molekülgröße von der DNS abgetrennt werden können. Dabei werden Moleküle, die kleiner als die Porengröße der Säule sind, in den Poren zurückgehalten, während größere Moleküle die Säule passieren und somit auch eine Größenausschluss-Chromatographie ermöglicht wird. Beispielsweise werden durch die CHROMA SPIN™ 1000-Säule 50% der Fragmente, die kleiner als 1000bp sind, abgetrennt und stehen somit bei einer Ligation nicht mehr als konkurrierende Fragmente zur Verfügung.

Vorgehensweise:

- Resuspendieren der Gelmatrix durch mehrmaliges Invertieren der Säule
- Deckel und unteren Verschluss der Säule entfernen und die Säule auf ein 2 ml-Sammelgefäß aufsetzen
- Äquilibrations-Puffer der Säule durch Zentrifugation in einem 12 ml Falcontube bei 700x g, RT, 5 min, entfernen
- Durchfluss verwerfen und Säule auf ein neues 2 ml-Sammelgefäß aufsetzen
- DNS-Lösung falls erforderlich mit H₂O zu einem Gesamtvolumen von 70 µl ergänzen und auf die Mitte der Säule pipettieren
- Zentrifugation bei 700x g, RT, 5 min
- Der Durchfluss enthält die gereinigte DNS-Lösung; Lagerung bei -20°C

3.2.5 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

3.2.5.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Basensequenzen innerhalb der DNS-Doppelhelix erkennen und beide Stränge an definierter Stelle innerhalb oder unmittelbar neben dieser Erkennungssequenz schneiden können. Die in dieser Arbeit verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme spalten ihr DNS-Substrat innerhalb ihrer palindromischen Erkennungssequenz von 4 bis 8 Basenpaaren, was die Bildung von DNS-Fragmenten mit definierten Enden zur Folge hat. Wenn das Enzym dabei einen Basen-Überhang produziert, so spricht man von *sticky ends*, während die Enden ohne Überhang auch als glatte Enden oder *blunt ends* bezeichnet werden. Die endständigen Nukleotide besitzen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Reste, welche später die enzymvermittelte Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden ermöglichen.

Die Aktivität der Restriktionsenzyme wird in Units (U) angegeben. Dabei entspricht 1 U derjenigen Enzymmenge, die 1 µg einer bestimmten DNS unter optimalen Bedingungen innerhalb einer Stunde verdauen kann. In der Regel wurden für den Restriktionsverdau von Plasmiden 2-10 U pro µg DNS eingesetzt, genomische Stammzell-DNS wurde mit 50 U pro 40 µl-Ansatz verdaut.

Folgende Reaktionsbedingungen wurden für Standardansätze gewählt:

Standard-Restriktionsverdau	
DNS-Lösung	x µl
10x-Enzympuffer	5 µl
100x-BSA	0,5 µl
Enzym	2-10 U
H ₂ O	ad 50 µl

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen und sind unter 2.3.1 aufgeführt. Grundsätzlich wurde der von NEB empfohlene Puffer zusammen mit der mitgelieferten BSA-Lösung verwendet. Beim Einsatz von zwei verschiedenen Enzymen in einem Reaktionsansatz wurden ebenfalls die Empfehlungen von NEB befolgt. Der Ansatz wurde für 3-10 Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Reaktionstemperatur (meist 37°C) inkubiert, die Reaktion anschließend durch Zugabe des Gelladepuffers gestoppt und der Ansatz bis zum Gelauftrag bei -20°C gelagert. Alternativ wurde die DNS weiteren Bearbeitungsschritten wie Dephosphorylierung (3.2.5.2), Alkohol-fällung (3.2.4.1) oder Säulenaufreinigung (3.2.4.3) unterzogen. Genomische DNS wurde grundsätzlich über Nacht verdaut.

3.2.5.2 Dephosphorylierung

Zur Vermeidung ungewollter Ringschlüsse durch Religation linearisierter Vektor-DNS wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, *Calf Intestinal Phosphatase*) oder alternativ mit *Antarctic Phosphatase* entfernt. Die für eine erfolgreiche Ligation notwendigen Phosphat-Gruppen werden dann alleine durch das zu klonierende DNS-Fragment geliefert, wodurch die Klonierungseffizienz von Fremd-DNS verbessert und der Vektorhintergrund bei der Ligation vermindert werden kann.

Vorgehensweise CIP:

- Inaktivierung des Restriktionsverdau durch Inkubation für 20 min bei 65°C im Thermomixer
- Zugabe von 1 µl CIP zum Reaktionsansatz
- Inkubation für 1 h bei 37°C
- Inaktivierung der Reaktion durch Säulenaufreinigung oder Zugabe des Gelladepuffers

Vorgehensweise *Antarctic Phosphatase*:

- Den Restriktionsverdau-Ansatz mit der entsprechenden Menge 10x-*Antarctic Phosphatase Buffer* und 2 μ l *Antarctic Phosphatase* versetzen, sodass eine 1x-Puffer-Endkonzentration erreicht wird
- Inkubation für 1 h bei 37°C
- Inaktivierung der Reaktion durch Inkubation bei 65°C für 5 min mit anschließender Zugabe des Gelladepuffers oder durch Säulenaufreinigung

3.2.5.3 Ligation

Die Verknüpfung linearer DNS-Fragmente erfolgte durch die T4-DNS-Ligase. Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Bildung neuer Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen und kann sowohl glatte als auch überhängende Enden verknüpfen.

Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt:

Standard-Ligation	
Insert-DNS-Lösung	x μ l
Vektor-DNS-Lösung	x μ l
10x-Ligase-Puffer	2 μ l
T4-Ligase	1 μ l
H ₂ O	ad 20 μ l

Für Ligationsansätze wurden mindestens 25 ng linearisierter Vektor-DNS verwendet und das restliche Volumen des Reaktionsansatzes wurde je nach Konzentration mit Insert-DNS-Lösung aufgefüllt. Das molare Verhältnis Vektor:Insert sollte ca. 1:3 – 1:10 betragen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 1-3 h, zur Ligation großer DNS-Fragmente wurden auch Inkubationen bei 4°C über Nacht durchgeführt.

3.2.6 Klonierung und Transformation

Mit den beschriebenen Methoden des Restriktionsverdau, der Dephosphorylierung und der Ligation können rekombinante DNS-Vektoren generiert werden, die anschließend zur Vermehrung in Bakterien eingeführt werden. Dieser Vorgang des Einschleusens von fremder DNS in eine Wirtszelle wird als Transformation bezeichnet. Bei der Standard-Transformation werden die Plasmide durch Hitzeschock in chemisch kompetente Bakterienzellen eingebracht. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde das System der TOPO[®]-Klonierung verwendet: die hier eingesetzten Vektoren liegen schon in linearisierter Form vor und die Verknüpfung des PCR-Produkts mit dem Vektor erfolgt über das Enzym Topoisomerase.

3.2.6.1 Standard-Transformation

Zur Einschleusung von Vektor-DNS in Bakterien ist es zunächst erforderlich, die Bakterienzellen durchlässiger für Plasmide zu machen. Möglich wird dies durch die chemische Vorbehandlung der zu transformierenden Bakterien mit anschließendem Hitzeschock. Für sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungsschritte wurden

kommerziell erhältliche chemisch kompetente *E. coli* - Stämme (XL10 Gold) verwendet. Prinzipiell ist die Transformationseffizienz abhängig von der Kompetenz der Bakterien und von der Größe des zu transformierenden Plasmids. Beim Stamm XL10 Gold handelt es sich um ultrakompetente Zellen, die besonders für die Transformation großer Plasmide geeignet sind. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll richtet sich nach der Arbeitsvorschrift des Herstellers.

Vorgehensweise:

- Kompetente Zellen auf Eis auftauen
- 12 ml-Falcontube auf Eis vorkühlen und 1 µl β-Mercaptoethanol vorlegen
- Zugabe von 30 µl der kompetenten Zellen
- Inkubation für 10 min auf Eis, alle 2 min durch vorsichtiges Schwenken mischen
- Zugabe des Ligationsansatzes oder von 0,5 µl des zu transformierenden Plasmids
- Inkubation für 30 min auf Eis; NZY⁺-Medium auf 42°C vorwärmen
- Inkubation für genau 30 s bei 42°C im Wasserbad (Hitzeschock)
- Inkubation für 2 min auf Eis
- Zugabe von 900 µl auf 42°C vorgewärmtem NZY⁺-Medium
- Inkubation für 1 h bei 37°C und 225 rpm im Schüttler
- Zentrifugation 4000 rpm, RT, 5 min; Überstand abgießen
- Pellet im restlichen Medium resuspendieren
- Suspension auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte mittels Drigalski-Spatel ausplattieren
- Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank

3.2.6.2 Klonierung und Transformation von PCR-Produkten

Bei der Klonierung mit Hilfe von TOPO[®]-Vektoren handelt es sich um eine effiziente Einschnitt-Klonierungsstrategie für die direkte Einführung von PCR-Produkten in einen speziellen Plasmidvektor. Hierbei stehen zwei verschiedene Systeme zur Verfügung: das TOPO-TA-Cloning[®]-Kit für Taq-amplifizierte Produkte, sowie das Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit für PCR-Fragmente mit glatten Enden.

Die Taq-Polymerase besitzt eine Template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität, die ein einzelnes Deoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produkts anhängt. Der Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] liegt schon in linearisierter Form mit einem 3'-Deoxythymidin-Überhang vor, was die effiziente Ligation Taq-amplifizierter Produkte ermöglicht. Eine spezielle Ligase ist nicht zusätzlich erforderlich, da der Vektor über eine Topoisomerase aus dem *Vaccinia*-Virus aktiviert ist. Dieses Enzym erkennt und schneidet die Sequenz 5'-CCCTT und bindet kovalent an die endständige 3'-Phosphatgruppe des Thymidins. Somit wird die Selbstligation des Vektors verhindert. Bei Anwesenheit eines kompatiblen DNS-Fragments kann nun der

Deoxyadenosin-Rest mit der endständigen 3'-Phosphatgruppe des Thymidins unter Abspaltung der Topoisomerase verknüpft werden.

Der Plasmidvektor pCR®-Blunt II-TOPO® liegt ebenfalls linearisiert und über die Topoisomerase aktiviert vor, allerdings ohne 3'-Deoxythymidin-Überhang. Dies ermöglicht die Verknüpfung mit PCR-Produkten, die glatte Enden aufweisen, nach dem oben beschriebenen Prinzip. Die nachfolgende Transfektion wurde in beiden Fällen nach dem Protokoll der Standard-Transformation (3.2.6.1) durchgeführt.

Vorgehensweise:

TOPO®-Klonierung Standardansatz	
PCR-Produkt/Eluat Gelextraktion	1-4 µl
Salzlösung (Kit)	1 µl
pCR®2.1-TOPO®/pCR®-Blunt II-TOPO® (Kit)	1 µl
H ₂ O	ad 6 µl

- Ansatz vorsichtig mischen
- Inkubation bei RT für mindestens 5 min
- Lagerung auf Eis bis zur Transformation oder über Nacht bei -20°C
- Transformation nach Standard-Protokoll mit XL10 Gold

3.2.6.3 Generierung von Plasmidvektoren mit veränderten Schnittstellen

Zur Klonierung des *knockout*-Vektors nach der unter 4.1 beschriebenen Strategie wurden Plasmide mit einer genau festgelegten Reihenfolge der Restriktionsschnittstellen in der *multiple cloning site* (MCS) benötigt. Um diese zusätzlichen Schnittstellen in einen kommerziell erhältlichen Vektor einzuführen, wurde dieser mittels Restriktionsendonukleasen geöffnet und ein doppelsträngiges DNS-Adapter-Fragment mit der erforderlichen Sequenz inkloniert. Die DNS-Adapter-Stücke wurden bei Eurofins MWG GmbH als einzelsträngige Oligonukleotide paarweise bestellt und im Thermocycler durch Erhitzen und schrittweises Abkühlen zu Doppelsträngen zusammengelagert. Schließlich erfolgten die Ligation dieser DNS-Adapter-Stücke mit dem entsprechenden linearisierten Vektor und die Transformation in *E. coli*.

Vorgehensweise:

- Oligonukleotide in Wasser lösen (20 pmol/µl)
- Reaktionsansatz in einem 500 µl PCR-Reaktionsgefäß mischen

Substanz	Menge
Oligonukleotid 1	5 µl
Oligonukleotid 2	5 µl
Wasser	15 µl

- Zusammenlagerung der Oligonukleotide in der PCR-Maschine

Temperatur	Zeit
90°C	1 min
80°C	1 min
60°C	1 min
50°C	1 min
30°C	1 min

- Verdau des Ausgangsplasmids mit zwei Restriktionsendonukleasen (3.2.5.1) und Gelextraktion des entsprechenden Vektor-Fragments (3.2.7.2)
- Ligation des doppelsträngigen Adapters mit dem aufgereinigten Vektor-Fragment (3.2.5.3)
- Transformation in *E. coli* (3.2.6.1)

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNS-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt und somit identifiziert werden (Vogelstein & Gillespie 1979). Die DNS-Moleküle wandern auf Grund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode und werden abhängig von ihrer Größe durch die wie ein Sieb wirkende Agarosematrix aufgetrennt. Kleine Fragmente durchlaufen die Agarose dabei schneller als große, wobei die Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge ist. Diese Beziehung gilt allerdings nur für Fragmente bis zu einer Größe von ca. 20 kb, da größere DNS-Stücke sich stark verformen müssen, um die Agarosematrix zu durchwandern. Dabei richten sich die Fragmente in Längsrichtung des elektrischen Feldes aus und sie wandern alle auf der gleichen Höhe, was eine Auftrennung unmöglich macht. Weiterhin ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Konzentration des Agarosegels. In der vorliegenden Arbeit wurden Agarosegele der Konzentration 0,5 - 2% verwendet, wobei zur Auftrennung großer Fragmente Gele mit niedriger Konzentration zum Einsatz kamen, während höher konzentrierte Gele zur Separation kleiner Fragmente dienten. Um den Verlauf der Elektrophorese optisch verfolgen zu können, wurden dem Gelladepuffer zwei Farbstoffe zugesetzt: Bromphenolblau wandert abhängig von der Agarosekonzentration mit DNS-Fragmenten von ca. 50-1000 bp und markiert daher die Elektrophorese-Front, während Xylencyanol mit DNS-Fragmenten der Größe 0,5 - 10 kb wandert.

Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid wurden die aufgetrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht bei Anregungswellenlängen von 302 – 366 nm sichtbar gemacht. Unter UV-Licht erscheinen die DNA-Fragmente dann als rötliche diskrete Banden, während der übrige Bereich dunkel bleibt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Biometra BioDocAnalyse Geldokumentationssystems. Ein Größenmarker, der DNS-Bruchstücke definierter Länge enthält, wurde parallel zu den Proben in eine Gelspur aufgetragen und diente zur Bestimmung der Fragmentgrößen sowie zur halbquantitativen Konzentrationsbestimmung. Als Standard-Größenmarker wurde 2-log DNA Ladder (New England Biolabs) mit einem Größenbereich von 0,1 – 10 kb verwendet.

Verwendete Lösungen:

Lösung	Zusammensetzung	
10x TBE	Tris-HCl	108 g
	Borsäure	55 g
	0,5 M EDTA-Lösung pH 8	40 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
6x Gelladepuffer	Ficoll	9 g
	0,5 M EDTA-Lösung pH 8	12 ml
	10x TBE	30 ml
	Bromphenolblau (55 mg/ml H ₂ O)	1,35 ml
	Xylencyanol (50 mg/ml H ₂ O)	1,5 ml
	H ₂ O	ad 50 ml
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	1% (w/v)
0,5 M EDTA-Lösung pH 8	Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O	186,1 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
	<i>pH-Einstellung auf 8,0; autoklavieren</i>	

3.2.7.1 Standard-Agarosegel

Vorgehensweise:

- 0,5 – 2% (w/v) Agarose in 1x-TBE in der Mikrowelle aufkochen
- unter Rühren abkühlen lassen auf ca. 50°C
- Zugabe der Ethidiumbromidlösung (finale Konzentration 1 µg/ml)
- Gel in den mit Klebeband abgeklebten und mit Kämmen versehenen Gelschlitten ausgießen, abkühlen lassen
- Gelschlitten mit Gel in die mit 1x-TBE gefüllte Elektrophoresekammer einsetzen
- DNS-Proben 5:1 mit 6x-Gelladepuffer versetzen, mischen und in gewünschter Menge in die Taschen pipettieren
- Elektrophorese bei 50 – 130 V für 20 min bis 16 h, abhängig von der erwünschten Trenneffizienz und der Fragmentgröße
- Beendigung der Elektrophorese, wenn die erforderliche Trennung erreicht ist
- Beurteilung und Dokumentation unter UV-Licht (312 nm)

3.2.7.2 Präparatives Agarosegel

Um ein DNS-Fragment bestimmter Größe aus einem Gemisch zu isolieren wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt, die entsprechende Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel isoliert und nach Vorschrift des MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) oder des Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) aufgearbeitet. Zunächst wird die DNS zusammen mit dem Gel gelöst und an eine Säulen-Matrix gebunden. Durch verschiedene Waschschriffe wird die DNS von störendem

Begleitmaterial wie Agarose, Enzymen, Salzen usw. befreit und schließlich mit Hilfe eines Elutionspuffers oder Wasser von der Säule eluiert.

Vorgehensweise MinElute Gel Extraction Kit:

- Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausschneiden und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 300 µl Puffer QG (Kit) pro 100 mg Gel
- Gel bei 50°C im Thermomixer lösen (ca. 10 min), zwischendurch mischen
- Zugabe von 1 Gelvolumen Isopropanol, mischen
- 700 µl der Mischung auf die Säule pipettieren, Zentrifugation 13000 rpm, 1 min, RT; Durchfluss verwerfen
- So lange wiederholen, bis die gesamte Probe auf die Säule pipettiert wurde
- Zugabe von 500 µl Puffer QG auf die Säule
- Zentrifugation 13000 rpm, 1 min, RT; Durchfluss verwerfen
- Zugabe von 750 µl Puffer PE (Kit)
- Inkubation bei RT für 5 min
- Zentrifugation 13000 rpm, 1 min, RT; Durchfluss verwerfen
- Erneute Zentrifugation 13000 rpm, 1 min, RT
- Säule auf ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 10 - 30 µl Elutionspuffer oder Wasser
- Inkubation bei RT für 1 min
- Zentrifugation 13000 rpm, 1 min, RT
- Lagerung der DNS bei – 20°C

Vorgehensweise Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit:

- Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausschneiden und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 10 µl capture buffer (Kit) pro 10 mg Gel
- Gel bei 60°C im Thermomixer lösen (ca. 10 min), zwischendurch mischen
- 600 µl der Mischung auf die Säule pipettieren, Inkubation bei RT für 1 min
- Zentrifugation 13000 rpm, 30 s, RT; Durchfluss verwerfen
- So lange wiederholen, bis die gesamte Probe auf die Säule pipettiert wurde
- Zugabe von 500 µl Waschpuffer (Kit)
- Zentrifugation 13000 rpm, 30 s, RT; Durchfluss verwerfen
- Säule auf ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen

- Zugabe von 10 - 50 µl Elutionspuffer oder Wasser
- Inkubation bei RT für 1 min
- Zentrifugation 13000 rpm, 1 min, RT
- Lagerung der DNS bei – 20°C

3.2.8 Amplifizierung von DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis & Faloona 1987; Saiki et al. 1988) ist ein *in vitro*-Verfahren zur Amplifizierung definierter Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Es handelt sich um einen zyklisch ablaufenden Prozess, der auf der Kettenverlängerung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer durch eine hitzestabile DNS-Polymerase beruht. Als Vorlage dient meist doppelsträngige DNS, die in einem ersten Schritt hitzedenaturiert wird. Die hierbei entstehenden einzelsträngigen DNS-Moleküle werden von der Polymerase als Matrize für die Synthese eines Komplementärstrangs verwendet. Der Ansatz wird nun soweit abgekühlt, dass die Oligonukleotid-Primer, welche den zu amplifizierenden Bereich begrenzen, an ihre komplementären Sequenzen binden können (Annealing). In einem weiteren Schritt wird auf die optimale Arbeitstemperatur der verwendeten Polymerase erhitzt, die schließlich die gebundenen Primer verlängern und die Komplementärstränge synthetisieren kann (Elongation). Durch zyklische Wiederholung dieser Abfolge kann der synthetisierte DNS-Strang exponentiell vervielfältigt werden. Im Folgenden sollen die wesentlichen Komponenten der PCR näher erläutert werden.

Matrizen-DNS:

Die Matrizen-DNS (Template) dient als Vorlage für die Amplifikation. In der vorliegenden Arbeit wurden Plasmid-DNS, genomische DNS und auch Bakterienkulturen als Template verwendet. Wichtig für eine erfolgreiche Amplifikation ist dabei die richtige Matrizen-Menge. Zu wenig DNS am Beginn führt zu unbefriedigenden Ausbeuten, während zu große DNS-Mengen ein Fehl-annealing der Primer begünstigen und somit das Risiko fehlerhafter Amplifikationen ansteigt. Gute Ergebnisse konnten mit Template-Mengen von ca. 10000 – 100000 Molekülen entsprechend ca. 0,1 – 1 pg DNS erreicht werden.

Primer:

Als Primer wurden Oligonukleotide der Länge von 18 – 71 Basen verwendet. Der Vorwärtsprimer begrenzt in 5'-Richtung, der Rückwärts-Primer in 3'-Richtung die zu amplifizierende Sequenz. Bei der Auswahl wurden weiterhin die Schmelztemperaturen (Sollwerte ca. 50°C – 65°C) sowie der Guanosin-Cytosin-Anteil (Sollwert ca. 60%) der Oligonukleotide berücksichtigt. Mit Hilfe einer speziellen Software wurden die Primer auf die Möglichkeit des Selbstannealings und der Ausbildung von Haarnadelstrukturen hin überprüft. Die optimalen Annealing-Temperaturen wurden mittels Gradienten-PCR (3.2.8.2) in Vorversuchen ermittelt.

Polymerasen:

Für die PCR wurden je nach Fragestellung verschiedene hitzestabile DNS-Polymerasen verwendet. Bei Standard-PCR-Reaktionen kam die Taq-Polymerase (isoliert aus *Thermus*

aquaticus; (Saiki et al. 1988)), ein Enzym mit sehr hoher Syntheserate, zum Einsatz. Sie zeichnet sich durch die Eigenschaft aus, am Ende des Amplikons ein weiteres Adenosin anzuhängen, besitzt aber keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Die Folge ist eine recht hohe Fehlerrate von ca. einem falschen Baseneinbau pro 1000 Nukleotide. Die Pfx-Polymerase hingegen verfügt über diese auch *proofreading* genannte 3'-5'-Exonukleaseaktivität, welche eine Korrektur falsch eingebauter Nukleotide ermöglicht. Für die Generierung der Sonden bzw. des PCR-Fragments der Klonierungsstrategie war diese Sequenz-Genauigkeit des Amplikons von hoher Bedeutung. Zur Generierung großer DNS-Fragmente (PCR-Screening homolog rekombinierter ES-Zellen) wurde der Long PCR Enzyme Mix von Fermentas verwendet. Es handelt sich um eine Mischung aus einer Taq-Polymerase und einer weiteren thermostabilen Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität, welche die zuverlässige Amplifizierung auch großer Fragmente ermöglichen.

dNTPs:

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

10x-PCR-Puffer:

Die Aktivität von Polymerasen hängt von der Salz- und insbesondere von der Mg^{2+} -Konzentration sowie vom pH-Wert des Reaktionsansatzes ab. Um optimale Bedingungen zu erreichen wurden grundsätzlich die vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer in der empfohlenen Menge verwendet.

3.2.8.1 Standard-PCR

Für die Standard-PCR wurde je nach Verwendungszweck die Taq-Polymerase (PCR-Screening-Methoden) oder die Pfx-Polymerase (Sonden, Targeting-Konstrukt) verwendet.

Ansatz einer Standard-PCR		
Substanz	Menge	Endkonzentration
10x-PCR-Puffer	5 μ l	1x
dNTPs (je 10 mM)	1 μ l	0,2 mM
Vorwärts-Primer (20 pmol/ μ l)	1 μ l	0,4 pmol
Rückwärts-Primer (20 pmol/ μ l)	1 μ l	0,4 pmol
Polymerase	0,2 μ l	1 U
Template	2 μ l	10000 – 100000 Moleküle
Wasser	ad 50 μ l	

Alle Reaktionen wurden in 500 μ l PCR-Gefäßen (Eppendorf) durchgeführt.

Zur Amplifizierung wurde das unten aufgeführte Programm verwendet und die Annealingtemperatur den jeweils verwendeten Primern angepasst bzw. durch eine Gradienten-PCR (3.2.8.2) experimentell ermittelt. Der Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wurde je nach erforderlicher Produktmenge ca. 30 – 40 Mal wiederholt.

Protokoll einer Standard-Amplifizierung		
Temperatur	Zeit	Zyklus
94°C	3 min	Initiale Denaturierung
94°C	1 min	Denaturierung
50 – 65°C	30 sec	Annealing
72°C (Taq) bzw. 68°C (Pfx)	1 min pro 1000 bp (Taq) 2 min pro 1000 bp (Pfx)	Elongation
72°C (Taq) bzw. 68°C (Pfx)	3 min	Finale Elongation
4°C	unbegrenzt	Kühlung

30 – 40 Zyklen

3.2.8.2 Gradienten-PCR

Der Eppendorf Mastercycler Gradient ist eine spezielle PCR-Maschine, die das Anlegen verschiedener Temperaturen in jeder Reihe des Heizblocks des Geräts erlaubt. Dies ermöglicht das Testen verschiedener Annealingtemperaturen in nur einem Schritt, um beispielsweise bei einer PCR mit neuen Primerpaaren die optimalen Reaktionsbedingungen experimentell ermitteln zu können. Für eine Testung wurden bis zu 10 Reaktionsansätze parallel vorbereitet und so in den Heizblock eingesetzt, dass Annealing-Temperaturen von $\pm 10^\circ\text{C}$ um die berechnete Annealingtemperatur erreicht wurden. Diejenige Temperatur, bei der das beste Ergebnis bezüglich Menge und Spezifität zu verzeichnen war, wurde dann für weitere Experimente verwendet.

3.2.8.3 Long Distance-PCR

Bei einer Standard-PCR mit Verwendung der Taq-Polymerase können PCR-Produkte nur bis zu einer begrenzten Länge (ca. 5-7 kb) zuverlässig synthetisiert werden. Ein gravierendes Problem stellt hierbei die hohe Fehlerrate der Taq-Polymerase dar. Im Long PCR Enzyme Mix (Fermentas) wird hingegen die positive Eigenschaft der Taq-Polymerase (hohe Syntheserate) mit derjenigen einer *proofreading*-Polymerase (3'-5'-Exonukleaseaktivität) vereint, was die Synthese auch langer DNS-Fragmente von bis zu 40 kb möglich macht. Das Screening homolog rekombinierter ES-Zellen des Kcnv2-Konstrukts erfolgte abhängig von der erwarteten Fragmentlänge mit zwei verschiedenen Protokollen:

Ansätze Long Distance-PCR	3736 bp-Fragment	6533 bp-Fragment
10x-Puffer	2 μl	2 μl
MgCl ₂ (25 mM)	2 μl	2 μl
DMSO	-	0,6 μl
dNTPs (je 5mM)	0,8 μl	0,8 μl
Vorwärts-Primer (10 pmol/ μl)	0,33 μl	0,33 μl
Rückwärts-Primer (10 pmol/ μl)	0,33 μl	0,33 μl
Long PCR Enzyme Mix	0,2 μl	0,3 μl
Matrizen-DNS (in H ₂ O)	2 μl	2 μl
Wasser	ad 20 μl	ad 20 μl

Die ES-Zellen wurden zunächst wie in 3.2.2.1 beschrieben lysiert und die DNS gefällt, in 40 μl Wasser gelöst und 2 μl dieser Lösung als Template verwendet.

Alle Reaktionsbedingungen und Zeiten richten sich nach den Empfehlungen des Herstellers und wurden in Vorversuchen etabliert.

Protokoll der Long Distance-PCR 3736 bp-Fragment		
Temperatur	Zeit	Zyklus
98°C	3 min	Initiale Denaturierung
94°C	10 sec	Denaturierung
62°C	10 sec	Annealing
68°C	4 min	Elongation
68°C	10 min	Finale Elongation
8°C	unbegrenzt	Kühlung

30 Zyklen

Protokoll der Long Distance-PCR 6533 bp-Fragment		
Temperatur	Zeit	Zyklus
94°C	4 min	Initiale Denaturierung
95°C	15 sec	Denaturierung
59°C	30 sec	Annealing
68°C	8 min	Elongation
68°C	10 min	Finale Elongation
8°C	unbegrenzt	Kühlung

40 Zyklen

3.2.9 Sequenzierung von DNS

Die in der vorliegenden Arbeit zur Sequenzierung von DNS verwendete Methode beruht auf dem Prinzip des Kettenabbruchs nach Sanger (Sanger et al. 1977). Hierbei wird die zu sequenzierende DNS als Matrize für die Synthese eines neuen DNS-Strangs in einer Art PCR-Reaktion mit einem Sequenzierprimer verwendet. Die Polymerase amplifiziert ausgehend vom Primer in 5'-3'-Richtung neue DNS-Stränge. Zusätzlich zu den dNTPs werden dem Reaktionsansatz allerdings auch 2',3'-Dideoxynukleotide (ddNTPs) zugesetzt, welche nach Einbau in die DNS einen Kettenabbruch bewirken. Auf Grund des Einbaus der ddNTPs nach statistischen Regeln entstehen hierbei DNS-Fragmente unterschiedlicher Länge, die mit dem entsprechenden ddNTP enden. Durch Kopplung der vier ddNTPs an vier unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe wird eine Markierung vorgenommen, sodass die gesamte Reaktion in einem Ansatz durchgeführt werden kann. Die entstehenden Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese (Jorgenson & Lukacs 1983) aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNS-Fragmentes können dann von einem Detektor erkannt und die Sequenz aus dem Chromatogramm abgelesen werden.

Die DNS-Sequenzierungen wurden von Monika Papke und Britta Baumann im Molekulargenetischen Labor der Universitäts-Augenklinik Tübingen durchgeführt.

3.2.10 Southern Blot

3.2.10.1 Verwendete Lösungen

Lösung	Substanz	Menge	Konzentration
Depurinierungslösung	konz. HCl	20 ml	0,2 M
	H ₂ O	ad 1000 ml	
Denaturierungslösung	NaOH	20 g	0,5 M
	NaCl	87,6 g	1,5 M
	H ₂ O	ad 1000 ml	
Neutralisierungslösung	NaCl	175,3 g	3,0 M
	Tris	60,58 g	0,5 M
	H ₂ O	ad 1000 ml	
	<i>pH-Einstellung auf 7,4</i>		
20x SSC	NaCl	175,3 g	3,0 M
	Trinatriumcitrat	88,2 g	0,3 M
	H ₂ O	ad 1000 ml	
Hybridisierungspuffer	BSA	5 g	1% (w/v)
	1 M Na ₂ HPO ₄ -Lösung	193,5 ml	0,5 M
	1 M NaH ₂ PO ₄ -Lösung	56,5 ml	0,5 M
	SDS 20%	175 ml	7% (w/v)
	0,5 M EDTA-Lösung pH 8	1 ml	1 mM
	H ₂ O	ad 500 ml	
Na₂HPO₄-Lösung	Na ₂ HPO ₄	178 g	1 M
	H ₂ O	ad 1000 ml	
NaH₂PO₄-Lösung	NaH ₂ PO ₄	138 g	1 M
	H ₂ O	ad 1000 ml	
TE pH 8	Tris-HCl pH 8	10 ml	10 mM
	0,5 M EDTA-Lösung pH 8	2 ml	1 mM
	H ₂ O	ad 1000 ml	
Tris-HCl pH 8	Tris	121 g	1 M
	H ₂ O	ad 1000 ml	
<i>pH-Einstellung auf 8,0</i>			
SDS-Lösung	SDS	200 g	20% (w/v)
	H ₂ O	ad 1000 ml	

3.2.10.2 Restriktionsverdau

Die genomische ES-Zell-DNS wurde grundsätzlich mit 50 U Restriktionsenzym direkt in der Vertiefung der 96-Loch-Platte verdaut. Für mehrere Vertiefungen wurde ein Ansatz für $x + 10\%$ Vertiefungen berechnet, in einem Reagenzien-Trog hergestellt und mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert. Die Platten wurden mit Parafilm und Frischhaltefolie verschlossen und für ca. 30 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Mischen erfolgte die Inkubation im ES-Zell-Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden am nächsten Morgen 8-10 µl 6x-Gelladepuffer zugegeben und der Ansatz entweder direkt auf ein Gel aufgetragen oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Ansatz	Menge pro well
DNS	x µg
10x-Enzypuffer	4 µl
100x-BSA	0,4 µl
Enzym	50 U
H ₂ O	ad 40 µl

3.2.10.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNS mittels Southern Blot wurden Agarosegele einer Konzentration von 0,7% verwendet. In eine Tasche wurde jeweils ein Ansatz von ca. 48 µl pipettiert, sodass pro Gel bis zu 50 Ansätze in zwei Reihen analysiert werden konnten. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Spannung von 100 V, welche nach einer Einlaufzeit von ca. 30 min auf 130 V erhöht wurde. Nach einer Laufstrecke von ca. 10–12 cm, abhängig von den zu detektierenden Fragmentgrößen, wurde der Lauf beendet und das Gel unter UV-Licht betrachtet. Bei der Foto-Dokumentation wurde zusätzlich ein Lineal als Größenstandard verwendet, da der DNS-Größenmarker unter UV-Licht wieder vom Gel abgetrennt wurde, um eine spätere unspezifische Bindung der Sonde an den Größenmarker zu vermeiden. Die Gele wurden zudem durch Abschneiden verschiedener Ecken individuell gekennzeichnet, um spätere Verwechslungen auszuschließen.

3.2.10.4 Vorbehandlung der Gele und Kapillarblot

Bevor die DNS aus dem Gel auf eine Membran übertragen werden konnte, mussten einige Modifizierungen an der DNS vorgenommen werden. Die Gele wurden in einer Fotowanne auf einem Kreisschüttler bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Wanne so weit mit Puffer befüllt wurde, dass die Gele frei darin schwimmen konnten und ständig von der Flüssigkeit benetzt waren.

Vorgehensweise:

- Inkubation unter Schütteln in Depurinierungslösung (0,2 N HCl)
- Puffer mit Wasserstrahlpumpe absaugen und 2x mit H₂O waschen
- Inkubation unter Schütteln in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl)
- Puffer mit Wasserstrahlpumpe absaugen und 2x mit H₂O waschen

- Inkubation unter Schütteln in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris, 3 M NaCl, pH 7,4)
- Puffer mit Wasserstrahlpumpe absaugen und 2x mit H₂O waschen

Aufbau des Kapillarblots:

Eine Fotowanne geeigneter Größe wurde mit 10x-SSC befüllt, ein Schwamm in diese Wanne eingelegt und dieser komplett mit 10x-SSC getränkt bis alle Luftblasen verschwunden waren. Auf diesen vollgesogenen Schwamm wurden drei ebenfalls in 10x-SSC getränkte Filterpapiere luftblasenfrei aufgelegt. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf diese Filterpapiere gelegt und auch hier die Luftblasen mittels einer sterilen Pipette ausgestrichen. Um ein Vorbeisaugen des Puffers seitlich des Gels zu vermeiden, wurden die restlichen freien Flächen des Filterpapiers komplett mit Parafilm abgedeckt. Nun folgte die auf die Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran (Hybond N, GE Healthcare), die ebenfalls mit 10x-SSC getränkt und so lange im Puffer belassen wurde, bis die Luftbläschen ausgetreten waren. Die Membran wurde passgenau luftblasenfrei auf das Gel transferiert und darüber drei weitere in 10x-SSC getränkte Filterpapiere luftblasenfrei aufgelegt. Zuletzt folgten ein Stapel saugfähiger Papiertücher und ein Gewicht von ca. 1 kg.

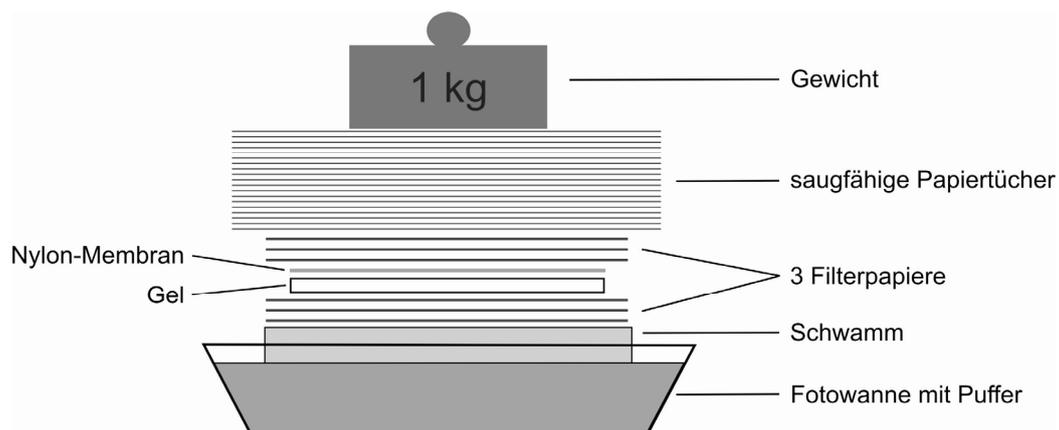


Abbildung 3.1: Aufbau eines Southern Blot

Der Transfer erfolgte für ca. 12–16 Stunden. Durch Kapillarkräfte wird der Hochsalzpuffer aus der Wanne in die Papiertücher gesaugt, wobei die DNS aus dem Gel mitgeschleppt und schließlich auf die Nylonmembran übertragen wird. Nach Beendigung des Transfers wurden die Geltaschen auf der Oberseite der Membran gekennzeichnet und die DNS-Seite beschriftet. Die Membran wurde mit UV-Licht einer Energie von 120 mJ bestrahlt, um die DNS kovalent zu binden. Durch Backen bei 80°C im Trockenschrank für 2 h wurde eine zusätzliche Fixierung erreicht.

3.2.10.5 Herstellung der Sonden

Die radioaktive Markierung der DNS-Sonden erfolgte nach der Methode des *random priming* (Feinberg & Vogelstein 1983; Feinberg & Vogelstein 1984). Dabei wird ein Gemisch aus Oligodesoxyribonukleotiden (hier Octanukleotide) als Primer benutzt, die zufällig an die Einzelstrang-DNS der Sonde binden können. Das Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I

aus *E. coli* synthetisiert dann den komplementären Strang in Gegenwart eines Gemischs aus dGTP und dTTP sowie den radioaktiv markierten Nukleotiden [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP und [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP. So können radioaktiv markierte DNS-Fragmente einer Größe von 100 bp bis zu mehreren 1000 bp generiert werden. Die Reaktionen wurden mit dem NEBlot Kit (New England Biolabs) durchgeführt.

Vorgehensweise:

- 25 – 100 ng Sonden-DNS mit H₂O auf 33 μl auffüllen
- Inkubation für 5 min bei 95°C im Heizblock (Denaturierung)
- Inkubation für 2 min auf Eis
- Herstellung des Reaktionsansatzes:

Substanz	Menge
Sonden-DNS	33 μl
10x-Markierungs-Puffer (inkl. Primer)	5 μl
dNTP-Mix (je 2 μl dTTP, dGTP)	4 μl
$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (6000 Ci/mmol)	3,5 μl
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (6000 Ci/mmol)	3,5 μl
Klenow	1 μl

- Inkubation für 60 min bei 37°C

Nach der Markierung der Sonde wurden nicht gebundene radioaktive Nukleotide durch Gelchromatographie über Sephadex-G50-Säulen (NICKTM-Columns, GE Healthcare) wieder vom Reaktionsansatz abgetrennt.

Vorgehensweise:

- Aufbewahrungspuffer der Säule verwerfen, waschen mit TE pH 8,0
- Säule mit TE pH 8,0 befüllen, durchtropfen lassen
- 50 μl Labeling-Ansatz mit 30 μl TE pH 8,0 versetzen; auf die Säule pipettieren
- Elutionsschritt 1: 320 μl TE pH 8,0
- Elutionsschritt 2: 500 μl TE pH 8,0; Fraktion beinhaltet die markierte Sonden-DNS
- Elutionsschritt 3: 800 μl TE pH 8,0; Fraktion beinhaltet die ungebundenen Radionukleotide
- Cherenkov-Messung mit je 1 μl jeder Fraktion am Szintillationsmessgerät; Fraktion 2 beinhaltet die Sonde und sollte für eine erfolgreiche Hybridisierung mindestens eine Aktivität von 30.000 cpm aufweisen

3.2.10.6 Hybridisierung und Waschen

Zunächst erfolgte die Prähybridisierung der Nylonmembran mit einzelsträngiger Lachsspermien-DNS, um eine unspezifische Bindung der radioaktiv markierten Sonde an die Membran zu verhindern.

Vorgehensweise Prähybridisierung:

- Membran in Hybridisierungsröhre einlegen
- Zugabe von 8 ml (kleine Röhren) bzw. 15 ml (große Röhren) vorgewärmtem Hybridisierungspuffer (60°C); Luftblasen zwischen Membran und Glas sorgfältig austreichen
- Inkubation der Lachsspermien-DNS für 5 min bei 95°C im Heizblock
- Inkubation für 2 min auf Eis
- Zugabe von 100 µl der Lachsspermien-DNS zum Hybridisierungspuffer in der Röhre
- Inkubation für 1 h bei 60°C im Drehofen

Zur Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde wurde der Prähybridisierungspuffer entfernt und durch frischen Hybridisierungspuffer mit Sonde ersetzt.

Vorgehensweise Hybridisierung:

- Inkubation von 500 µl der radioaktiv markierten Sonde (Fraktion 2) für 5 min bei 95°C
- Inkubation auf Eis für 2 min
- Prähybridisierungspuffer durch frischen vorgewärmten Hybridisierungspuffer (60°C) ersetzen
- Zugabe von 500 µl der radioaktiv markierten Sonde
- Inkubation über Nacht bei 60°C im Drehofen

Nach erfolgter Hybridisierung wurde unspezifisch an der Membran anhaftende Sonde durch mehrfaches Waschen entfernt. Hierzu wurden Puffer abnehmender Salzkonzentration verwendet, sodass die Bindung der Sonde an die DNS schrittweise vermindert wurde.

Waschpuffer	Lösung	Menge
2x SSC; 0,1% SDS	20x SSC	100 ml
	20% SDS	5 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
0,4x SSC; 0,1% SDS	20x SSC	20 ml
	20% SDS	5 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml

Vorgehensweise Waschen:

- Hybridisierungspuffer verwerfen
- Röhre bis zur Hälfte mit 2x SSC, 0,1% SDS füllen; 2x 10 min Waschen bei 60°C im Drehofen
- Waschpuffer nach jedem Waschschrift verwerfen
- Röhre bis zur Hälfte mit 0,4x SSC, 0,1% SDS füllen; 2x 10 min Waschen bei 60°C im Drehofen

- Waschen in der Wanne mit 0,4x SSC, 0,1% SDS bei 60°C im Wasserbad für 10 min
- Membran trocknen lassen, in Saran-Folie einwickeln
- Membran mit der DNS-Seite nach oben auf eine Phosphorimagerplatte für 1-8 Tage auflegen

3.2.10.7 Detektion

Die Auswertung der Southern Blot-Analysen erfolgte über Phosphorimagerplatten. Die Imager-Platte ist ein mit BaFBr:Eu²⁺-Kristallen beschichteter Schirm, in dessen Kristallen Elektronen durch ionisierende Energie wie UV-Licht, γ - oder β -Strahlen in einen angeregten Zustand überführt werden können (Johnston et al. 1990). Dabei wird Eu²⁺ zu Eu³⁺ oxidiert, und es entsteht ein angeregter BaFBr-Komplex. Dieser ist im angeregten Zustand stabil und speichert so die Information. Durch Anregung mittels Helium-Neon-Laser (Scanner BAS-1500, Fuji) fallen die Elektronen wieder auf das ursprüngliche Energieniveau zurück, Eu³⁺ wird also wieder zu Eu²⁺ reduziert und ein Photon wird dabei freigesetzt. Dieses ausgesendete Licht kann dann detektiert und das entsprechende Bild dazu am Bildschirm sichtbar gemacht werden. Die Auswertung erfolgte durch Ausmessen der entsprechenden Signale auf dem Blot und Bestimmung der Fragmentgröße durch Vergleich mit dem Größenstandard des zugehörigen Agarosegels.

3.3 Methoden der Stammzellkultur

3.3.1 Erzeugung gentechnisch veränderter Stammzellen durch *gene-targeting*

Voraussetzung für die Inaktivierung eines Gens mittels *gene-targeting*, also die gezielte Manipulation von ES-Zellen durch homologe Rekombination, ist die Generierung eines geeigneten DNS-*knockout*-Konstrukts mittels molekularbiologischer Methoden. Dieses Konstrukt wird durch Elektroporation in einem 1. Targeting in embryonale Stammzellen von Mäusen eingebracht (Transfektion) und durch homologe Rekombination findet die Integration an der gewünschten Stelle ins Genom statt. Homolog rekombinierte Stammzellen können mittels Southern Blot-Analyse oder PCR-Screening identifiziert werden, und in einem 2. Targeting findet schließlich die Deletion von Genabschnitten durch Elektroporation mit einem für die Cre-Rekombinase kodierenden Expressionsvektor statt. *Knockout*-Konstrukte wie das Pde6h-Konstrukt, bei denen funktional wichtige Genabschnitte von zwei loxP-Erkennungssequenzen flankiert werden, bieten hierbei die Möglichkeit, in nur einem Schritt sowohl Stammzellen mit generellem als auch mit konditionalem *knockout* zu generieren (siehe 1.4.2.3). Der schematische Ablauf eines Targetings ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

3.3.2 Generelles zur Kultivierung embryonaler Stammzellen

Um die Pluripotenz der Stammzellen *in vitro* aufrecht zu erhalten, sind eine äußerst vorsichtige Handhabung und das genaue Einhalten der vorgeschriebenen Kulturbedingungen erforderlich. Die Kultur der ES-Zellen erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

(DMEM) unter Zusatz von 20% Fötalem Kälberserum (FCS), 1000 U/ml Leukämie inhibierendem Faktor (LIF, *Leukemia Inhibitory Factor*) und 7 µl/ml β-Mercaptoethanol im Inkubator bei 37°C und unter 5% CO₂-Begasung zur Einstellung des optimalen pH-Werts über den im Medium vorhandenen Hydrogencarbonatpuffer. Die Qualität des FCS ist von außerordentlicher Bedeutung für die Kultivierung embryonaler Stammzellen, da es neben vielen anderen Substanzen nicht nur Wachstumsfaktoren enthält, sondern auch die Keimbahngängigkeit beeinflussen kann. LIF hingegen ist ein Zytokin, welches *in vivo* unter anderem bei der Hämatopoese, der T-Zell-Reifung und der Genexpression (Patterson 1994) eine Rolle spielt, welches aber auch während der Embryonalentwicklung und in Zellkulturen die Ausdifferenzierung pluripotenter Stammzellen in andere Zelltypen verhindert (Smith et al. 1988; Williams et al. 1988). β-Mercaptoethanol dient als Antioxidans und verhindert so die Inaktivierung von LIF. Embryonale Stammzellen wurden grundsätzlich auf einem Rasen aus sogenannten „Feederzellen“ kultiviert. Es handelt sich hierbei um embryonale Fibroblasten, welche durch Bestrahlung teilungsunfähig gemacht und als Monolayer in jedes Zellkulturgefäß als Grundlage für die Stammzellen ausgesät wurden. Diese Feederzellen geben neben verschiedenen Wachstumsfaktoren und Nährstoffen auch LIF ins Medium ab und verhindern so zusätzlich die Differenzierung der Stammzellen.

3.3.2.1 Medien und Lösungen

Sämtliche für die Zellkultur erforderlichen Medien und Lösungen wurden unter aseptischen Bedingungen hergestellt. Alle Medien sowie PBS wurden bei 4°C gelagert und vor Benutzung im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt.

Medium	Substanz	Menge
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)		
Salze und weitere Bestandteile:	CaCl ₂	200 mg/l
	Fe(III)NO ₃ · 9H ₂ O	0,1 mg/l
	KCl	400 mg/l
	MgSO ₄	97,7 mg/l
	NaHCO ₃	3700 mg/l
	NaCl	6400 mg/l
	NaH ₂ SO ₄ · H ₂ O	125 mg/l
	D-Glucose	1000 mg/l
	Natriumpyruvat	110 mg/l
	Phenolrot	15 mg/l
Aminosäuren	L-Arginin · HCl	84 mg/l
	L-Cystein	48 mg/l
	L-Glutamin	584 mg/l
	Glycin	30 mg/l
	L-Histidin · HCl · H ₂ O	42 mg/l
	Isoleucin	105 mg/l
	L-Leucin	105 mg/l
	L-Lysin · HCl	146 mg/l
	L-Methionin	30 mg/l
	L-Phenylalanin	66 mg/l
	L-Serin	42 mg/l
L-Threonin	95 mg/l	

Medium	Substanz	Menge
Vitamine	L-Tryptophan	16 mg/l
	L-Tyrosin	72 mg/l
	L-Valin	94 mg/l
	D-Calcium-Pantothenat	4 mg/l
	Cholinchlorid	4 mg/l
	Folsäure	4 mg/l
	Myo-Inositol	7,2 mg/l
	Nicotinamid	4 mg/l
	Pyridoxin · HCl	4 mg/l
	Riboflavin	0,4 mg/l
Thiamin · HCl	4 mg/l	
PBS Dulbecco (w/o Ca²⁺, Mg²⁺)	NaCl	8000 mg/l
	KCl	200 mg/l
	NaH ₂ PO ₄	1150 mg/l
	KH ₂ PO ₄	200 mg/l
FCS	FCS	500 ml
	<i>Hitzeinaktivierung bei 56°C, 30 min Aliquotieren zu je 50 ml, Lagerung bei -20°C</i>	
LIF (0,5 x 10⁶ U/ml)	LIF (7 x 10 ⁷ U)	1 ml
	EF-Medium	19 ml
<i>Aliquotieren zu je 1 ml, Lagerung bei 4°C</i>		
β-Mercaptoethanol-Lösung (3,5µg/ml PBS)	β-Mercaptoethanol	35 µl
	PBS	ad 10 ml
<i>Aliquotieren zu je 1 ml, Lagerung bei -20°C</i>		
Ganciclovir-Stammlösung (200 mM)	Ganciclovir-Na (Cymeven®)	543 mg
	H ₂ O	10,1 ml
<i>Lagerung bei -20°C</i>		
Ganciclovir-Lösung (10 mM)	Ganciclovir-Stammlösung	50 µl
	H ₂ O	950 µl
<i>Aliquotieren zu je 100 µl, Lagerung bei -20°C</i>		
EF-Medium (Feederzell-Medium)	DMEM	450 ml
	FCS	50 ml
EF-Kryomedium (20% DMSO)	EF-Medium	12 ml
	DMSO	3 ml
<i>Medium frisch herstellen!</i>		
ES-LIF-Medium (Stammzell-Medium)	DMEM	400 ml
	FCS	100 ml
	β-Mercaptoethanol-Lösung	1 ml
	LIF (0,5 x 10 ⁶ U/ml)	1 ml
ES-LIF-G418-Medium (Selektionsmedium)	ES-LIF-Medium	500 ml
	G418-Sulfat-Lösung (50 mg/ml)	4 ml
ES-LIF-Ganciclovir-Medium (Selektionsmedium)	ES-LIF-Medium	500 ml
	Ganciclovir-Lösung (10 mM)	100 µl
ES-Kryomedium (10% DMSO)	ES-Medium	9 ml
	DMSO	1 ml
<i>Medium frisch herstellen!</i>		

3.3.3.2 Gefäße für die Zellkultur

Alle Gefäße für die Kultivierung eukaryotischer Zellen wurden von der Firma Corning bezogen.

Gefäß	Fläche	Volumen	Trypsin-Menge
175 cm ² -Flasche	175 cm ²	20 ml	3 ml
75 cm ² -Flasche	75 cm ²	15 ml	3 ml
25 cm ² -Flasche	25 cm ²	4 ml	1 ml
Petrischale	55 cm ²	10 ml	-
6-Loch-Platte	6 x 9,5 cm ² = 57 cm ²	3 ml/Loch	1 ml/Loch
24-Loch-Platte	24 x 1,9 cm ² = 45,6 cm ²	1 ml/Loch	200 µl/Loch
96-Loch-Platte	96 x 0,32 cm ² = 30,72 cm ²	200 µl/Loch	30 µl/Loch

3.3.3 Gewinnung und Kultur embryonaler Fibroblasten (Feederzellen)

Vor Beginn der Stammzellkultur mussten zunächst embryonale Fibroblasten präpariert werden, da die ES-Zellkultur auf einer Schicht dieser mitotisch inaktivierten Feederzellen stattfand. Die Gewinnung erfolgte aus Mäuseembryonen, die am Tag 14,5 postcoital nach einer Verpaarung von männlichen CNG3^{-/-}-Mäusen (von Prof. Dr. Martin Biel, München, freundlicherweise zur Verfügung gestellt) mit wildtyp-Weibchen präpariert wurden. Der CNG3-*knockout* zeichnet sich im Gegensatz zu wildtyp-Mäusen durch eine im Genom vorhandene Neomycin-Resistenzgenkassette aus, da das CNG3-Gen durch diese Kassette ersetzt und somit der *knockout* generiert wurde. Durch die Verpaarung erhält man eine Resistenz der Feederzellen gegenüber Neomycinanaloga, welche für deren Kultivierung von großer Bedeutung ist, da zur Selektion homolog rekombinierter Stammzellen für wildtyp-Feederzellen toxisches Geneticin eingesetzt wird. Nur Embryonen mit einer heterozygot vorhandenen Neomycin-Resistenzgenkassette können also zur Herstellung von Feederzellen für diesen Zweck verwendet werden. Die mitotische Inaktivierung der embryonalen Fibroblasten erfolgte durch γ -Strahlung (50 Gy) und resultierte in einer Teilungsunfähigkeit der Zellen, sodass in den Kulturgefäßen nur noch eine Einzelzellschicht ausgebildet wird, auf der die ES-Zellen dann kultiviert werden können. Nach der Präparation musste für jede Charge die „Dichte“ der Zellen pro Kryostock ermittelt werden, d.h. auf welche Fläche in cm² ein Kryostock ausgesät werden kann. Zudem wurde der Zellkulturüberstand jeder Charge mit Hilfe des Mycoplasma Plus PCR Primer Sets (Stratagene) auf eine Kontamination mit Mycoplasmen überprüft.

3.3.3.1 Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Vorgehensweise Verpaarung:

- Männliche CNG3^{-/-}-Mäuse mit 129/SV^{+/+}-Weibchen abends zusammensetzen
- Am nächsten Morgen Kontrolle auf Vaginalpfropf aus Samenflüssigkeit (*plug check*)

Vorgehensweise Präparation:

- Töten der schwangeren Maus durch zervikale Dislokation an Tag 14,5 p.c.
- Maus komplett in 80% Ethanol baden
- Fixierung der Maus; Eröffnung des Bauchraumes
- Uterus herauspräparieren und in eine Petrischale überführen
- Uterus und Fruchtblase öffnen; Embryonen in eine Schale mit sterilem PBS überführen
- Köpfe der Embryonen abschneiden und innere Organe (rotes Gewebe) entfernen
- Corpus in frisches steriles PBS überführen; mit dem Skalpell zerkleinern
- Vorlegen von 1 ml 1x-Trypsin/EDTA pro Embryo in ein 50 ml-Falcon-Gefäß
- Embryonen mit der Pinzette in das Falcon-Gefäß überführen
- Trypsinieren 5-10 min bei 37°C im Wasserbad
- Gut und lange resuspendieren mit der 25 ml-Stripette und anschließend mit der 10 ml-Stripette
- Trypsinieren 5 min bei 37°C im Wasserbad
- Gut und lange resuspendieren mit der 10 ml-Stripette
- Trypsinieren 5 min bei 37°C im Wasserbad
- Gut und lange resuspendieren mit der 10 ml-Stripette, bis keine Klumpen mehr sichtbar sind
- Auffüllen mit EF-Medium zu 35 ml
- Intensiv resuspendieren mit der 10 ml-Pipette
- Zelltrümmer 10 min absinken lassen
- Überstand in ein neues Falcon-Gefäß überführen
- Suspension aliquotieren: pro Embryo eine 175cm²-Flasche mit EF-Medium befüllen und die entsprechende Menge Zellsuspension hinzufügen; homogen verteilen
- Inkubation bei 37°C, 5% CO₂
- Wachstum täglich mikroskopisch kontrollieren
- Mediumwechsel am Tag nach der Präparation, danach alle zwei bis drei Tage
- Kultivierung bis zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz

Vorgehensweise Expansion (1. Passage):

- Je nach Wachstumsverhalten und Zelldichte splitten im Verhältnis 1:3-1:8
- Medium absaugen
- 1x Waschen mit ca. 10 ml PBS

- Zugabe von je 3 ml 1x-Trypsin/EDTA
- Inkubation 3-5 min bei 37°C
- Zellen durch Klopfen auf den Flaschenrand ablösen und vereinzeln, mikroskopische Kontrolle
- Zugabe von 6 ml EF-Medium, resuspendieren
- In 3-8 175 cm²-Flaschen (je nach Split-Verhältnis) die erforderliche Menge EF-Medium vorlegen und die vorbereitete Zellsuspension auf diese Anzahl an Flaschen homogen verteilen
- Inkubation bei 37°C, 5% CO₂
- Wachstum täglich mikroskopisch kontrollieren
- Mediumwechsel alle drei bis vier Tage
- Kultivierung bis zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz

Vorgehensweise Ernte der Feederzellen:

- Jeweils 5 Flaschen werden parallel bearbeitet
- Medium absaugen
- 1x Waschen mit ca. 10 ml PBS
- Zugabe von je 3 ml 1x-Trypsin/EDTA
- Inkubation 5-10 min bei 37°C
- Zellen durch Klopfen auf den Flaschenrand ablösen und vereinzeln, mikroskopische Kontrolle
- Zugabe von 7 ml EF-Medium, resuspendieren
- Zellsuspension von je 5 Flaschen in ein 50 ml-Falcon-Gefäß überführen
- Zentrifugation 5 min, 1000 rpm
- Überstände absaugen, Pellets resuspendieren in je 10 ml EF-Medium
- Vereinigen des Inhalts von je 2 Falcon-Gefäßen; Auffüllen mit EF-Medium auf 40 ml

Vorgehensweise Bestrahlung:

- Zellen bis zur Bestrahlung absetzen lassen, Transport in Styroporbox
- Bestrahlung mit 50 Gy (5x10 Gy) in der Radioonkologie des Universitätsklinikums Tübingen
- Nach der Bestrahlung schwenken der Zellen

Vorgehensweise Aliquotieren und Einfrieren:

- Zentrifugation 5 min, 1000 rpm
- Pellets in je 13 ml EF-Medium resuspendieren
- Herstellung von 15 ml EF-Kryomedium (20% DMSO)

- Zugabe von je 13 ml EF-Kryomedium zu den resuspendierten Zellen, gut mischen
- Aliquotieren zu je 1 ml in 1,8 ml-Kryoröhrchen (25 Kryoröhrchen pro Zellpellet)
- Kryoröhrchen in auf -20°C vorgekühlte Kryobox stellen
- Lagerung für 24 h bei -20°C
- Danach Lagerung für 48 h bei -80°C
- Dauerlagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C

3.3.3.2 Kultivierung embryonaler Fibroblasten

Die für die jeweiligen Zellkulturgefäße erforderliche Menge an Feederzellen wurde mindestens 24 Stunden bis maximal 7 Tage vor der Kultivierung der Stammzellen in die entsprechenden Gefäße ausgesät und das Wachstum mikroskopisch beurteilt. Bei nicht ausreichender Zelldichte wurden nochmals Feederzellen nachgesät, bis der Gefäßboden einschichtig mit angewachsenen Zellen in einer Konfluenz von ca. 70% bedeckt war. Während die Fibroblastenschicht bei zu hoher Zelldichte zur Ablösung vom Untergrund neigt, bietet diese 70%ige Konfluenz den Stammzellen optimale Wachstumsbedingungen.

Vorgehensweise:

- Gefrierstocks bei 37°C im Wasserbad auftauen
- Zellsuspension mit 4 ml EF-Medium resuspendieren
- Überführen der gesamten Zellsuspension (5 ml) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen
- Zentrifugation 5 min, 1000 rpm; Überstand absaugen
- Vorlegen der erforderlichen Menge an EF-Medium in die benötigten Zellkulturgefäße
- Zellpellet in der entsprechenden Menge EF-Medium resuspendieren
- Überführen der Zellsuspension in das vorbereitete Zellkulturgefäß; homogen verteilen
- Inkubation bei 37°C, 5% CO₂
- Mikroskopische Kontrolle: spätestens nach zwei Tagen sollte die Konfluenz ca. 70% betragen

3.3.4 Gewinnung embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen von Mäusen werden aus der inneren Zellmasse von 3,5 Tage alten Blastozysten gewonnen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Stammzellen handelt es sich um käuflich erworbene R1 ES-Zellen (Nagy et al. 1993), die aus Blastozysten von agoutifarbenen Mäusen des Stamms 129/SV gewonnen wurden. Die Zellen werden nach Expansion als gebrauchsfertige Gefrierstocks der Passage 11 geliefert und können bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt oder zur Gewinnung weiterer Gefrierstocks in Zellkultur passagiert und im Anschluss daran in flüssigem Stickstoff dauergelagert werden.

3.3.5 Kultivierung embryonaler Stammzellen

Embryonalen Stammzellen wurden wie in 3.3.2 beschrieben auf einer Feederzell-Schicht kultiviert. Kurz vor dem Aussäen der Stammzellen in ein mit embryonalen Fibroblasten bewachsenes Zellkulturgefäß wurde das jeweilige EF-Medium entfernt und durch die benötigte Menge des entsprechenden Stammzellmediums ersetzt. Grundsätzlich wurden die abzentrifugierten Stammzell-Pellets nur in einem Anteil der für das jeweilige Zellkulturgefäß nötigen Mediummenge resuspendiert und der Rest des Stammzellmediums direkt in das Zellkulturgefäß vorgelegt, wodurch eine homogenere Verteilung der Stammzellen erreicht wird. Zur ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen wurde mindestens ein Mal pro Tag das Medium gewechselt und die ES-Zellkulturen wurden spätestens bei den ersten Zellkontakten (Konfluenz ca. 70%) passagiert, da diese Berührungen eine Differenzierung zur Folge hätten. Die mikroskopische Kontrolle des Wachstums erfolgte ebenfalls täglich.

Das Auflösen der Zellverbände und Ablösen der Zellen von den Kulturgefäßen beim Passagieren wurde mit Hilfe der Serinprotease Trypsin durchgeführt. Zu beachten ist hierbei, dass das Medium zuvor vollständig durch Waschen mit PBS entfernt wird, da Mediumbestandteile zu einer Inaktivierung des Trypsins führen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 5-10 Minuten im Brutschrank, bis eine vollständige Vereinzelnung der Zellen durch Resuspendieren erreicht werden konnte. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die vereinzeln Zellen im entsprechenden Medium gut resuspendiert und somit eine Inaktivierung des Trypsins herbeigeführt.

Abbildung 3.2 zeigt eine Übersicht über den Ablauf der zellkulturtechnischen Arbeiten.

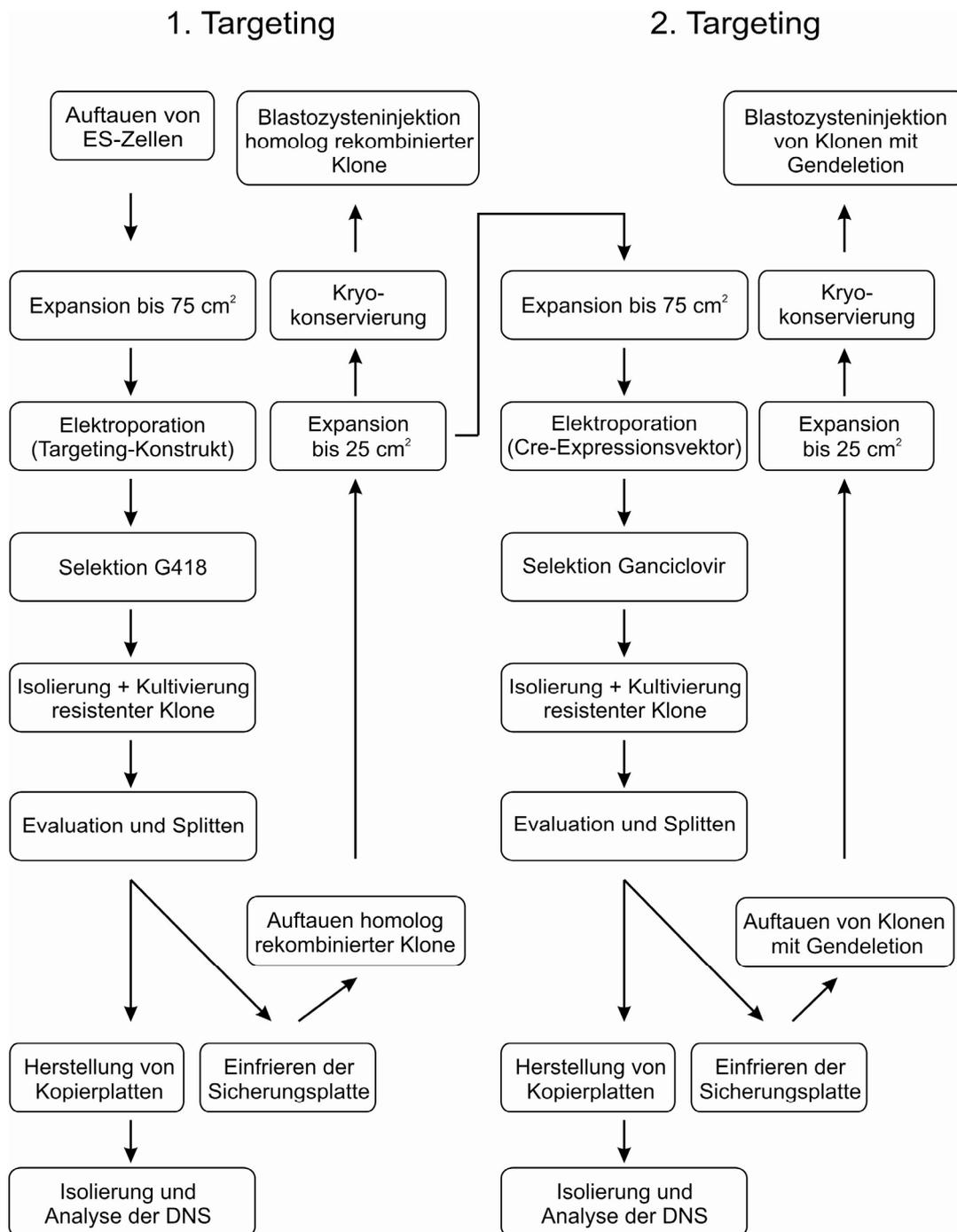


Abbildung 3.2: Arbeitsschritte des 1. und 2. Targeting

3.3.5.1 Auftauen und Expansion

Die ES-Zellen wurden zunächst in eine 25 cm²-Flasche ausgesät und zur Gewinnung einer für die Elektroporation ausreichenden Zellzahl in einer 75 cm²-Flasche weiter kultiviert.

Vorgehensweise Auftauen:

- Gefrierstock bei 37°C im Wasserbad auftauen
- Zellsuspension mit 4 ml ES-Medium resuspendieren
- Überführen der gesamten Zellsuspension (5 ml) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen

- Zentrifugation 5 min, 1000 rpm; Überstand absaugen
- Pellet resuspendieren mit 5 ml ES-LIF-Medium
- Zentrifugation 5 min, 1000 rpm; Überstand absaugen
- Pellet resuspendieren mit 2 ml ES-LIF-Medium
- Zellsuspension in eine mit ES-LIF-Medium vorbeladene 25 cm²-Flasche mit Feederzellen überführen, homogen verteilen
- Inkubation bei 37°C, 5% CO₂

Vorgehensweise Expansion von 25 cm² auf 75 cm²:

- Medium absaugen
- 2x Waschen mit 5 ml PBS
- Zugabe von 1 ml 1x-Trypsin/EDTA
- Inkubation im Brutschrank für 5 min bei 37°C
- Resuspendieren, mikroskopische Kontrolle (runde Einzelzellen)
- Zugabe von 4 ml ES-LIF-Medium, resuspendieren
- Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon-Gefäß überführen
- Zentrifugation 5 min, 1000 rpm; Überstand absaugen
- Pellet resuspendieren in 5 ml ES-LIF-Medium
- Zentrifugation 5 min, 1000 rpm; Überstand absaugen
- Pellet resuspendieren in 5 ml ES-LIF-Medium
- Zellsuspension in eine mit ES-LIF-Medium vorbeladene 75 cm²-Flasche mit Feederzellen überführen, homogen verteilen
- Inkubation bei 37°C, 5% CO₂

3.3.5.2 Elektroporation im 1. Targeting und homologe Rekombination

Bei einer Konfluenz der Stammzellen von ca. 60-70% in der 75 cm²-Flasche ist eine ausreichend hohe Zellzahl für die Elektroporation erreicht. Es handelt sich hierbei um ein sehr effizientes Verfahren zur Transfektion eukaryotischer Zellen, bei dem durch kurze Hochspannungspulse die Membranfunktion der Zellen gestört wird (Neumann et al. 1982). Kurzfristig entstehen dabei Poren in der Membran, durch die Fremd-DNS in die Zellen aufgenommen werden kann (Klenchin et al. 1991; Sukharev et al. 1992). Zu diesem Zweck werden die Stammzellen durch Trypsinierung vereinzelt, mit dem entsprechenden DNS-Konstrukt in einer speziellen Elektroporationsküvette gemischt und dem Spannungspuls unterzogen. Nach Aufnahme der DNS ins Zellinnere findet dann die Integration ins Genom der Zelle statt. Der in 1.4.2.2 beschriebene Aufbau des Targeting-Konstrukts ermöglicht über die homologen Bereiche eine gezielte Aufnahme der DNS an definierter Stelle durch *crossing over*, es findet also eine homologe Rekombination statt. Hierbei handelt es sich allerdings um ein sehr seltenes Ereignis, nur in ca. jeder zehntausendsten der transfizierten Zellen findet

überhaupt eine Rekombination statt. Der Anteil der Zellen mit korrekter Integration beträgt dabei ca. 0,1-5%. Um das Auffinden dieser Zellen zu erleichtern beginnt nach der Elektroporation die Selektion rekombinanter Zellen mit G418 mit der Folge, dass nur diejenigen Zellklone überleben, welche das DNS-Konstrukt mit Neomycin-Resistenzkassette an irgendeiner Stelle ins Genom integriert haben. Das Vorgehen beim 1. Targeting ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt.

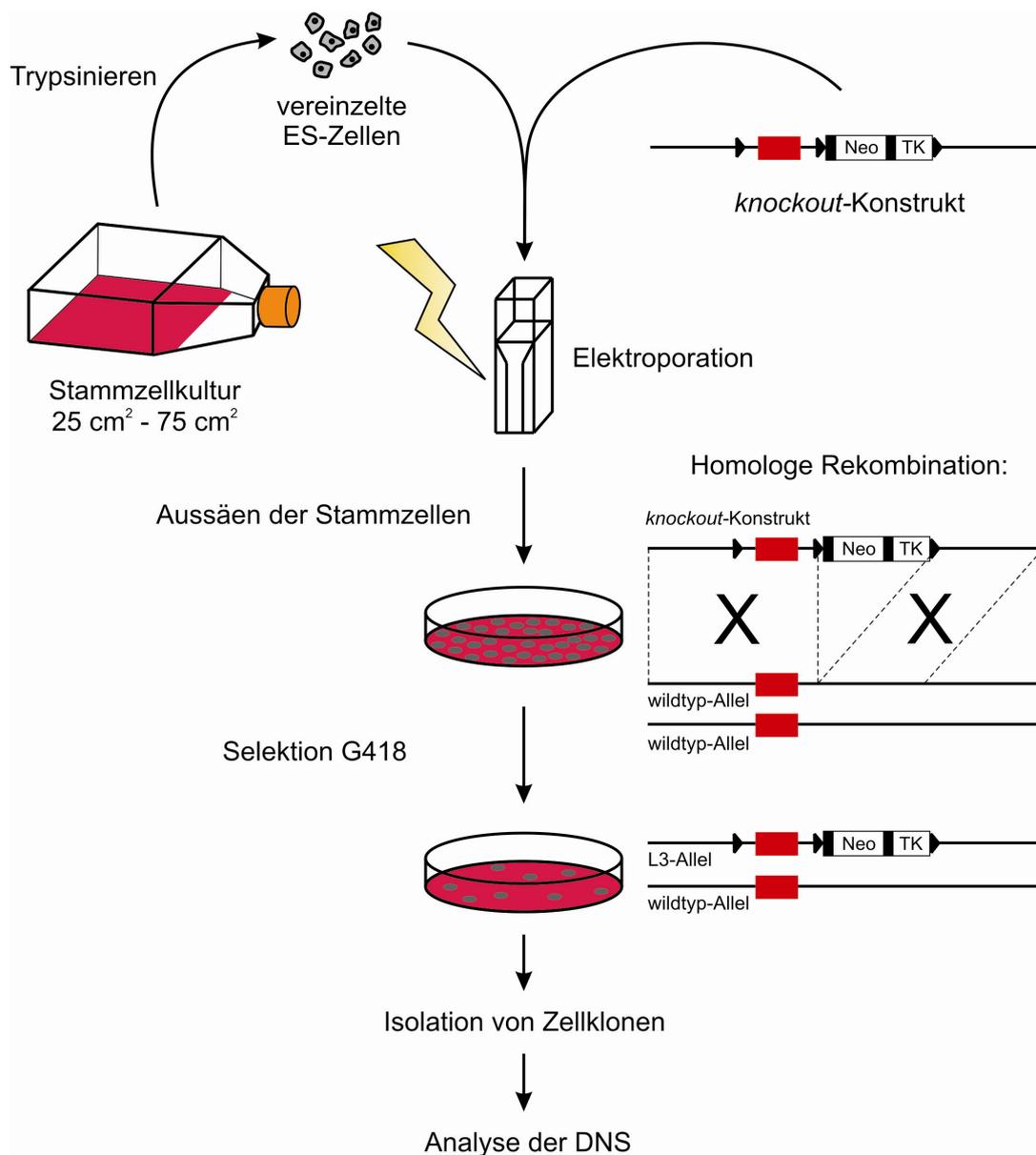


Abbildung 3.3: Ablauf des 1. Targeting

Vorgehensweise Vorbereitung zur Elektroporation:

- Medium absaugen
- 2x Waschen mit 15 ml PBS
- Zugabe von 3 ml 1x-Trypsin/EDTA
- Inkubation im Brutschrank für 5 min bei 37°C
- Resuspendieren, mikroskopische Kontrolle (runde Einzelzellen)
- Zugabe von 7 ml ES-LIF-Medium, resuspendieren
- Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon-Gefäß überführen
- Zentrifugation 5 min, 1000 rpm; Überstand absaugen
- Pellet resuspendieren in 10 ml PBS
- Zentrifugation 5 min, 1000 rpm; Überstand absaugen
- Pellet resuspendieren in 900 μl – x μl PBS (x = Volumen an DNS-Lösung zur Elektroporation)

Vorgehensweise Zellzahlbestimmung:

Zur Elektroporation sollen mindestens 6×10^6 Zellen in einem Volumen von 1 ml eingesetzt werden, weshalb vor der Elektroporation die tatsächliche Zellzahl mit einer Neubauer Zelläskammer bestimmt wurde (Abbildung 3.4).

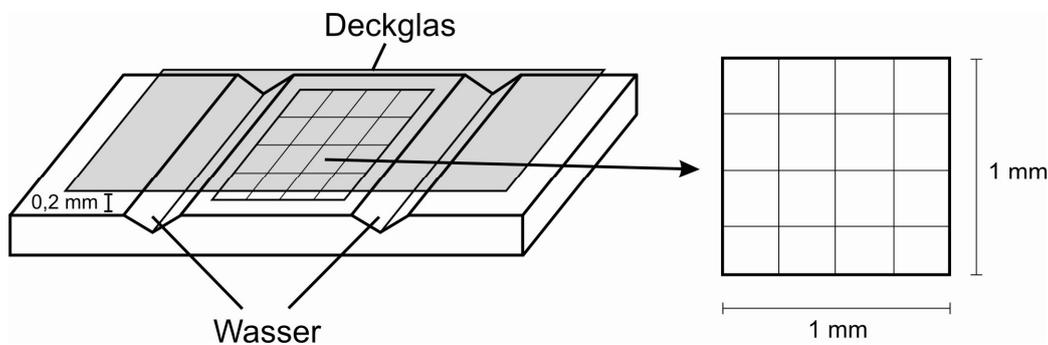


Abbildung 3.4: Neubauer Zelläskammer

- Aliquot der Zellsuspension 1:10 verdünnen (10 μl Zellsuspension + 90 μl Wasser)
- Kammer vorbereiten: je 1 Tropfen Wasser in die seitlichen Kavitäten einbringen und ein Deckglas damit über dem Raster fixieren
- 10 μl der Zellsuspension unter das Deckglas auf das Raster pipettieren
- Zellen mikroskopisch auszählen: Vergrößerung 25x, Auszählen von 16 kleinen Quadraten in einem dick umrahmten größeren Quadrat und Mittelwertbildung
- Mittelwert Zellen pro kleines Quadrat $\times 16 =$ Zellzahl in $0,2 \text{ mm}^3$
(1 mm \times 1 mm \times 0,2 mm)
- Zellzahl in $0,2 \text{ mm}^3 \times 5000 \times 10$ (Verdünnung) = Zellzahl in 1 ml Zellsuspension

Vorgehensweise Präparation des Targeting-Vektors:

- 100 µg DNS des Targeting-Konstrukts durch Restriktionsverdau linearisieren (3.2.5.1)
- Durchführung einer Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.4.2)
- Durchführung einer Alkoholfällung mit Ethanol (3.2.4.1)
- Abnehmen des 70%igen Ethanols des Waschschriffs unter der Sterilwerkbank
- Pellet unter der Sterilwerkbank trocknen (ca. 30 min) und in 100 µl sterilem PBS lösen
- Abnehmen von 5 µl DNS-Lösung zur Durchführung einer photometrischen Konzentrationsbestimmung sowie einer semiquantitativen Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3.2)
- 50 µg DNS werden zur Elektroporation eingesetzt

Vorgehensweise Elektroporation:

- 30 min vor der Elektroporation EF-Medium aus 10 feederbeschichteten 55 cm²-Petrischalen absaugen und durch je 9 ml ES-LIF-Medium ersetzen; Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ bis nach der Elektroporation
- 50 µg DNS (Targeting Konstrukt, s.o.) in x µl PBS in sterilem Kryotube vorlegen
- Zugabe der in PBS resuspendierten Zellen (s.o., Gesamtvolumen 900 µl), mischen
- Elektroporationsküvette auf Eis vorkühlen und DNS-Zellsuspension mit gestopfter Pasteurpipette so hoch in die Küvette einfüllen, dass die Flüssigkeit nicht über die Metallplatten tritt.
- Zellsuspension bis zur Elektroporation auf Eis lagern
- Elektroporation (Gene Pulser II, BioRad):
Ladung: 500 µF
Spannung: 0,23 kV
Zeitkonstante T_{const} ablesen; T_{const}-Kontrolle mit 900 µl PBS sollte gleich sein
- Zellen in der Küvette für 5 min bei RT unter der Sterilwerkbank ruhen lassen
- In einem 15 ml-Falcon-Röhrchen 9,2 ml ES-LIF-Medium vorlegen
- Zellsuspension mit einer gestopften Pasteurpipette in das vorgelegte Medium überführen, gut resuspendieren
- Je 1 ml der Zellsuspension in eine vorbereitete 55 cm²-Petrischale pipettieren, homogen verteilen
- Inkubation bei 37°C, 5% CO₂
- 24 h nach der Elektroporation Selektionsstart mit ES-LIF-G418-Medium, täglicher Mediumwechsel

- mikroskopische Kontrolle: nach ca. 2-3 Tagen beginnen die nicht rekombinierten Zellklone abzusterben und ab dem 8. Selektionstag können überlebende Zellklone isoliert werden

3.3.5.3 Isolierung rekombinanter ES-Zellklone

Nach 7 Tagen der Kultivierung in Selektionsmedium können ab dem 8. Tag Zellklone mit optimaler Größe und geeignetem Aussehen mit einer 20 µl-Pipette unter mikroskopischer Kontrolle aus den Zellkulturschalen isoliert werden. Nur einzeln gewachsene Zellklone, die größer waren als die Pipettenspitzen-Öffnung wurden ausgewählt. Nicht differenzierte Zellklone zeichnen sich durch ein leicht unregelmäßiges dreidimensionales Wachstum aus und zeigen einen klar abgegrenzten leuchtenden Rand. Die Mitte der Kolonie weist oft eine dunklere Farbe auf, was auf eine höhere Zelldichte hindeutet. Flach und eindimensional erscheinende Zellklone mit ausgefranstem Rand hingegen weisen auf eine Differenzierung hin und sollten daher vermieden werden. Da es sich bei der homologen Rekombination um ein sehr seltenes Ereignis handelt, ist es im 1. Targeting wichtig, so viele Zellklone wie möglich zu isolieren, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, in der getroffenen Auswahl einen homolog rekombinierten Klon zu finden. Die unten beschriebene Prozedur wird daher an mehreren aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Nach der Isolation wurde jeder Klon in eine andere Vertiefung einer 96-Loch-Platte überführt, und durch anschließende Trypsinierung und das Verteilen der Zellsuspensionen auf zwei neue 96-Loch-Platten konnten zwei Kopien von jedem Klon weiter kultiviert werden. In Abbildung 3.5 werden die Isolierung der Klone und die nachfolgenden Schritte schematisch dargestellt.

Vorgehensweise zur Isolierung:

- Mikroskop mit 80% Ethanol komplett desinfizieren und unter die Sterilwerkbank stellen
- In einer 96-Loch-Platte 35 µl PBS pro Vertiefung vorlegen
- Zellklon unter mikroskopischer Kontrolle mit der 20 µl-Pipette (Einstellung: 2,5 µl) isolieren; dazu zunächst mit der Pipettenspitze die Feederzell-Schicht um den Klon zerschneiden und dann den Klon durch Anschieben mit der Pipettenspitze von der Petrischale ablösen und aufsaugen
- Jeden Klon in eine Vertiefung der 96-Loch-Platte mit PBS überführen; nicht benötigte Vertiefungen mit dem Deckel der 96-Loch-Platte abdecken; Spitze korrespondierend zur Vertiefung aus der Box nehmen
- Jede 55 cm²-Petrischale von oben nach unten und von links nach rechts nach geeigneten Klonen durchsuchen
- ES-LIF-G418-Medium der durchsuchten Petrischale absaugen und durch frisches ES-LIF-G418-Medium ersetzen; weitere Inkubation bei 37°C, 5% CO₂

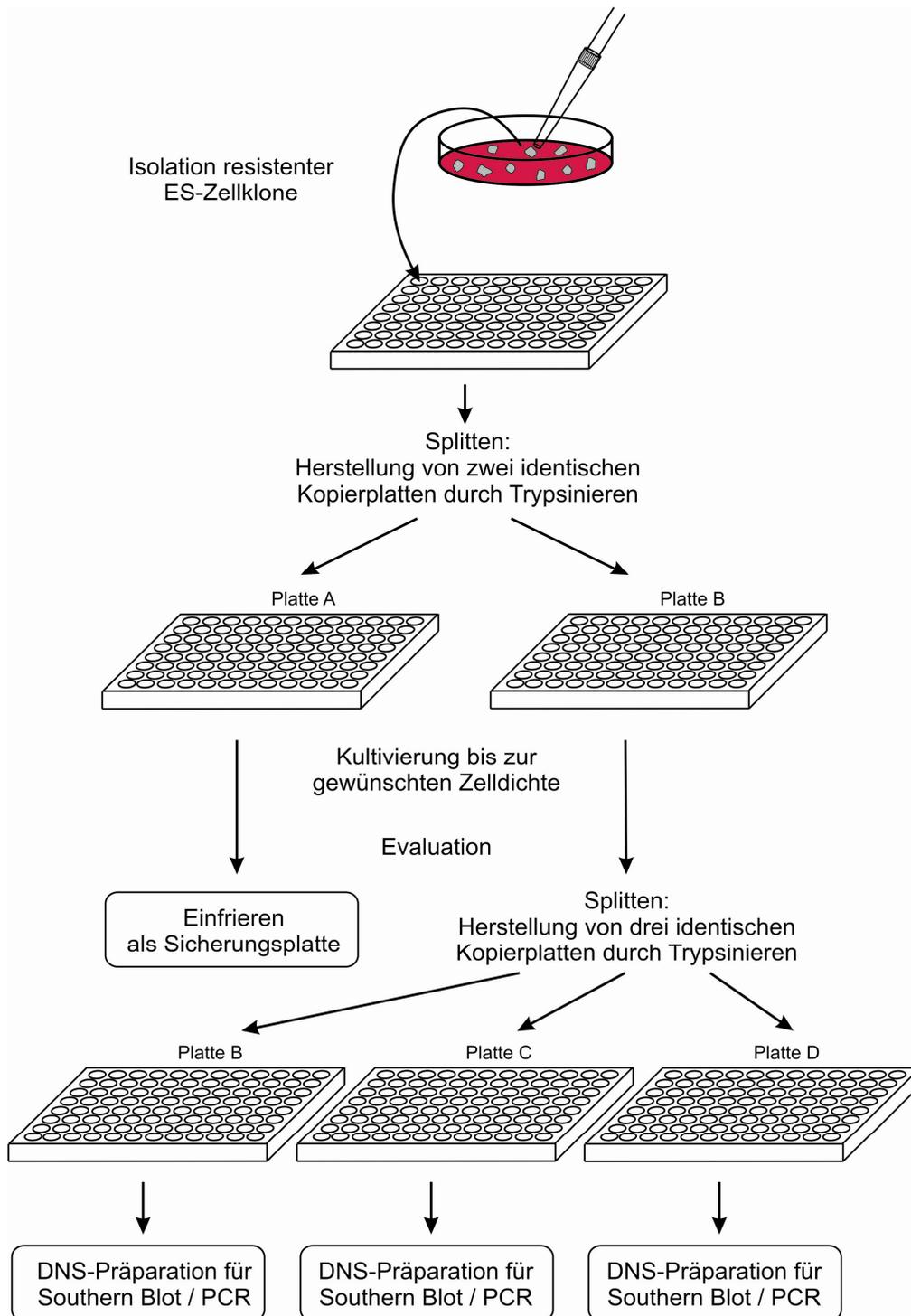


Abbildung 3.5: Isolierung und Vervielfältigung resistenter ES-Zellklone

Vorgehensweise Splitten:

- Wenn jede Vertiefung der 96-Loch-Platte einen Klon enthält:
Zugabe von 30 μ l 2x-Trypsin/EDTA
- Inkubation im Brutschrank für 10 min bei 37°C
- Resuspendieren (ca. 20x) mit der 8-Kanal-Pipette; Einstellung 40 μ l; Mikroskopische Kontrolle

- Zugabe von 60 µl ES-LIF-G418-Medium
- Jede Reihe einzeln resuspendieren (ca. 10x) mit der 8-Kanal-Pipette; Einstellung 80 µl; je 50 µl pro well auf zwei frische 96-Loch-Platten mit Feeder-Zellen überführen (Platte A + B)
- Inkubation bei 37°C, 5% CO₂
- Ursprüngliche Platte verwerfen
- Mediumwechsel am Tag nach der Isolation, danach alle zwei Tage

3.3.5.4 Evaluation, Einfrieren und weitere Vervielfältigung rekombinanter ES-Zellklone

2-4 Tage nach der Isolation wurden die einzelnen Stammzellklone nach Aussehen, Größe und Anzahl der Kolonien mikroskopisch beurteilt. Hierzu wurde jeder Vertiefung eine Farbe zugeordnet, die für die oben erwähnten Informationen codiert (Tabelle 3.1). Diese Farbzuzuordnung wurde auf einer Papierkopie für jede beurteilte Platte dokumentiert.

Tabelle 3.1: Evaluation der Stammzellen mittels Farbcode

Wachstumseigenschaften	Farbcode
Keine Stammzellklone gewachsen	blau
Wenige Stammzellklone gewachsen	grün
Viele schöne Stammzellklone ohne Berührung der einzelnen Kolonien	gelb
Viele Kolonien mit einzelnen Berührungen oder einzelne „aufgeplatze“, differenzierte Zellklone	rot
Viele Kolonien mit vielen Berührungspunkten, viele „aufgeplatze“, differenzierte Zellklone; Zellrasen	doppelt rot

Nach der Evaluation wurde eine Plattenkopie als Sicherungsplatte eingefroren, während die zweite Kopie nochmals gesplittet wurde, damit insgesamt drei identische Kopien von jedem Klon zur Analyse der DNS auf homologe Rekombination zur Verfügung standen. Die Sicherungsplatte wurde nach erfolgter Identifizierung homolog rekombinierter Klone wieder aufgetaut und die entsprechenden Klone erneut in Zellkultur genommen, um entweder ein 2. Targeting zu starten oder die Klone für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff vorzubereiten. Ziel ist dabei eine möglichst hohe Anzahl an Klonen, die potentiell für ein 2. Targeting geeignet sind. Es ist daher darauf zu achten, dass die Platten dann weiterverarbeitet werden, wenn möglichst viele Zellklone der Einstufung „gelb“ oder „rot“ vorhanden sind, da nur hier ein geeignetes Zellwachstum ohne Differenzierung vorliegt.

Vorgehensweise Einfrieren der Sicherungsplatte (Platte A):

- Medium in Fotowanne abgießen
- 2x Waschen mit je 180 µl PBS pro Vertiefung; PBS in Fotowanne abgießen
- Zugabe von 30 µl 1x-Trypsin/EDTA pro Vertiefung
- Inkubation im Brutschrank für 10 min bei 37°C

- Mikroskopische Kontrolle: Zellklone und Feederzellen vom Boden abgelöst, einige Einzelzellen vorhanden
- Resuspendieren mit der 8-Kanal-Pipette; Einstellung 25 µl
- Mikroskopische Kontrolle: keine Zellaggregate mehr, nur noch Einzelzellen
- Zugabe von 180 µl ES-Kryomedium
- Platten mit Autoklavierband dicht verschließen, Lagerung über Nacht bei -20°C
- Dauerlagerung bis zum Wiederauftauen bei -80°C

Vorgehensweise Vervielfältigung der Platte B:

- Medium in Fotowanne abgießen
- 2x Waschen mit je 180 µl PBS pro Vertiefung; PBS in Fotowanne abgießen
- Zugabe von 30 µl 1x-Trypsin/EDTA pro Vertiefung
- Inkubation im Brutschrank für 10 min bei 37°C
- Mikroskopische Kontrolle: Zellklone und Feederzellen vom Boden abgelöst, einige Einzelzellen vorhanden
- Resuspendieren mit der 8-Kanal-Pipette; Einstellung 25 µl
- Mikroskopische Kontrolle: keine Zellaggregate mehr, nur noch Einzelzellen
- Zugabe von 120 µl ES-LIF-G418-Medium
- Jede Reihe einzeln resuspendieren (ca. 10x) mit der 8-Kanal-Pipette; Einstellung 120 µl; je 50 µl pro well auf zwei frische 96-Loch-Platten mit Feeder-Zellen überführen (Platte C + D)
- Zum Rest der Zellen in Platte B 150 µl ES-LIF-G418-Medium zugeben
- Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ bis das Medium gelb wird (ca. 4 Tage)

Vorgehensweise Einfrieren der Zellen für die DNS-Präparation (Platten B-D)

- Durchführung im Labor unter nicht sterilen Bedingungen
- Medium in Fotowanne abgießen
- 2x Waschen mit je 180 µl PBS pro Vertiefung; PBS in Fotowanne abgießen
- Platten über Papiertüchern trocken klopfen
- Abkleben mit Parafilm, Lagerung bei -20°C

Die ES-Zellen der Platten B-D wurden dann wie in 3.2.2.1 beschrieben lysiert und die DNS durch ethanolische Fällung isoliert. Mittels Restriktionsverdau und Southern Blot (3.2.10) oder PCR (3.2.8.3) konnten die einzelnen Zellklone schließlich auf homologe Rekombination untersucht werden.

3.3.5.5 Auftauen und Expansion homolog rekombinierter Klone

Nach der Identifikation homolog rekombinierter ES-Zellklone wurden diese von der Sicherungsplatte A aufgetaut und erneut in Zellkultur genommen, um entweder ein 2. Targeting durchzuführen oder um die Klone so weiter zu verarbeiten, dass sie schließlich in flüssigem Stickstoff dauergelagert werden konnten.

Vorgehensweise Auftauen der positiven Klone:

- Entsprechende 96-Loch-Platte im Brutschrank bei 37°C auftauen
- Zellen in der ausgewählten Vertiefung gut resuspendieren (200 µl-Pipette)
- Zellsuspension in eine mit ES-LIF-Medium vorbeladene Vertiefung einer 24-Loch-Platte überführen, homogen verteilen
- Vertiefung der 96-Loch-Platte mit 200 µl ES-LIF-Medium spülen und die Zellsuspension in dieselbe 24-Loch-Vertiefung überführen
- Inkubation bei 37°C, 5% CO₂
- Beim Erreichen einer Konfluenz von ca. 70% wurden die Zellen auf eine 6-Loch-Platte expandiert [alternativ wurden die Zellen beim Vorhandensein von nur sehr wenigen Zellklonen nochmals auf die 24-Loch-Platte passagiert, um eine Zellzahl zu erreichen, die eine Passage auf die 6-Loch-Platte erlaubt]

Vorgehensweise Expansion von 24-Loch auf 6-Loch [alternativ: 24-Loch auf 24-Loch]:

- Medium absaugen
- 2x Waschen mit je 1 ml PBS pro Vertiefung; PBS absaugen
- Zugabe von 200 µl 1x-Trypsin/EDTA pro Vertiefung
- Inkubation im Brutschrank für 5 min bei 37°C
- Mikroskopische Kontrolle: Zellklone und Feederzellen vom Boden abgelöst, einige Einzelzellen vorhanden
- Resuspendieren mit der 200 µl-Pipette
- Mikroskopische Kontrolle: keine Zellaggregate mehr, nur noch Einzelzellen
- Zugabe von 900 µl ES-LIF-Medium
- Resuspendieren und Zellsuspension in eine mit ES-LIF-Medium vorbeladene Vertiefung einer 6-Loch-Platte überführen, homogen verteilen [alternativ: Resuspendieren und Zellsuspension in eine mit ES-LIF-Medium vorbeladene Vertiefung einer 24-Loch-Platte überführen, homogen verteilen; Inkubation bei 37°C, 5% CO₂; bei einer Konfluenz von ca. 70% Expansion von 24-Loch auf 6-Loch]
- Inkubation bei 37°C, 5% CO₂

Vorgehensweise Expansion von 6-Loch auf 2x 25 cm²-Flaschen:

- Medium absaugen
- 2x Waschen mit je 3 ml PBS pro Vertiefung; PBS absaugen

- Zugabe von 1 ml 1x-Trypsin/EDTA pro Vertiefung
- Inkubation im Brutschrank für 5 min bei 37°C
- Mikroskopische Kontrolle: Zellklone und Feederzellen vom Boden abgelöst, einige Einzelzellen vorhanden
- Resuspendieren mit der 1000 µl-Pipette
- Mikroskopische Kontrolle: keine Zellaggregate mehr, nur noch Einzelzellen
- Zugabe von 3 ml ES-LIF-Medium
- Resuspendieren und Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführen
- Zentrifugation 5 min, 1000 rpm; Überstand absaugen
- Pellet resuspendieren in 5 ml ES-LIF-Medium
- Je 2 ml der Zellsuspension in je eine mit ES-LIF-Medium vorbeladene 25 cm²-Flasche überführen, homogen verteilen
- Inkubation bei 37°C, 5% CO₂
- Die restlichen 1000 µl der Zellsuspension zur Gewinnung von Zellen zur DNS-Präparation in drei Reihen einer 96-Loch-Platte aussäen:
 - Je 30 µl der Zellsuspension in eine Vertiefung einer mit Feederzellen und ES-LIF-Medium vorbereiteten 96-Loch-Platte pipettieren
 - Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ bis das Medium gelb wird (ca. 4 Tage)
 - Weiteres Vorgehen siehe 3.3.5.4 „Einfrieren der Zellen für die DNS-Präparation“

Weiteres Vorgehen mit der 25 cm²-Flasche:

Abhängig von der weiteren Versuchsplanung wurden die Zellen einer 25 cm²-Flasche entweder weiter bis zur 75 cm²-Flasche expandiert (Durchführung siehe 3.3.5.1) und im Anschluss mit dem Cre-Expressionsvektor transfiziert (2. Targeting, siehe 3.3.5.6), oder die Zellen wurden nach dem Trypsinieren mit Kryomedium versetzt und bis zur Blastozysteninjektion in flüssigem Stickstoff dauergelagert (Kryokonservierung, siehe 3.3.5.10). Von jedem homolog rekombinierten und von der Sicherungsplatte wieder aufgetauten Klon wurde mindestens ein Gefrierstock für die Lagerung in flüssigem Stickstoff hergestellt.

3.3.5.6 Elektroporation im 2. Targeting

Bei ca. 60-70%iger Konfluenz der Stammzellen in der 75 cm²-Flasche ist die Zellzahl ausreichend, um die Transfektion mit einem Expressionsvektor, der für die Cre-Rekombinase codiert, durchzuführen. Die Stammzellen wurden durch Trypsinierung vereinzelt, mit dem Cre-Expressionsvektor in einer Elektroporationsküvette gemischt und dem Spannungspuls unterzogen. In diesem so genannten zweiten Targeting sollen nun DNS-Abschnitte zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen mit Hilfe des oben genannten Enzyms deletiert werden. Nach der Elektroporation wurde eine Negativselektion mit Ganciclovir gestartet, so dass alle

Zellklone absterben, bei denen die NeoTK-Resistenzgenkassette trotz Cre-Rekombination erhalten blieb. Somit sind bei einem Konstrukt mit drei loxP-Erkennungssequenzen nach der Selektion nur noch zwei verschiedene Rekombinationsereignisse zu verzeichnen: der generelle *knockout* mit einer singulären im Genom verbleibenden loxP-Erkennungssequenz und der konditionale *knockout* mit den von zwei loxP-Sequenzen flankierten Exonen. Der Ablauf des 2. Targeting ist in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt.

Die Vorgehensweise der Vorbereitung der Zellen zur Elektroporation sowie die Bestimmung der Zellzahl entsprechen ohne Ausnahme dem Vorgehen beim 1. Targeting (siehe 3.3.5.2).

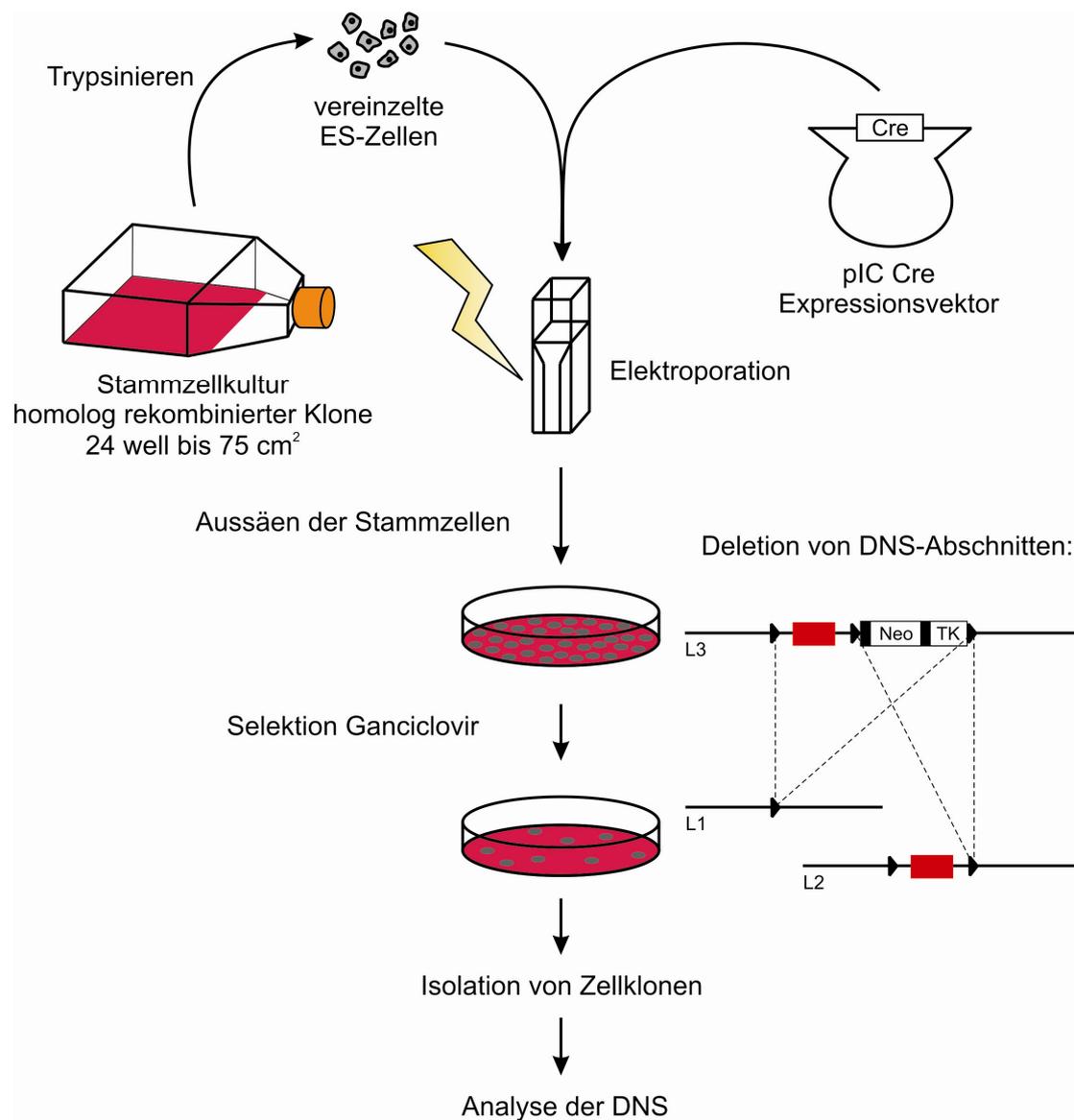


Abbildung 3.6: Ablauf des 2. Targeting

Nach Elektroporation mit dem Cre-Expressionsvektor werden Genabschnitte zwischen loxP-Erkennungssequenzen deletiert. Die Selektion mit Ganciclovir überleben nur Klone ohne Resistenzgenkassette, also Klone mit konstitutivem (L1) oder konditionalem (L2) *knockout*.

Vorgehensweise Präparation des Targeting-Vektors:

- Durchführung einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit 100 µg nicht linearisierter pIC Cre-DNS (3.2.4.2)
- Durchführung einer Alkoholfällung mit Ethanol (3.2.4.1)
- Abnehmen des 70%igen Ethanols des Waschschriffs unter der Sterilwerkbank
- Pellet unter der Sterilwerkbank trocknen (ca. 30 min) und in 100 µl sterilem PBS lösen
- Abnehmen von 5 µl DNS-Lösung zur Durchführung einer photometrischen Konzentrationsbestimmung sowie einer semiquantitativen Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3.2)
- 20 µg DNS werden zur Elektroporation eingesetzt

Vorgehensweise Elektroporation:

- 30 min vor der Elektroporation EF-Medium aus 10 (Pde6h-Konstrukt) bzw. 4 (Kcnv2-Konstrukt) feederbeschichteten 55 cm²-Petrischalen absaugen und durch je 9 ml ES-LIF-Medium ersetzen; Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ bis nach der Elektroporation
- 20 µg pIC Cre-DNS in x µl PBS in sterilem Kryotube vorlegen
- Zugabe der in PBS resuspendierten Zellen (s.o., Gesamtvolumen 900 µl), mischen
- Elektroporationsküvette auf Eis vorkühlen und DNS-Zellsuspension mit gestopfter Pasteurpipette so hoch in die Küvette einfüllen, dass die Flüssigkeit nicht über die Metallplatten tritt.
- Zellsuspension bis zur Elektroporation auf Eis lagern
- Elektroporation (Gene Pulser II, BioRad):
Ladung: 500 µF
Spannung: 0,23 kV
Zeitkonstante T_{const} ablesen; T_{const}-Kontrolle mit 900 µl PBS sollte gleich sein
- Zellen in der Küvette für 5 min bei RT unter der Sterilwerkbank ruhen lassen
- In einem 15 ml-Falcon-Röhrchen 9,2 ml ES-LIF-Medium vorlegen
- Zellsuspension mit einer gestopften Pasteurpipette in das vorgelegte Medium überführen, gut resuspendieren
- Zellsuspension in folgenden Mengen auf die Petrischalen verteilen:
 - 1x Schale 1: 2 ml
 - 3x Schale 2: 1 ml
 - 3x Schale 3: 0,5 ml
 - 2x Schale 4: 0,25 ml
 - 1x Schale 5: 0,1 ml

Für das Pde6h-Konstrukt wurden alle oben genannten Verdünnungen hergestellt, für das Kcnv2-Konstrukt wurden nur jeweils ein Exemplar der Schalen 3 und 5 sowie zwei Exemplare der Schale 4 ausgesät. Die restlichen, nicht zum Aussäen verwendeten elektroporierten Zellen wurden entsorgt.

- Inkubation bei 37°C, 5% CO₂
- 48 h nach der Elektroporation Selektionsstart mit ES-LIF-Ganciclovir-Medium, täglich Mediumwechsel
- mikroskopische Kontrolle: nach ca. 1-2 Tagen beginnen die Zellklone mit NeoTK-Kassette abzusterben und ab dem 8. Selektionstag können überlebende Zellklone isoliert werden

3.3.5.7 Isolierung von ES-Zellklonen mit Gendeletion

Nach 7 Tagen der Kultivierung in Selektionsmedium konnten ab dem 8. Tag Zellklone mit optimaler Größe und geeignetem Aussehen mit einer 20 µl-Pipette unter mikroskopischer Kontrolle aus den Zellkulturschalen isoliert werden. Die Auswahl der Zellklone erfolgte hierbei nach denselben Gesichtspunkten wie im 1. Targeting, und auch die Vorgehensweisen zur Isolation und zum Splitten der Zellklone entsprachen den unter 3.3.5.3 beschriebenen Methoden. Bei diesen Schritten kam allerdings im Gegensatz zum 1. Targeting ES-LIF-Ganciclovir-Medium zum Einsatz.

3.3.5.8 Evaluation, Einfrieren und weitere Vervielfältigung der ES-Zellklone mit Gendeletion

Auch im 2. Targeting wurden die Stammzellklone 2-4 Tage nach der Isolation bezüglich Aussehen, Größe und Anzahl der Kolonien mikroskopisch beurteilt. Nach der Evaluation wurde eine Plattenkopie als Sicherungsplatte (Platte A) eingefroren, während die zweite Kopie nochmals gesplittet wurde, damit genügend DNS zur Analyse des Rekombinationsereignisses zur Verfügung stand (Platten B-D). Das Vorgehen hierbei entsprach mit Ausnahme der Verwendung von ES-LIF-Ganciclovir-Medium den im 1. Targeting angewendeten Methoden (3.3.5.4). Die ES-Zellen der Platten B-D wurden wie in 3.2.2.1 beschrieben lysiert und die DNS durch ethanolische Fällung isoliert. Mittels Restriktionsverdau und Southern Blot (3.2.10) oder PCR (3.2.8) konnten die einzelnen Zellklone schließlich untersucht werden.

3.3.5.9 Auftauen und Expansion von ES-Zellklonen mit Gendeletion

Die Sicherungsplatte A wurde nach erfolgter Identifizierung der gewünschten Zellklone wieder aufgetaut und die entsprechenden Klone erneut in Zellkultur genommen, um sie für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff bis zur Blastozysteninjektion vorzubereiten. Dazu wurden die Zellklone über 24-Loch- und 6-Loch-Platten bis auf zwei 25 cm²-Flaschen aufgezogen, das Vorgehen entsprach hierbei inklusive der „Expansion von 6-Loch auf 2x 25 cm²-Flaschen“ ohne Ausnahme dem unter 3.3.5.5 beschriebenen Protokoll.

3.3.5.10 Kryokonservierung

Die Herstellung von Gefrierstocks zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff erfolgte mit embryonalen Stammzellen aus jeweils einer 25 cm²-Flasche. Zudem wurden bei diesem Arbeitsschritt nochmals Zellen der 25 cm²-Flaschen zur DNS-Präparation ausgesät, damit die Zellklone vor der Blastozysteninjektion nochmals per Southern Blot oder PCR überprüft werden konnten.

Vorgehensweise:

- Medium absaugen
 - 2x Waschen mit 5 ml PBS
 - Zugabe von 1 ml 1x-Trypsin/EDTA
 - Inkubation im Brutschrank für 5 min bei 37°C
 - Resuspendieren, mikroskopische Kontrolle (runde Einzelzellen)
 - Zugabe von 4 ml ES-LIF-Medium, resuspendieren
 - Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon-Gefäß überführen
 - Zentrifugation 5 min, 1000 rpm; Überstand absaugen
 - Pellet resuspendieren in 5 ml ES-LIF-Medium
 - 1000 µl der Zellsuspension zur Gewinnung von Zellen zur DNS-Präparation abnehmen und in drei Reihen einer 96-Loch-Platte aussäen:
 - Je 30 µl der Zellsuspension in eine Vertiefung einer mit Feederzellen und ES-LIF-Medium vorbereiteten 96-Loch-Platte pipettieren
 - Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ bis das Medium gelb wird (ca. 4 Tage)
- Weiteres Vorgehen siehe 3.3.5.4 „Einfrieren der Zellen für die DNS-Präparation“
- Zentrifugation (5 min, 1000 rpm) der restlichen 4 ml Zellsuspension; Überstand absaugen
 - Pellet resuspendieren in 1 ml ES-Kryomedium
 - Überführen in ein 1,8 ml-Kryoröhrchen
 - Lagerung für 24 h bei -20°C
 - Danach Lagerung für 24 h bei -80°C
 - Dauerlagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C

3.3.6 Injektion genetisch veränderter Stammzellen in Blastozysten

Embryonale Stammzellen mit nachgewiesener homologer Rekombination beziehungsweise mit nachgewiesenem generellem oder konditionalem *knockout* können schließlich zur Generierung von *knockout*-Mäusen verwendet werden. Die entsprechenden Zellklone werden aufgetaut, in Blastozysten von Mäusen durch Mikroinjektion eingebracht und diese Blastozysten in Ammenmäuse reimplantiert (Abbildung 3.7). Die Blastozysteninjektionen und die Reimplantationen für das Pde6h-Konstrukt wurden im Karolinska Center for Transgene Technologies, Stockholm, unter Leitung von Prof. Dr. Johannes Wilbertz durchgeführt.

3.3.6.1 Blastozysteninjektion

Einige Tage vor der Injektion werden die dafür vorgesehenen ES-Zellen aus der Kryokonservierung aufgetaut und in verschiedenen Verdünnungen erneut in Zellkulturgefäße ausgesät. Am Tag der Blastozysteninjektion werden die Zellen aus demjenigen Gefäß, welches optimal gewachsene Klone enthält, trypsiniert sowie gewaschen, und stehen nach Aufnahme in ES-LIF-Medium zur Injektion zur Verfügung.

Die Gewinnung von Blastozysten erfolgt aus C57BL/6-Mäusen mit schwarzer Fellfarbe. Dazu werden abends C57BL/6-Weibchen mit C57BL/6-Männchen zusammengesetzt und am nächsten Tag wird auf erfolgte Kopulation durch Kontrolle des Vaginalpfropfs (*plug check*) überprüft. Bei Vorhandensein eines solchen Vaginalpfropfs wird dieser Zeitpunkt als Tag 0,5 *p.c.* festgelegt. An Tag 3,5 *p.c.* werden die Spenderweibchen durch Einleiten von CO₂ und anschließende zervikale Dislokation getötet, der Uterus explantiert und die Blastozysten aus den Uterushörnern herausgespült (Nagy 2003).

Die vereinzelt ES-Zellen werden mit Hilfe der Mikroinjektionstechnik in die isolierten Blastozysten eingebracht. Dazu werden unter mikroskopischer Kontrolle 10-20 Stammzellen in eine feine Injektionskapillare aufgenommen und in die über eine Haltepipette fixierte Blastozyste, deren innere Zellmasse der Injektionskanüle abgewendet ist, injiziert.

3.3.6.2 Embryotransfer in scheinchwangere Ammenmäuse

Im Anschluß an die Injektion werden jeweils 10-12 Blastozysten in eine pseudoschwangere Maus, die hormonell auf Schwangerschaft eingestellt ist aber keine eigenen Embryonen trägt, reimplantiert. Diese Tiere generiert man durch Verpaarung mit vasktomierten Männchen. Zur Reimplantation werden die pseudoschwangeren Weibchen am Tag 2,5 *p.c.* narkotisiert, der Uterus durch einen Schnitt am Rücken freigelegt und etwas unterhalb des Ovidukts wird mit einer feinen Kanüle ein Loch in den Uterus gemacht. Durch dieses Loch werden dann über die Transferkapillare 10-12 injizierte Blastozysten in das Uterushorn eingebracht. 17 Tage nach der Reimplantation werden die Nachkommen geboren. Da die Wirtsblastozysten (C57BL/6, schwarz) und die embryonalen Stammzellen (129/SV, agouti) unterschiedliche Gene, die für die Fellfarbe codieren, tragen, kann die erfolgreiche Integration der ES-Zellen-Erbinformation in das Blastozystengenom anhand der Fellfarbe der resultierenden Chimären beurteilt werden. Ein hoher Chimarismus liegt dann vor, wenn mehr als 50% des Haarkleides agoutifarben sind.

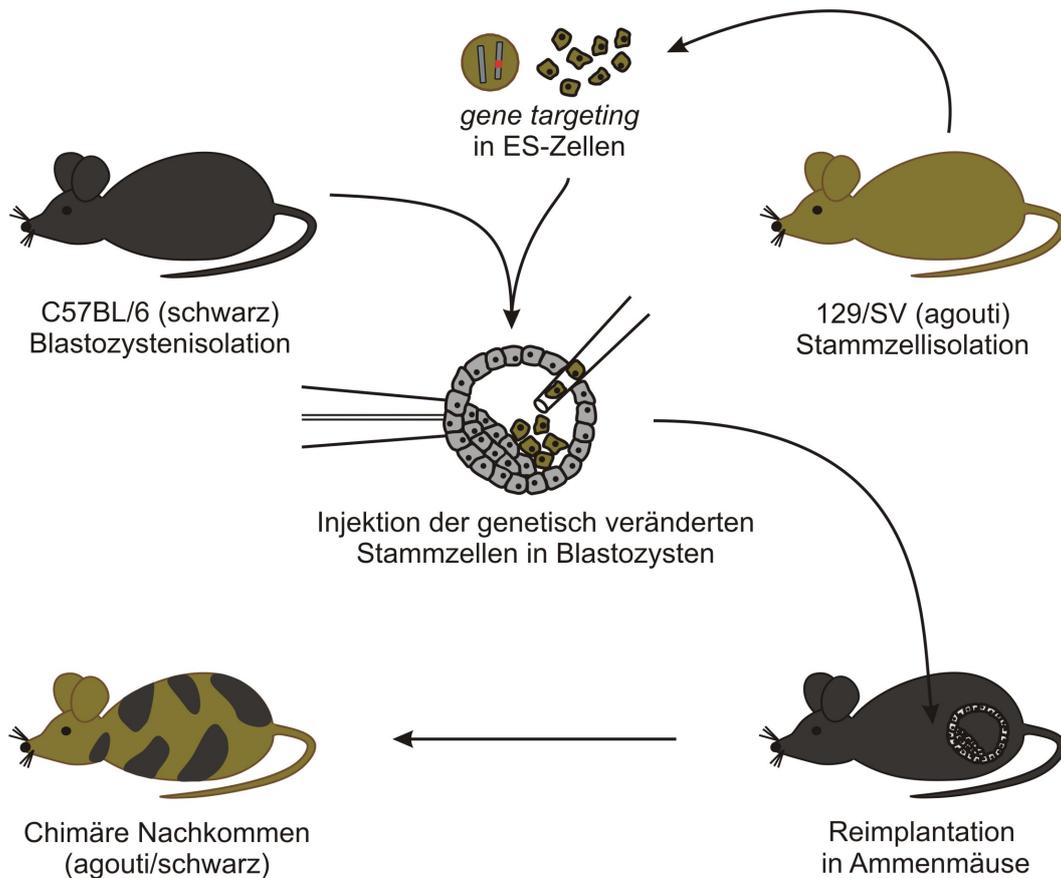


Abbildung 3.7: Blastozysteninjektion zur Generierung von Chimären

3.4 Zucht gentechnisch veränderter Mäuse

3.4.1 Allgemeines zur Zucht der Mäuse

Alle Tiere werden im S1-Bereich gemäß den tierschutzrechtlichen Vorschriften gehalten und haben freien Zugang zu Futter und Wasser. Zur Zucht kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz: Entweder erfolgte eine stationäre Verpaarung von einem Männchen mit ein bis zwei Weibchen, oder Männchen und Weibchen wurden abends zusammen in einen Käfig gesetzt, am nächsten Morgen wurde auf erfolgte Kopulation durch *plug check* geprüft, das Weibchen entfernt und abends ein neues Weibchen in den Käfig gesetzt. Bei dieser Methode wurde jeweils nach 3-4 Tagen Verpaarung eine Ruhepause von mindestens 3 Tagen zur Regeneration eingeschoben.

3.4.2 Testung der Chimären auf Keimbahngängigkeit

Zur Etablierung einer genetisch veränderten Mauslinie muss das über die embryonalen Stammzellen eingebrachte mutierte Allel der Chimäre an die Nachkommen weiter vererbt werden. Die genetisch modifizierten ES-Zellen müssen also zur Bildung der Keimzellen der

Chimäre beitragen, was auch als Keimbahngängigkeit bezeichnet wird. Um diese Keimbahngängigkeit zu überprüfen, wurden männliche Chimären mit möglichst hohem Anteil an agouti-farbenem Fell mit schwarzen C57BL/6 Weibchen verpaart. Da agouti dominant über schwarz vererbt wird, erbringen braune Nachkommen den Nachweis, dass eine Keimbahngängigkeit eingetreten ist - die Nachkommen müssen auf Grund der Fellfarbe ein Allel der genetisch manipulierten ES-Zellen besitzen. Bei Nachkommen mit schwarzer Fellfarbe ist folglich keine Keimbahngängigkeit zu verzeichnen. Da zur Blastozysteninjektion heterozygot mutierte ES-Zellen verwendet wurden, musste bei den Nachkommen mit brauner Fellfarbe zusätzlich mittels PCR analysiert werden, ob bezüglich der eingeführten genetischen Veränderung das wildtyp oder das mutierte Allel von der Chimäre weitergegeben wurde (Abbildung 3.8). Bei Vorhandensein des mutierten Allels konnte mit dieser Maus der F1-Generation schließlich die *knockout*-Mauslinie etabliert werden.

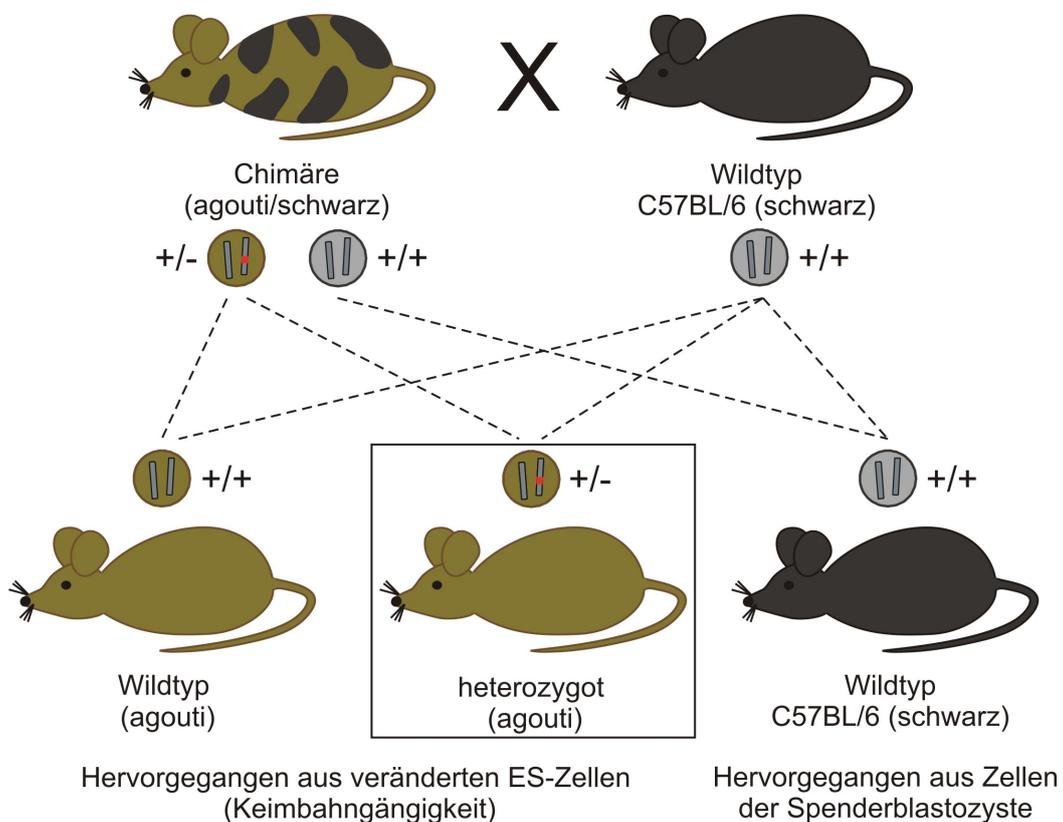


Abbildung 3.8: Testung der Chimären auf Keimbahngängigkeit

3.4.3 Etablierung von *knockout*-Mauslinien

Durch Verpaarung heterozygot mutationstragender Tiere untereinander können letztendlich in der F2-Generation homozygot mutierte Mäuse bzw. homozygote *knockout*-Mäuse generiert werden. Die Vererbung folgt hierbei den Mendelschen Gesetzen, so dass bei einer Verpaarung von zwei heterozygoten Tieren rechnerisch 25% homozygot mutierte

Nachkommen, 25% wildtyp-Nachkommen sowie 50% heterozygot mutierte Nachkommen resultieren (Abbildung 3.9).

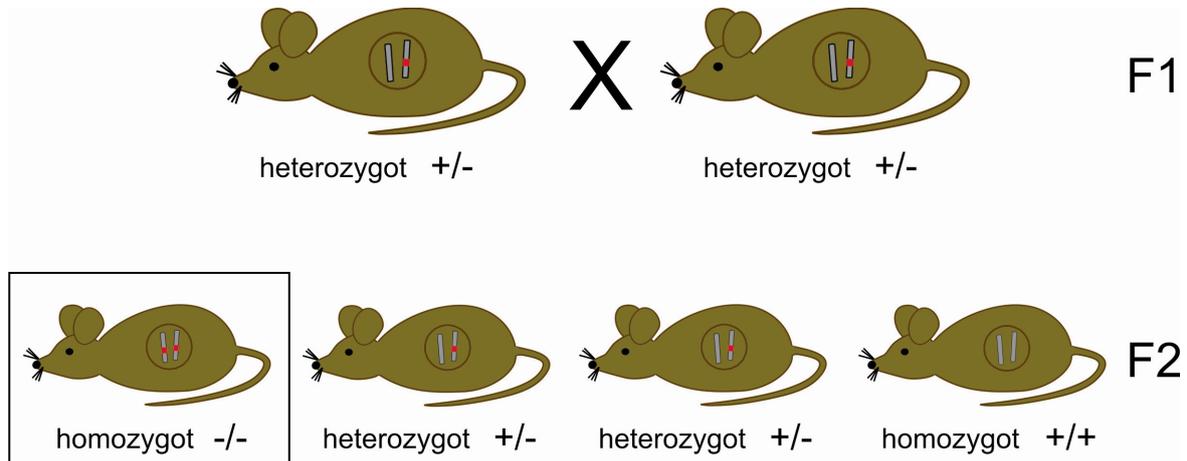


Abbildung 3.9: Etablierung der *knockout*-Linie

3.4.4 Gendeletion durch Einkreuzen von „Cre-Deleter“-Mäusen

Alternativ zur direkten Generierung von *knockout*-Mäusen durch Verpaarung von L1-Chimären mit wildtyp-Mäusen und der weiteren Verpaarung der heterozygot mutierten Nachkommen kann die Mauslinie auch indirekt durch Verpaarung von heterozygot mutierten L3- oder L2-Mäusen mit transgenen CMV-„Cre-Deleter“-Mäusen erfolgen. Diese Mauslinie besitzt die Eigenschaft, die Cre-Rekombinase ubiquitär schon während der frühen Embryogenese unter dem CMV-Promotor zu exprimieren und erlaubt somit die Deletion von DNS-Abschnitten zwischen zwei oder mehr loxP-Erkennungssequenzen *in vivo*. Der Level der Cre-Expression im CMV-„Cre-Deleter“-Stamm ist stabil und so stark, dass grundsätzlich eine komplette Deletion aller DNS-Abschnitte zwischen den Erkennungssequenzen in allen Körperzellen erfolgt (Schwenk et al. 1995). Das Resultat ist also eine aus einer L3- oder L2-heterozygot mutierten Maus durch Verpaarung generierte Maus mit heterozygotem konstitutivem *knockout* (L1), welche in diesem Stadium zusätzlich das Transgen der Cre-Rekombinase trägt. Durch weitere Verpaarung dieser Tiere mit wildtyp-Mäusen kann das Transgen wieder ausgekreuzt und die resultierenden heterozygot mutierten L1-Mäuse weiter zur Etablierung der Mauslinie verpaart werden (Abbildung 3.10). Die CMV-„Cre-Deleter“-Mäuse (BALB/c-Tg(CMV-Cre)1Cgn) wurden freundlicherweise von Prof. Freichel, Homburg (Saar), zur Verfügung gestellt.

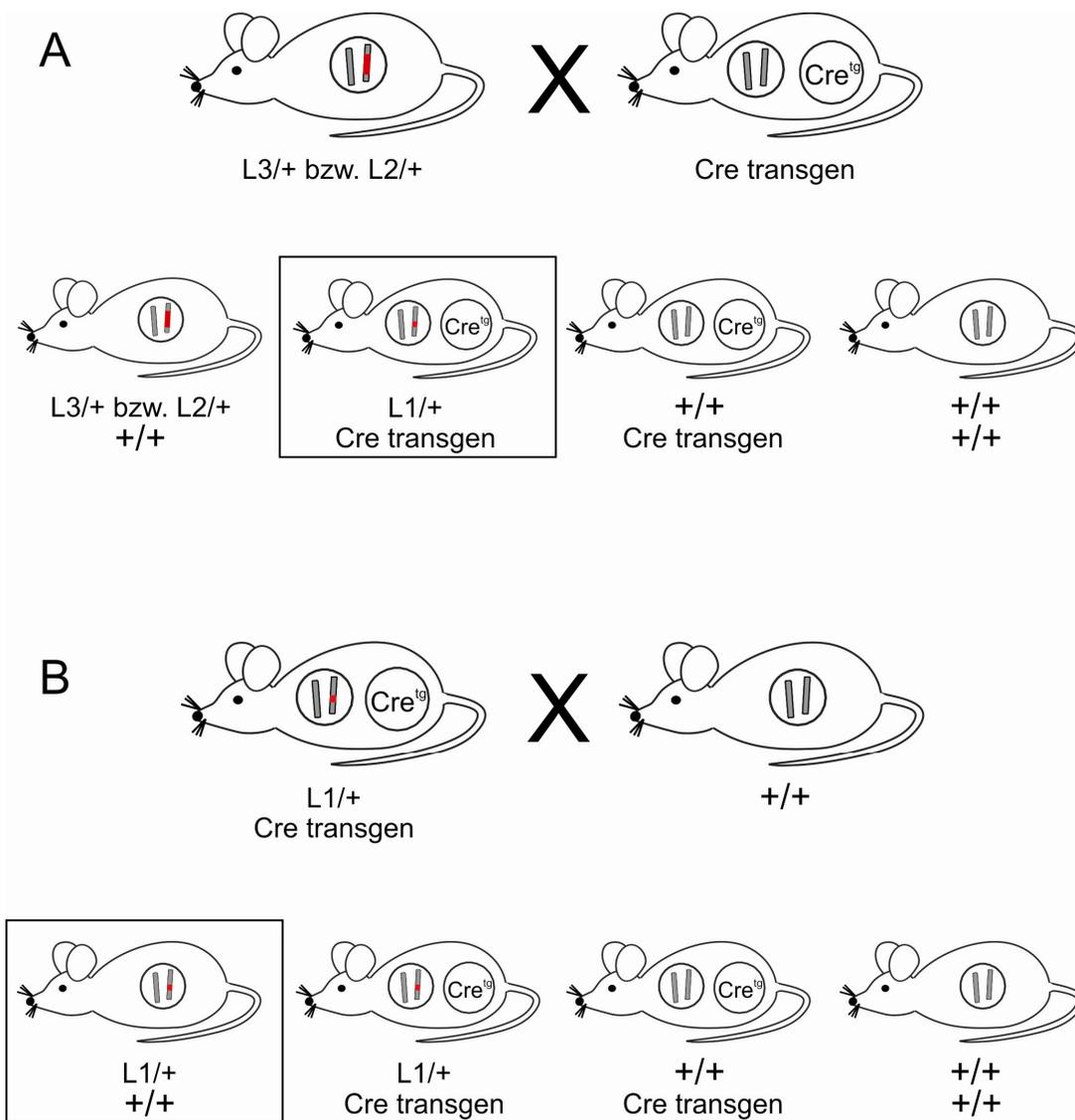


Abbildung 3.10: Gendeletion durch Einkreuzen von „Cre-Deleter“-Mäusen

(A) Einkreuzen des Cre-Transgens. Durch Verpaarung von heterozygot mutierten L3- oder L2-Mäusen mit „Cre-Deleter“-Mäusen werden DNS-Abschnitte zwischen loxP-Erkennungssequenzen *in vivo* deletiert. Nachkommen mit Gendeletion tragen zusätzlich das Cre-Transgen, welches durch Verpaarung mit wildtyp-Mäusen wieder ausgekreuzt wird. (B) Auskreuzen des Cre-Transgens. Die Verpaarung Cre-transgener und gleichzeitig heterozygoter *knockout*-Tiere mit wildtyp-Mäusen resultiert u.a. in Mäusen mit heterozygotem konstitutivem *knockout* ohne Cre-Transgen.

3.4.5 Genotypisierung mittels PCR

Zur Analyse des Genotyps der Mäuse, die aus den verschiedenen Verpaarungen resultieren, wurden entsprechende Genotypisierungs-PCR-Protokolle etabliert. Die Mäuse wurden im Alter von ca. 4 Wochen mit einem Ohrclip gekennzeichnet, gleichzeitig wurde eine Schwanzbiopsie entnommen und die DNS aus dieser Probe isoliert (3.2.2.2). Ein Aliquot der DNS-Lösung diente dann als Matrize für die entsprechenden PCR-Analysen. Die Genotypisierungs-PCR-Protokolle kamen zudem zum Screening der ES-Zellklone nach dem 2. Targeting zum Einsatz. Nach der Amplifikation erfolgte die Auftrennung der gebildeten Fragmente über ein 2%iges Agarosegel und die Auswertung der Bandenmuster.

3.4.5.1 L1/L2-Genotypisierungs-PCR für Pde6h

Die Strategie dieser Genotypisierungs-PCR beruht darauf, dass mit einem Gemisch aus drei Primern abhängig vom jeweils vorliegenden Genotyp der DNS unterschiedlich lange Fragmente gebildet werden. Mit dieser Methode können L1-, L2- und wildtyp-Allel des Pde6h-Konstrukts unterschieden werden (Abbildung 3.11).

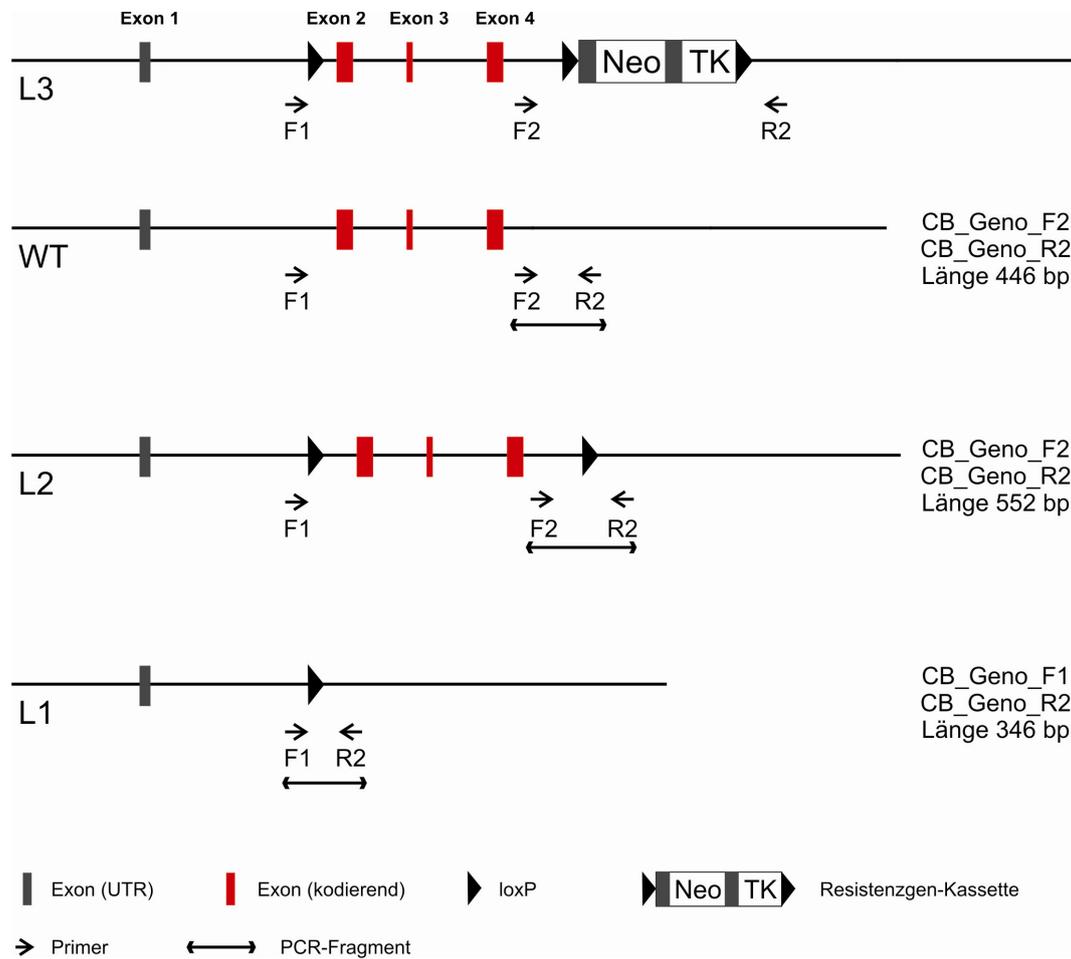


Abbildung 3.11: Genotypisierungs-PCR für Pde6h L1 und L2

Schematische Darstellung der Lage der Primer und der PCR-Produkte. Die Größenverhältnisse sind nicht maßstabsgerecht dargestellt.

Die PCR-Ansätze wurden nach unten stehendem Schema in 0,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und nach Protokoll amplifiziert.

Ansatz L1/L2-Genotypisierungs-PCR Pde6h		
Substanz	Menge	Endkonzentration
10x-PCR-Puffer	5 µl	1x
dNTPs (je 10 mM)	1 µl	0,2 mM
CB_Geno_F1 (20 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol
CB_Geno_F2 (20 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol
CB_Geno_R2 (20 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol
Taq-Polymerase	0,2 µl	1 U
Template	5 µl	
Wasser	ad 50 µl	

Protokoll L1/L2-Genotypisierungs-PCR Pde6h		
Temperatur	Zeit	Zyklus
94°C	3 min	Initiale Denaturierung
94°C	1 min	Denaturierung
57,1°C	30 sec	Annealing
72°C	30 sec	Elongation
72°C	5 min	Finale Elongation
10°C	unbegrenzt	Kühlung

30 Zyklen

3.4.5.2 L3-Genotypisierungs-PCR für Pde6h

Auch in diesem Fall wurde ein Gemisch aus drei Primern verwendet, um L3-Allel und wildtyp-Allel auf Grund der Länge der gebildeten Fragmente unterscheiden zu können (Abbildung 3.12).

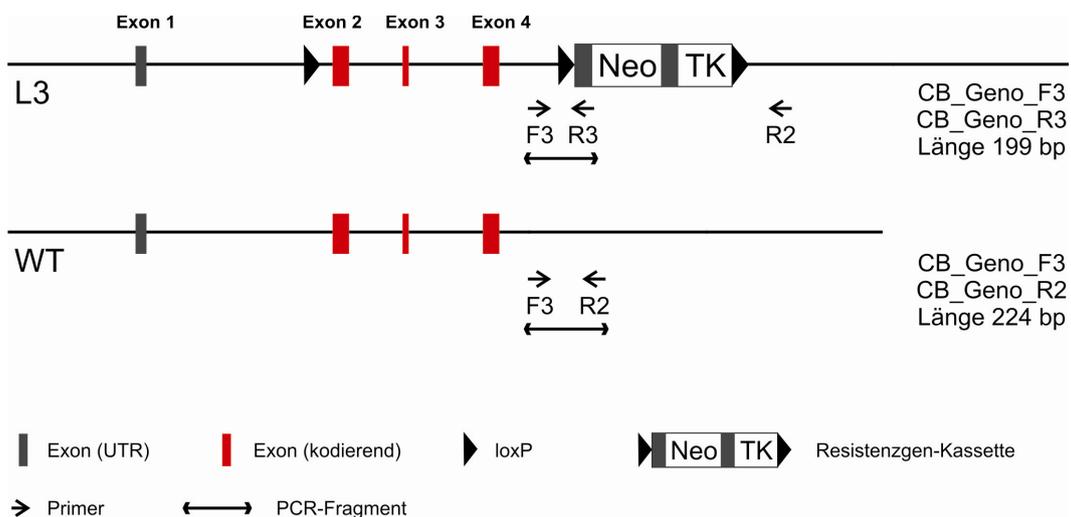


Abbildung 3.12: Genotypisierungs-PCR für Pde6h L3

Schematische Darstellung der Lage der Primer und der PCR-Produkte. Die Größenverhältnisse sind nicht maßstabsgerecht dargestellt.

Die PCR-Ansätze wurden nach unten stehendem Schema in 0,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und nach Protokoll amplifiziert.

Ansatz L3-Genotypisierungs-PCR Pde6h		
Substanz	Menge	Endkonzentration
10x-PCR-Puffer	5 µl	1x
dNTPs (je 10 mM)	1 µl	0,2 mM
CB_Geno_F3 (20 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol
CB_Geno_R2 (20 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol
CB_Geno_R3 (20 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol
Taq-Polymerase	0,2 µl	1 U
Template	5 µl	
Wasser	ad 50 µl	

Protokoll L3-Genotypisierungs-PCR Pde6h		
Temperatur	Zeit	Zyklus
94°C	3 min	Initiale Denaturierung
94°C	1 min	Denaturierung
49°C	30 sec	Annealing
72°C	30 sec	Elongation
72°C	5 min	Finale Elongation
10°C	unbegrenzt	Kühlung

30 Zyklen

3.4.5.3 Cre-Genotypisierungs-PCR

Zur Genotypisierung der Nachkommen der Verpaarungen mit CMV-, „Cre-Deleter“-Mäusen und deren Auskreuzungen kam ein PCR-Protokoll mit zwei Primern zur Anwendung. Wenn hierbei ein Amplikon gebildet wird, liegt das Cre-Transgen heterozygot vor; wenn kein Signal zu detektieren ist, handelt es sich nicht um Cre-transgene Tiere. Die Primersequenzen hierfür wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Freichel, Homburg (Saar), zur Verfügung gestellt und das PCR-Protokoll wurde mittels Gradienten-PCR etabliert.

Zur Genotypisierung wurden die PCR-Ansätze nach unten stehendem Schema in 0,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend amplifiziert.

Ansatz Cre-Genotypisierungs-PCR		
Substanz	Menge	Endkonzentration
10x-PCR-Puffer	5 µl	1x
dNTPs (je 10 mM)	1 µl	0,2 mM
CB_CRE_1 (20 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol
CB_CRE_2 (20 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol
Taq-Polymerase	0,2 µl	1 U
Template	2 µl	
Wasser	ad 50 µl	

Zur Amplifizierung wurde dasselbe Protokoll wie für die L1/L2-Genotypisierungs-PCR des Pde6h-Konstrukts verwendet (3.4.5.1).

3.4.5.4 Genotypisierungs-PCR für Kcnv2

Mit Hilfe eines Gemischs aus vier Primern können bei diesem PCR-Protokoll nach demselben Prinzip wie bei der Pde6h-Genotypisierung das Kcnv2-L1-, L2- und das wildtyp-Allel durch Bildung verschieden großer Fragmente detektiert werden (Abbildung 3.13).

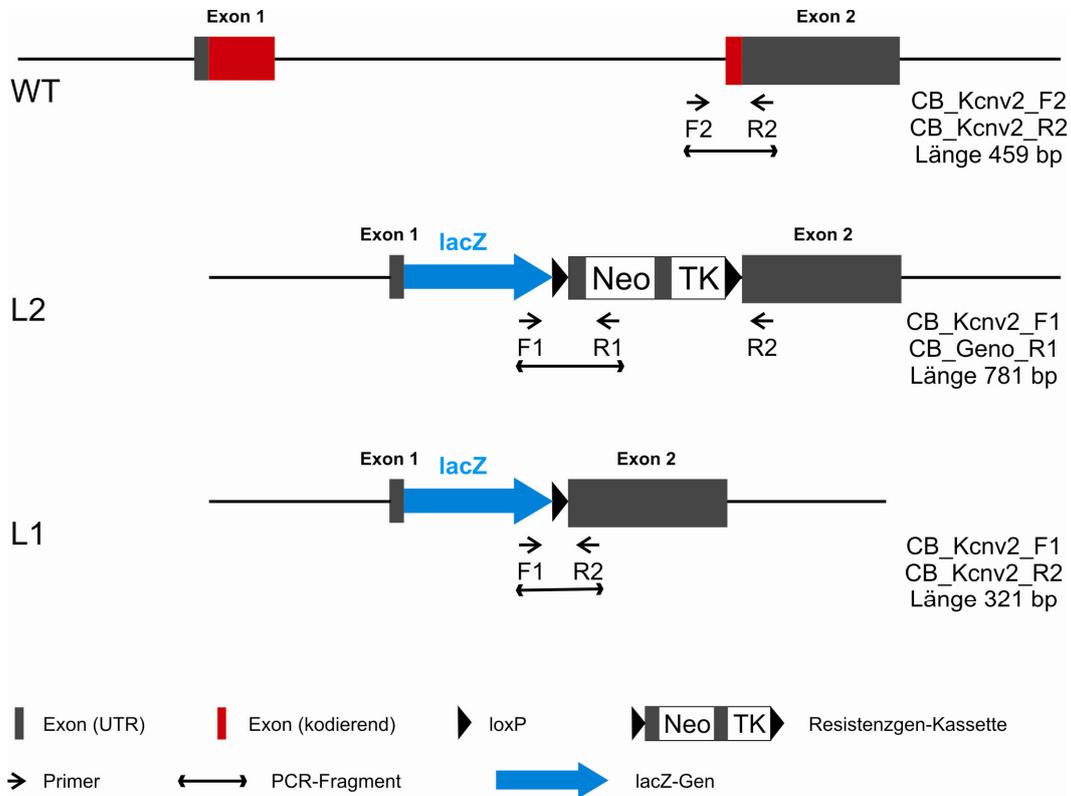


Abbildung 3.13: Genotypisierungs-PCR für Kcnv2

Schematische Darstellung der Lage der Primer und der PCR-Produkte. Die Größenverhältnisse sind nicht maßstabsgerecht dargestellt.

Die PCR-Ansätze wurden nach unten stehendem Schema in 0,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend amplifiziert.

Ansatz Genotypisierungs-PCR Kcnv2		
Substanz	Menge	Endkonzentration
10x-PCR-Puffer	5 µl	1x
dNTPs (je 10 mM)	1 µl	0,2 mM
CB_KCNV2_F1 (20 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol
CB_Geno_R1 (20 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol
CB_KCNV2_F2 (20 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol
CB_KCNV2_R2 (20 pmol/µl)	1 µl	0,4 pmol
Taq-Polymerase	0,2 µl	1 U
Template	5 µl	
Wasser	ad 50 µl	

Zur Amplifizierung kam dasselbe Protokoll wie für die L1/L2-Genotypisierungs-PCR des Pde6h-Konstrukts zur Anwendung (3.4.5.1).

3.5 Methoden zur Herstellung von Antikörpern

3.5.1 PeptidAuswahl und –synthese

Zur Herstellung eines polyklonalen Anti-Peptid-Antikörpers wurde zunächst die Sequenz des Zielproteins analysiert und dabei ein für dieses Protein möglichst spezifischer Bereich ausgewählt, welcher eine geringe Homologie zu verwandten Proteinen, aber hohe antigene Strukturen aufweist. Die Sequenzhomologie wurde hierbei mit Hilfe der BLAST-Funktion (*Basic Local Alignment Search Tool*) des NCBI-Servers (*National Center for Biotechnology Information*) analysiert und die Epitope wurden mittels der IEDB (*Immune Epitope Database*) *Antibody Epitope Prediction* ermittelt. Das gewählte Peptid wurde von Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert und an KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanine*), ein Carrierprotein zur Erhöhung der Immunogenizität, gekoppelt.

3.5.2 Antikörperproduktion in Kaninchen

Die Immunisierung von Kaninchen mit dem an KLH gekoppelten Peptid erfolgte bei Eurogentec (Seraing, Belgien) über 87 Tage nach dem firmeninternen 3-Monat-Standard-Protokoll (siehe Tabelle 3.2). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Serum-Proben entnommen, welche durch Immunfluoreszenz-Färbungen auf Spezifität geprüft wurden.

Tabelle 3.2: Immunisierungsprogramm zur Antikörperproduktion

87-Tage Immunisierungs-Programm							
Tag	0	21	31	49	59	77	87
Injektion	1.	2.	-	3.		4.	-
Serum Proben-entnahme	Präimmun-serum	-	1. Test-serum	-	2. Test-serum		Aus-blutung

Die Immunisierungen erfolgten zu allen Immunisierungszeitpunkten nach demselben Schema: am Rücken rechts und links der Wirbelsäule wurden an 7-10 Injektionspunkten pro Seite jeweils 50 µl der Antigen-Suspension *intradermal* injiziert und der Rest der Suspension wurde auf beiden Seiten *intramuskulär* in den *musculus gluteus maximus* appliziert. Für die erste Immunisierung wurde komplettes Freundesches Adjuvans verwendet, bei allen weiteren Immunisierungen kam inkomplettes Freundesches Adjuvans zum Einsatz. An Tag 87 wurden die Kaninchen getötet und die Seren durch Ausbluten gewonnen.

4 Ergebnisse I (Pde6h-knockout)

4.1 Entwicklung der *knockout*-Strategie

4.1.1 Erstellung einer Gen-Karte

Zur Generierung des Pde6h-*knockout*-Mausmodells wurde zunächst das Targeting-Konstrukt, welches die gewünschten Veränderungen des Zielgens trägt, mittels molekularbiologischer Methoden hergestellt. Im ersten Planungsschritt wurde hierfür die Genarchitektur des Pde6h-Gens der Maus mit seiner Umgebung durch Datenbankrecherche (NCBI, *National Center for Biotechnology Information* und *Ensembl Genome Browser*) analysiert. Das Gen befindet sich auf Chromosom 6, erstreckt sich über einen Bereich von 8961 Basenpaaren und besteht aus 4 Exonen (Abbildung 4.1). Die *messenger*-RNS besitzt eine Länge von 558 bp, und das von den kodierenden Bereichen der Exone 2-4 abgeleitete Protein setzt sich aus 83 Aminosäuren zusammen. Durch virtuelle Restriktionsanalyse der DNS-Sequenz des Pde6h-Gens und seiner Umgebung mit Hilfe des NEBcutters V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) wurden für die Generierung des Targeting-Vektors und die Nachweise der homologen Rekombination günstig gelegene Restriktionsschnittstellen identifiziert und daraus die *knockout*-Strategie entwickelt.

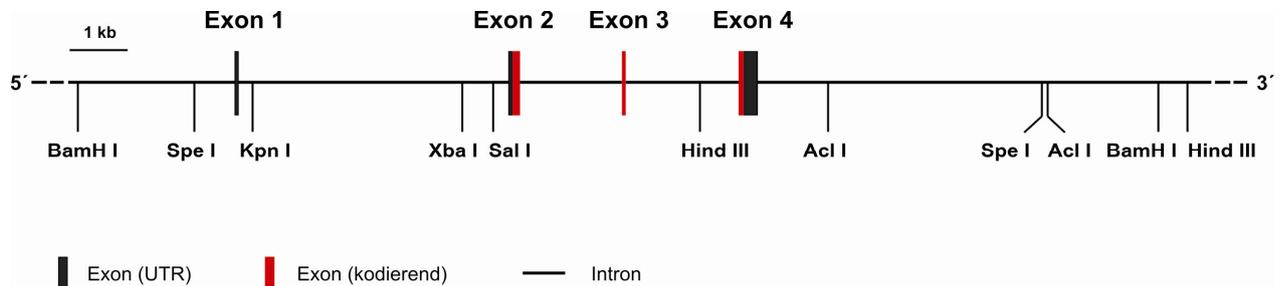


Abbildung 4.1: Pde6h-Genarchitektur

Maßstabgetreue Darstellung des Pde6h-Gens der Maus mit den Exonen, farblicher Markierung der kodierenden Bereiche sowie den in der *knockout*-Strategie verwendeten Restriktionsschnittstellen.

4.1.2 *knockout*-Strategie

Ziel der *knockout*-Strategie ist, das gewählte Gen strukturell so zu beeinträchtigen, dass die Bildung eines funktionsfähigen Proteins nicht mehr möglich ist. Auf Grund der geringen Größe des Pde6h-Gens bot sich zur Ausschaltung der Funktionalität die Deletion des gesamten proteincodierenden Bereichs (Exone zwei bis vier) an. Die hierfür verwendete *knockout*-Strategie beruhte auf der Herstellung eines Targeting-Konstruktes mit den unter 1.4.2.2 beschriebenen Eigenschaften. Die 5'- und 3'-homologen Bereiche sollten die Aufnahme des Konstrukts an gewünschter Stelle ins Genom durch *crossing over* gewährleisten und die NeoTK-Resistenzgenkassette ermöglichte eine Positivselektion im ersten Targeting sowie eine Negativselektion im zweiten Targeting. Da sowohl Mäuse mit

generellem als auch mit konditionalem *Pde6h-knockout* erzeugt werden sollten, kam eine Strategie mit insgesamt drei loxP-Erkennungssequenzen zum Einsatz. Die auszuschaltenden Exone wurden sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung von je einer loxP-Sequenz flankiert, sodass das *Pde6h*-Gen in der Maus durch Verpaarung (Abbildung 6.2) zeit- oder gewebespezifisch deletiert werden kann.

Zur Klonierung des Targeting-Konstrukts stand ein Vektor auf Basis des pBluescript® II KS-Plasmids zur Verfügung, der die NeoTK-Resistenzgenkassette, flankiert von zwei loxP-Sequenzen, sowie vier singuläre Restriktionsschnittstellen für weitere Klonierungen trägt (Abbildung 4.2; Bezeichnung dieses *knockout*-Basisvektors: pBSloxPNeoTKloxP).

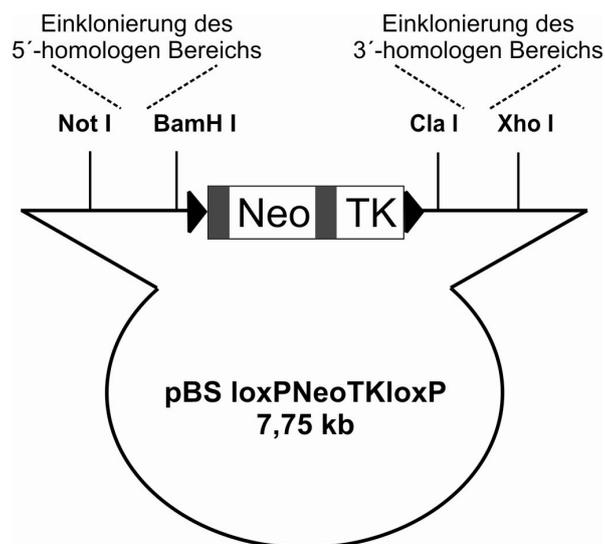


Abbildung 4.2: *knockout*-Basisvektor

In diesen Basisvektor mussten dann die 5'- und 3'-homologen Bereiche (auch langer und kurzer homologer Arm genannt) mit den zu deletierenden Exonen sowie der dritten loxP-Erkennungssequenz über die singulären Restriktionsschnittstellen eingebracht werden. Zu diesem Zweck wurden in der Umgebung des *Pde6h*-Gens befindliche Restriktionsschnittstellen ausgewählt, mit deren Hilfe dann die Homologie-Regionen aus einem BAC, dessen Insert das murine *Pde6h*-Gen mit Umgebung beinhaltet, gewonnen wurden. Für den Einbau einer singulären loxP-Erkennungssequenz im Intronbereich wurden ebenfalls Schnittstellen ausgewählt und das entsprechende Fragment mittels PCR unter Verwendung von BAC-DNS als Template amplifiziert, wobei die loxP-Sequenz und eine Spe I-Restriktionsschnittstelle durch das Primerdesign eingebracht wurden. Abbildung 4.3 zeigt das *Pde6h*-Gen mit den für die Klonierung des Targeting-Konstrukts verwendeten Restriktionsschnittstellen zusammen mit den geplanten Veränderungen.

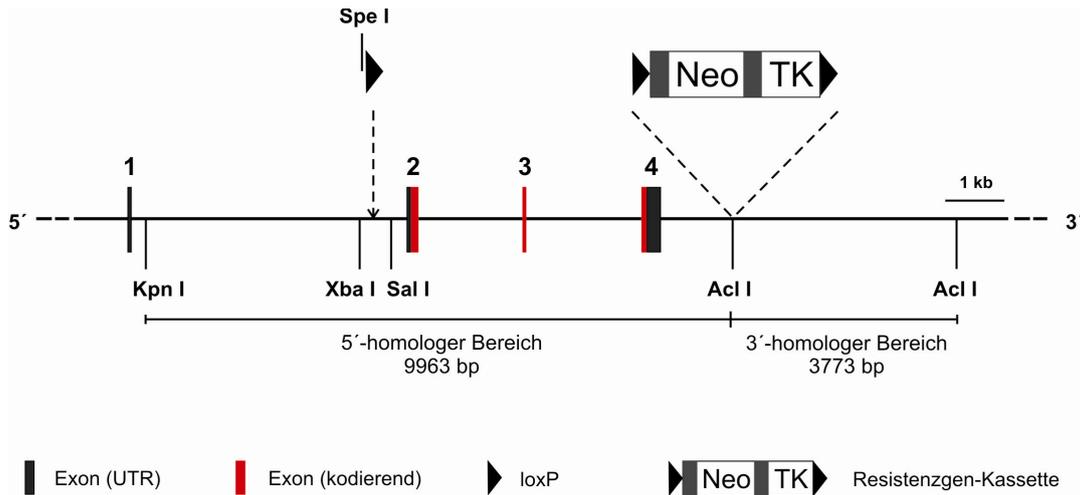


Abbildung 4.3: Pde6h-knockout-Strategie

Dargestellt ist das Pde6h-Gen mit den zur Generierung des Targeting-Konstrukts geplanten Veränderungen. Die homologen Bereiche gewährleisten die Aufnahme des Konstrukts an der richtigen Stelle des Zielgens. Die kodierenden Exone werden zur Deletion mittels Cre-Rekombinase von zwei loxP-Erkennungssequenzen flankiert. Die NeoTK-Resistenzgenkassette dient zur Selektion rekombinanter Stammzellen im 1. und 2. Targeting und kann ebenfalls durch die Cre-Rekombinase entfernt werden.

Die homologen Bereiche, die die Aufnahme des Konstrukts ins Genom gewährleisten sollen, schließen sich direkt an die NeoTK-Kassette an. Der lange Arm der homologen Rekombination beinhaltet die singuläre loxP-Sequenz, die im Wildtypgenom nicht vorkommende Spe I-Schnittstelle im Intronbereich zwischen Exon eins und Exon zwei sowie die Exone zwei bis vier und wurde in 5'-Richtung der Kassette eingefügt. Die Länge des gesamten langen Arms, der von den Schnittstellen Kpn I bis Acl I reicht, beträgt 9,96 kb. Die artifizell eingebaute Spe I-Schnittstelle dient im 1. Targeting zur Unterscheidung zwischen wildtyp-Klonen und Zellen mit homologer Rekombination auf der 5'-Seite. In 3'-Richtung der NeoTK-Kassette folgt der kurze Arm der homologen Rekombination mit einer Länge von 3,77 kb, begrenzt durch Acl I-Schnittstellen auf beiden Seiten. Eine Gegenüberstellung der Architektur des Pde6h-knockout-Konstrukts und eines Pde6h-wildtyp-Allels ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

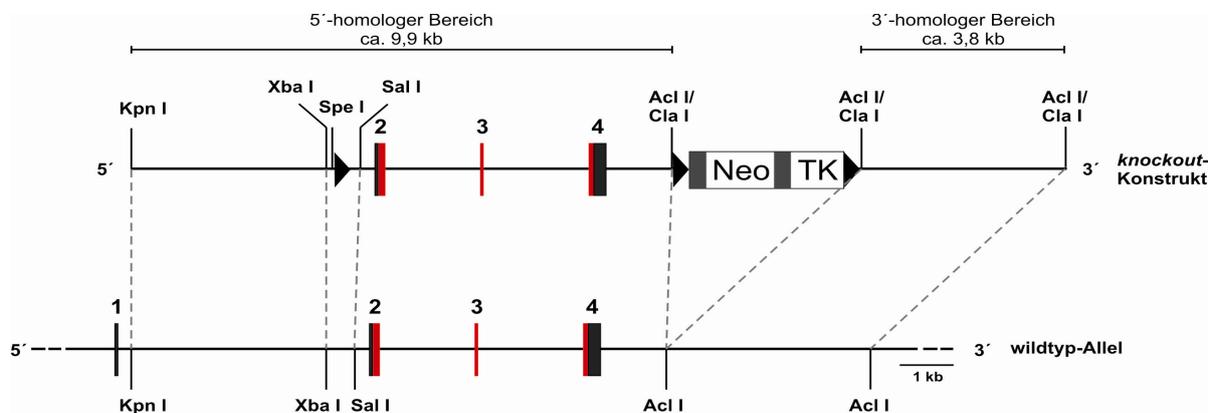


Abbildung 4.4: Aufbau des Pde6h-knockout-Konstrukts

Da im *knockout*-Basisvektor nur die Schnittstellen Not I und BamH I zur Einklonierung des 5'-homologen Bereiches bzw. Cla I und Xho I zur Einklonierung des 3'-homologen Bereiches zur Verfügung standen und die gewählten DNS-Bereiche des langen und des kurzen Arms nicht direkt mit diesen Enzymen aus dem BAC gewonnen werden konnten, mussten die Fragmente zunächst in Hilfsvektoren subkloniert werden. Es handelt sich hierbei um Standard-Klonierungsvektoren, welche durch Modifizierung der *multiple cloning site* (siehe 3.2.6.3) die erforderlichen Schnittstellen in der gewünschten Reihenfolge beinhalten. Nach Subklonierung der BAC-Fragmente konnten diese dann mit den entsprechenden Enzymen aus den Hilfsvektoren wieder ausgeschnitten, in weiteren Klonierungsschritten zusammengefügt und die fertigen homologen Bereiche in den *knockout*-Basisvektor einkloniert werden. Die einzelnen Klonierungsschritte sind unter 4.2 näher erläutert.

4.1.3 Nachweise der homologen Rekombination

Nach dem 1. Targeting mussten unter den isolierten Zellklonen diejenigen identifiziert werden, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Nachweise beruhen darauf, dass durch Verdau der ES-Zell-DNS mit einem bestimmten Restriktionsenzym am Zielgenort unterschiedliche Fragmentgrößen entstehen abhängig davon, ob ein wildtyp-Zellklon oder ein Zellklon mit homologer Rekombination vorliegt. Durch die Aufnahme des *knockout*-Konstrukts ins Genom der ES-Zellen wird eine weitere Schnittstelle des entsprechenden Enzyms eingebaut, sodass bei korrekter Integration eine Verkürzung des Fragments auftritt. Diese Fragmente können dann durch Hybridisierung mit einer spezifisch an diesen DNS-Bereich bindende Sonde nachgewiesen werden. Bei der Entwicklung dieser Nachweisstrategie gab es mehrere Dinge zu beachten. Die gewählten, durch Restriktionsverdau entstehenden Fragmente der wildtyp- und der homolog rekombinierten DNS mussten durch eine klassische Agarose-Gelelektrophorese gut trennbar sein, ein Längenunterschied von mindestens 1-2 kb bei einer maximalen Fragmentlänge von ca. 12-15 kb sollte also eingehalten werden. Die Schnittstellen wurden so gewählt, dass die eine Schnittstelle innerhalb und die andere außerhalb des rekombinanten Bereichs liegt. Nur so konnte nachgewiesen werden, dass das Konstrukt auch an der richtigen Stelle integriert wurde. Die Sonden sollten zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse ebenfalls außerhalb des rekombinanten Bereichs binden, da interne Sonden immer, also auch bei zufälliger Integration des Konstrukts, ein Signal ergeben würden. Zum Erreichen einer möglichst hohen Spezifität wurden Sonden einer Länge von 100 bis 1000 bp ausgewählt, der Bindungsbereich mit Hilfe des *online*-Programms „Repeat Masker“ (<http://www.repeatmasker.org>) auf repetitive Sequenzen hin überprüft und die in Frage kommenden Sonden an wildtyp-DNS getestet (siehe 4.3).

4.1.3.1 5'-Nachweis der homologen Rekombination

Der Nachweis der homologen Rekombination auf der 5'-Seite wurde mit dem Restriktionsenzym Spe I geplant. Im Wildtyp ergibt sich hierbei ein Fragment der Länge 14,7 kb, welches mit der 5'-Sonde detektiert werden kann. Die Sonde bindet außerhalb des rekombinanten Bereichs zwischen den Schnittstellen Spe I und Kpn I. Beim Einbau der singulären loxP-Schnittstelle wurde zusätzlich eine weitere Spe I-Erkennungssequenz

eingbracht, sodass mit der gewählten Sonde nach homologer Rekombination auf der 5'-Seite ein Fragment der Länge 4,7 kb detektiert werden kann.

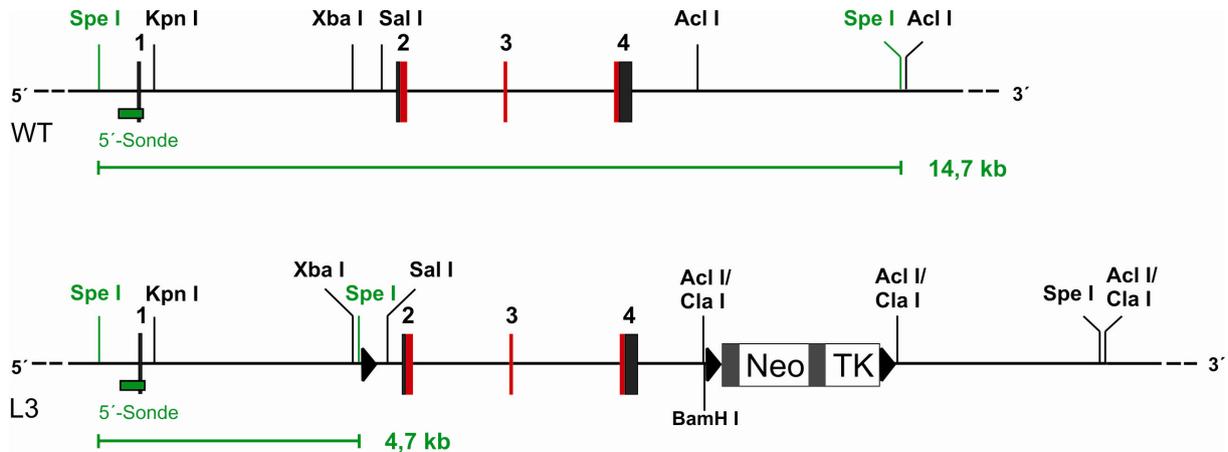


Abbildung 4.5: Nachweis der homologen Rekombination auf der 5'-Seite

Dargestellt ist die Genarchitektur eines wildtyp-Allels (WT) im Vergleich zu einem homolog rekombinierten Allel (L3). Durch Einbau einer Spe I-Schnittstelle ins Targeting-Konstrukt verkürzt sich das Spe I-Fragment von 14,7 kb auf 4,7 kb.

4.1.3.2 3'-Nachweis der homologen Rekombination

Die homologe Rekombination auf der 3'-Seite sollte mit Hind III überprüft werden. Der Nachweis beruht ebenfalls auf dem Prinzip der Fragmentverkürzung von 8,4 kb im Wildtyp auf 6,2 kb nach homologer Rekombination, da in der NeoTK-Kassette eine weitere Hind III-Erkennungssequenz vorhanden ist. Auch hier liegt die 3'-Sonde außerhalb des rekombinanten Bereichs zwischen den Schnittstellen Acl I und Hind III.

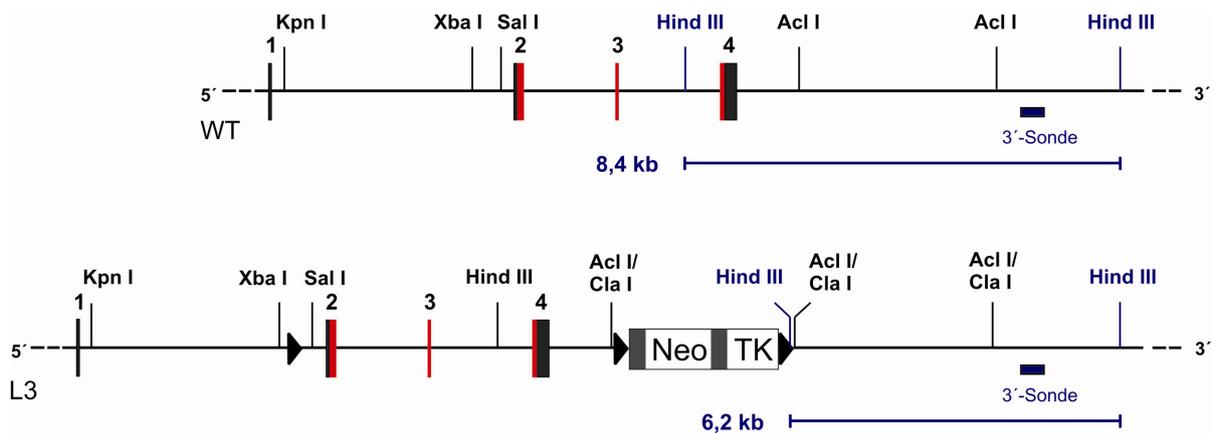


Abbildung 4.6: Nachweis der homologen Rekombination auf der 3'-Seite

Dargestellt ist die Genarchitektur eines wildtyp-Allels (WT) im Vergleich zu einem homolog rekombinierten Allel (L3). Durch das Vorhandensein einer Hind III-Schnittstelle in der NeoTK-Resistenzkassette verkürzt sich das Hind III-Fragment von 8,4 kb auf 6,2 kb.

4.1.3.3 Nachweis der Einfachintegration

Zusätzlich zur korrekten Integration sollte weiterhin überprüft werden, ob das *knockout*-Konstrukt wie erwünscht nur einmalig an der richtigen Stelle ins Genom der ES-Zellen aufgenommen wurde oder ob eine Mehrfachintegration an verschiedenen Orten stattgefunden hat. Hierfür kam die Neo-Sonde zum Einsatz, welche spezifisch an einen Sequenzbereich des Neo-Resistenzgens bindet. Nach Restriktionsverdau der DNS mit BamH I ergibt sich bei Einfachintegration ein Fragment der Länge 10,4 kb. Falls eine Mehrfachintegration stattgefunden hat müsste ein weiteres Fragment anderer Größe zu detektieren sein, da anzunehmen ist, dass die BamH I-Schnittstelle außerhalb des Konstrukts mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an anderer Stelle zu finden ist. Zellklone mit Mehrfachintegration sind zu vermeiden, da in diesem Fall der Phänotyp der *knockout*-Maus nicht mehr eindeutig dem *knockout* zuzuordnen ist, sondern durch die zufällige Integration des Konstrukts an anderer Stelle hervorgerufen oder zumindest beeinflusst werden könnte.

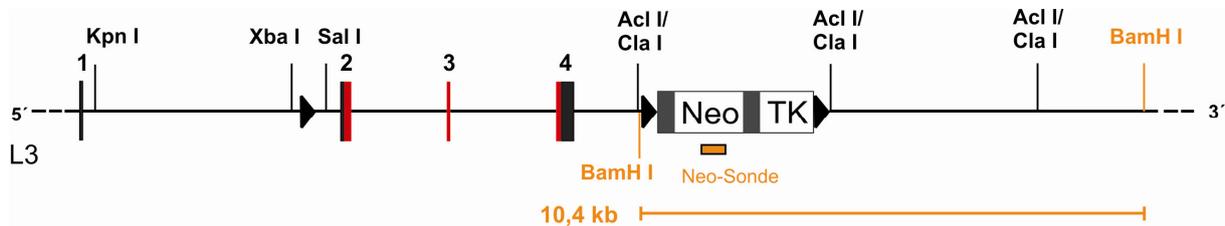


Abbildung 4.7: Nachweis der Einfachintegration

Dargestellt ist die Genarchitektur eines homolog rekombinierten Allels (L3). Das BamH I-Fragment mit 10,4 kb würde sich bei Mehrfachintegration entweder verkürzen oder verlängern, so dass mehrere Banden sichtbar würden.

4.1.4 Nachweis der Cre-Rekombination

Nach dem 2. Targeting mussten die isolierten Zellklone auf die Art der Cre-Rekombination hin überprüft werden. Nach der Transfektion wurden DNS-Abschnitte zwischen loxP-Erkennungssequenzen deletiert und durch Behandlung mit Ganciclovir Zellklone ohne NeoTK-Kassette selektiert. Somit sollten zwei Rekombinationsereignisse zu verzeichnen sein: der konstitutive *knockout* (L1) sowie der konditionale *knockout* (L2). Diese Zelltypen können ebenfalls durch die Wahl eines geeigneten Restriktionsenzym und Southern-Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde voneinander unterschieden werden. Mit dem Restriktionsenzym BamH I und der 3'-Sonde des 1. Targetings ergibt sich im Wildtyp ein Signal von 18,8 kb, welches auf 13,0 kb bei L1-Klonen bzw. auf 6,0 kb bei L2-Klonen verkürzt wird.

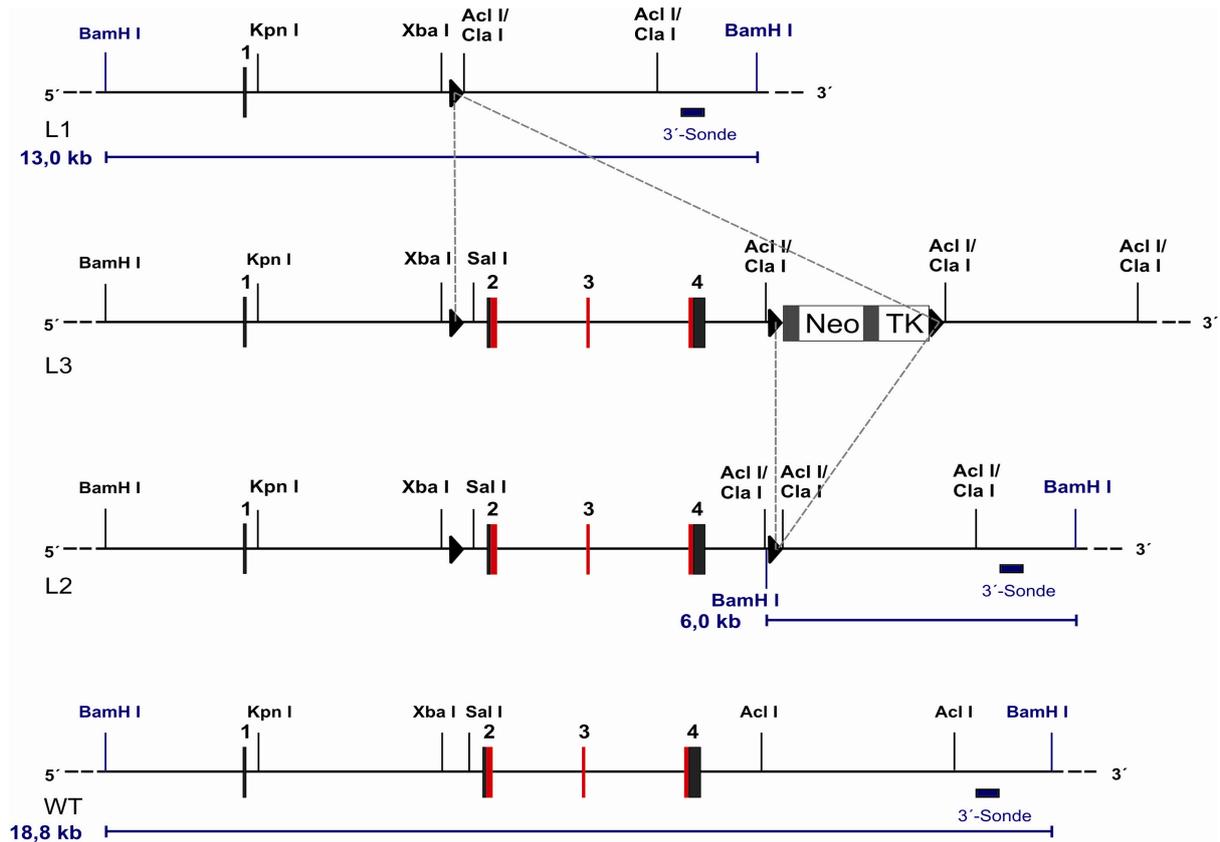


Abbildung 4.8: Nachweis der Cre-Rekombination im 2. Targeting

Im oberen Teil der Abbildung ist die Genarchitektur eines Allels mit konstitutivem *knockout* (L1) und eines Allels mit konditionalem *knockout* (L2) im Vergleich zu einem homolog rekombinierten Allel (L3) dargestellt. Im unteren Teil ist die Genarchitektur eines wildtyp-Allels (WT) dargestellt. Mit BamH I und der 3'-Sonde aus dem 1. Targeting können die entsprechenden Zellklone identifiziert werden: es ergibt sich im Wildtyp ein Fragment von 18,8 kb, welches sich auf 13,0 kb im konstitutiven *knockout* bzw. auf 6,0 kb im konditionalen *knockout* verkürzt.

4.2 Klonierung des Targeting-Konstrukts

4.2.1 BAC-Bibliothek-Analyse

Zur Herstellung des Targeting-Vektors mussten zunächst die verschiedenen Fragmente der homologen Bereiche aus genomischer Maus-DNS gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurde eine Maus-BAC-DNS-Bibliothek bei Imagenes (früher RZPD, Berlin) bestellt. Hierbei war zu beachten, dass die zur Herstellung der BACs verwendete genomische DNS denselben genetischen Hintergrund besitzt wie die in der ES-Zellkultur verwendeten R1-Stammzellen, nämlich 129/SV, damit eine möglichst hohe Übereinstimmung der homologen Bereiche mit den Zielgenbereichen erreicht wird. In der vorliegenden Arbeit kam die Bibliothek „*Mouse BAC (REG) Library No. 124*“ zum Einsatz. Eine solche BAC-Bibliothek beinhaltet das gesamte Genom des gewählten Mäusestamms: die genomische DNS wird durch Restriktionsverdau in relativ große Fragmente zerlegt und diese anschließend in BACs kloniert. Diese BAC-Bibliothek wurde zunächst als „*primary pool*“ in einer 96-Lochplatte geliefert, wobei in jeder Vertiefung eine Mischung an BACs mit verschiedenen Inserts zu finden ist. Diese Bibliothek wurde dann mit Hilfe einer PCR, die mit den Primern CB_F3 und

CB_R3 über Exon 4 spezifisch das Pde6h-Gen detektiert, gescreent. Bei mehreren Vertiefungen konnten Fragmente der richtigen Größe amplifiziert werden, und korrespondierend zu einer dieser Vertiefung wurde dann der „*secondary pool*“ „REG_B124PP40“ bestellt. Dieser besteht ebenfalls aus einer 96-Loch-Platte, die mit demselben PCR-Protokoll gescreent wurde. Auf dieser Platte ist die BAC-Mischung der im „*primary pool*“ positiven Vertiefung nun weiter nach einem bestimmten System ausgeeinzelnt, liegt aber immer noch als Mischung vor. In diesem PCR-Screening zeigten drei Vertiefungen ein Fragment der richtigen Größe, so dass anhand der Koordinaten dieser Vertiefungen ein einzelner BAC-Klon identifiziert werden konnte. Dieser Klon „REG_B124E01315Q2“, der den gewünschten DNS-Bereich mit dem Pde6h-Gen beinhalten sollte, wurde bei Imagenes bestellt. Nach der Durchführung von BAC-Präparationen wurde durch Ansequenzierung mit den Standardprimern SP6 und T7 die Insertgröße bestimmt und der Abschnitt der im Insert vorhandenen genomischen DNS durch Sequenzvergleiche mit einer genomischen DNS-Maus-Datenbank bestimmt. Die Länge des Inserts betrug 168,9 kb, und es beinhaltete unter anderem das gesamte Pde6h-Gen mit Umgebung. Der identifizierte BAC-Klon konnte also zur Klonierung der Homologie-Bereiche der *knockout*-Strategie verwendet werden.

4.2.2 Herstellung von Hilfsvektoren

Die Homologie-Bereiche des *knockout*-Konstrukts konnten aus mehreren Gründen nicht direkt in den *knockout*-Basisvektor inkloniert werden. Zum einen standen in letzterem die erforderlichen Schnittstellen gar nicht bzw. nicht in der richtigen Reihenfolge zur Verfügung, zum anderen waren die DNS-Ausbeuten der BAC-Präparationen sehr gering. Durch Subklonierung der entsprechenden Fragmente in *high-copy* Plasmide konnte hingegen eine größere Menge an DNS gewonnen werden, und durch den Einbau von zusätzlichen Restriktionsschnittstellen in diese *high-copy* Plasmide konnten die einzelnen Fragmente dann in der gewünschten Reihenfolge zusammengebaut und komplett in den *knockout*-Basisvektor inkloniert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt drei solcher „Hilfsvektoren“ (HV), also *high-copy* Plasmide mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen, generiert. Der erfolgreiche Einbau der erforderlichen Schnittstellen wurde dabei durch Sequenzierung geprüft.

Hilfsvektor 1 (HV1) basiert auf einem pSP72-Grundgerüst und sollte zur Generierung des 5'-Teils des langen Arms der homologen Rekombination verwendet werden. Für diese Klonierungsschritte waren die Schnittstellen Not I, Kpn I, Xba I und Sal I in dieser Reihenfolge erforderlich. Über die EcoR I- und die Kpn I-Schnittstelle wurde pSP72 geöffnet und durch den Adapter Not I an der richtigen Stelle eingebracht (Abbildung 4.9).

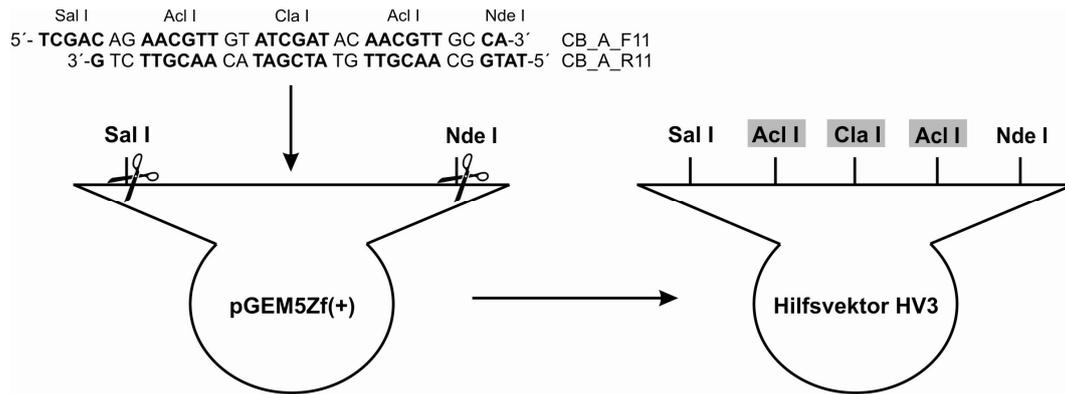


Abbildung 4.11: Herstellung des Hilfsvektors HV3

4.2.3 Konstruktion des Targeting-Vektors

4.2.3.1 5'-Homologer Bereich („Langer Arm“)

Der lange Arm der homologen Rekombination konnte auf Grund der bereits erwähnten Schnittstellenproblematik sowie des erforderlichen Einbaus einer zusätzlichen loxP-Erkennungssequenz nicht direkt in den *knockout*-Basisvektor inkloniert werden, sondern musste in insgesamt 7 Klonierungsschritten in verschiedenen Hilfsvektoren zusammengefügt werden.

Subklonierung der BAC-Fragmente (Hilfsfragment 1 und 2):

Das erste Ziel war, alle erforderlichen homologen Bereiche aus dem BAC in *high copy*-Plasmiden subzuklonieren, damit genug Fragment-DNS für weitere Schritte zur Verfügung stand. Da sich die Klonierung von BAC-Fragmenten in selbst durch Linearisierung und Dephosphorylierung vorbereitete Plasmide als schwierig erwies, wurden kommerziell erhältliche, schon mit einem Restriktionsenzym geschnittene und fertig dephosphorylierte pUC19-Plasmide verwendet. Durch diese Strategie war die Auswahl an zur Verfügung stehenden Restriktionsenzymen allerdings begrenzt, weshalb hierfür zunächst größere Hilfsfragmente aus dem BAC gewonnen werden mussten, die die gewünschten Homologie-Bereiche beinhalteten (Abbildung 4.12). Im ersten Schritt wurde die BAC-DNS mit Xba I bzw. Sal I verdaut und der gesamte Ansatz über CHROMA SPINTM-Säulen aufgereinigt. Im zweiten Schritt wurde jeweils diese aufgereinigte Fragmentmischung dann mit dem entsprechenden pUC19-Vektor ligiert. Nach Transformation und Plasmidpräparation mit anschließender Restriktionsanalyse konnten die jeweils das gesuchte Plasmid tragenden Klone identifiziert werden.

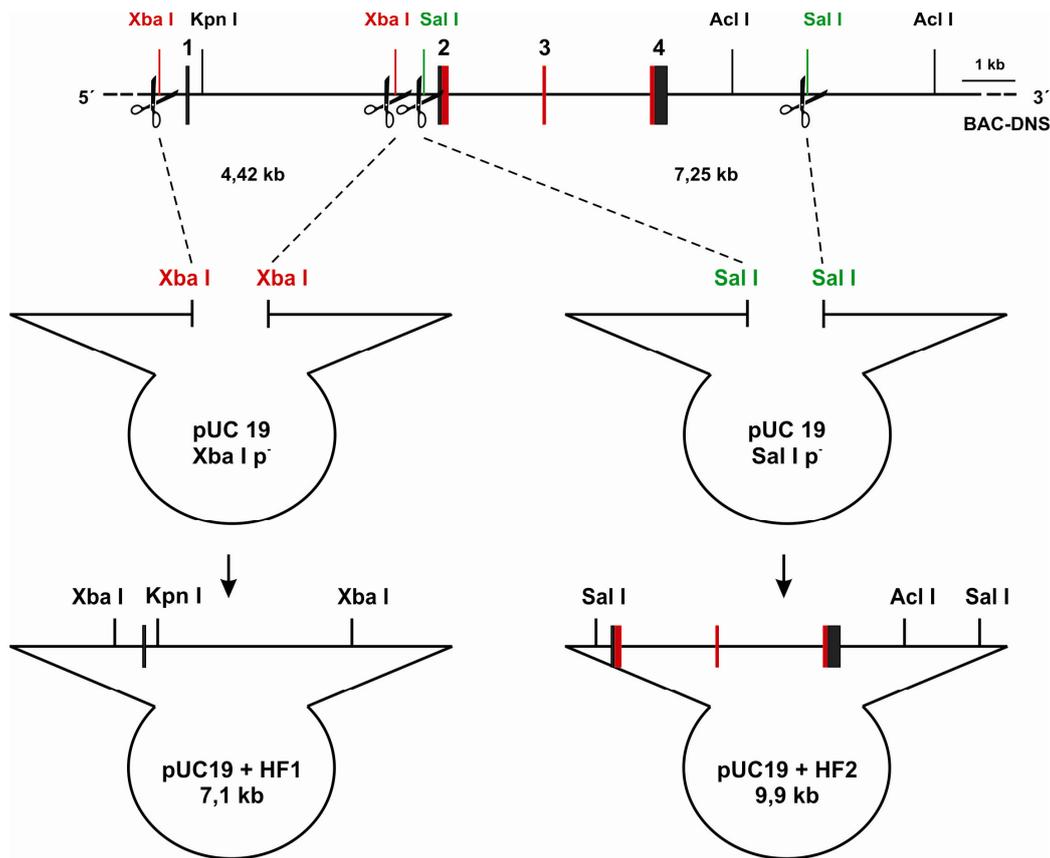


Abbildung 4.12: Klonierung der BAC-Fragmente

Der den 5'-Bereich des langen Arms beinhaltende Abschnitt wurde durch Restriktionsverdau mit Xba I aus dem BAC gewonnen und dieses Hilfsfragment 1 (HF1) in das pUC19-Plasmid über Xba I einkloniert (links). Der Abschnitt des BAC, der den 3'-Bereich des langen Arms mit den kodierenden Exonen trägt, wurde durch Restriktionsverdau mit Sal I gewonnen, und dieses zweite Hilfsfragment (HF2) wurde über Sal I mit den pUC19-Vektor ligiert (rechts).

Gewinnung der homologen Bereiche aus den BAC-Fragmenten (Fragmente 1 und 3):

Aus diesen beiden Plasmiden pUC19 + HF1 und pUC19 + HF2 wurden dann die eigentlichen homologen Bereiche des langen Arms (Fragment F1 und Fragment F3) weiter in die unter 4.2.2 beschriebenen Hilfsvektoren subkloniert. Für die Gewinnung des 5'-homologen Bereichs von Kpn I bis Xba I (F1) wurde pUC19 + HF1 mit diesen Enzymen in einem Doppelverdau aufgeschnitten und der Ansatz über eine CHROMA SPINTM-Säule aufgereinigt. Der Hilfsvektor HV1 wurde ebenfalls in einem Doppelverdau mit Kpn I und Xba I geöffnet, anschließend dephosphoryliert, über eine CHROMA SPINTM-Säule gereinigt und mit Fragment F1 ligiert. Die Subklonierung des 3'- Bereichs des langen Arms (F3) erfolgte nach demselben Schema über Sal I und Acl I. Da Acl I und Cla I dieselben Überhänge produzieren, war es möglich, diesen Abschnitt in den mit Sal I und Cla I geöffneten Hilfsvektor HV2 einzubauen.

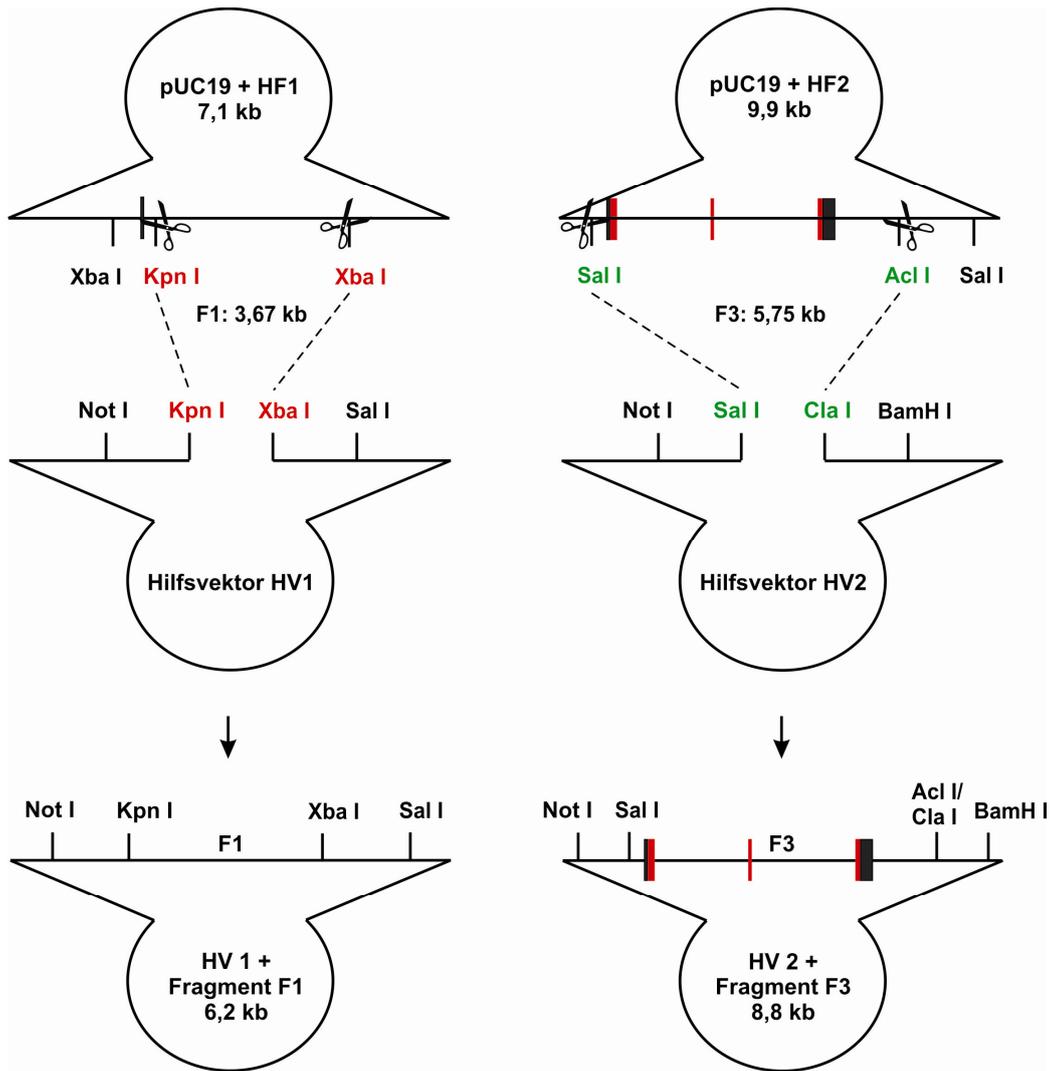


Abbildung 4.13: Subklonierung der homologen Bereiche des langen Arms

Der linke Teil der Abbildung zeigt schematisch die Klonierung von Fragment F1 in Hilfsvektor HV1; rechts ist der Einbau von Fragment F3 in Hilfsvektor HV2 dargestellt.

Generierung und Subklonierung des PCR-Fragments (Fragment 2):

Fragment F2 des langen Arms befindet sich im fertigen *knockout*-Konstrukt in 5'-Richtung der kodierenden Exone. Es erstreckt sich über den Bereich zwischen den Schnittstellen Xba I und Sal I und soll die singuläre loxP-Erkennungssequenz sowie eine zusätzliche Spe I-Schnittstelle beinhalten. Um diese Modifikationen in das Konstrukt einzufügen, wurde ein insgesamt 589 bp großes Stück mittels PCR mit BAC-DNS als Template amplifiziert und die erforderlichen Veränderungen über das Vorwärtsprimer-Design eingebracht. Hierbei schließt sich im Primer CB_F4 direkt an die native Xba I-Erkennungssequenz die Spe I- sowie eine loxP-Sequenz in der erforderlichen Orientierung an, die restlichen zum Template homologen Basen dienen der Bindung des Primers an die BAC-DNS. Der Rückwärtsprimer CB_R4 beinhaltet die native Sal I-Erkennungssequenz sowie zur Bindung ans Template einige weitere Basen in 5'-Richtung der Schnittstelle und begrenzt somit das Amplikon in 3'-Richtung (Abbildung 4.14).

Native Sequenz Xba I - Sal I:

```

      Xba I
1  TCTAGA AATG CTTGTGTCCA GATGGCCATG TTACCACCCT CAGACCTGAT
51 TGAAGTCTCT GAGTTAATTG AGGATTTAGC AAAGAATGGA AAAGAAGAAG
101 AGTACATTGT GGAAAATATC TTTTGGAGGT GGGCTAGTCT GTAGCTGAAT
151 GAAGAATATA GTTTCAAATC TGTACAAATA TTATAATCAT AGCTTTCAGA
201 TAATTTCCCT CCTTTTCCTG GGATTCCATT CAGAGGAAAT ATAATAATTA
251 AATATTGGAT TGTTTTGGGG GGGCATATAC CTAGATTTTT TTTTAGACAA
301 GGATTCATGT ATTTGAAACT GACCTCAAAC TAACTGTATA GCCAAGGACG
351 ACCTTGAAAT TTCAGATCCT CTGCATCTAT CAGTTCAGTG TGTAGATTAC
401 AGGTATGCAC AATCAGGCCT GATTTTTCAG TGCTGGGAAT TGAAGTCAGG
451 TCTTTGTATG TGCTGGGCAA ACACGTACC AACTGAGCTA TTGCCCAACC
501 CTCATATCTA ATTGTTTTAT TTTCAAATC TTTTAGTCGA C
      Sal I

```

Sequenz des PCR-Fragments:

```

      Xba I   Spe I           loxP-Sequenz
1  GTCAC TCTAG AACTAGTATA ACTTCGTATA ATGTATGCTA TACGAAGTTA CB_F4
51 TAATGCTTGT GTCCAGATGG CCATGTTACC ACCCTCAGAC CTGATTGAAG
101 TCTCTGAGTT AATTGAGGAT TTAGCAAAGA ATGGAAAAGA AGAAGAGTAC
151 ATTGTGGAAA ATATCTTTTG GAGGTGGGCT AGTCTGTAGC TGAATGAAGA
201 ATATAGTTTC AAATCTGTAC AAATATTATA ATCATAGCTT TCAGATAAAT
251 TCCCTCCTTT TCCTGGGATT CCATTCAGAG GAAATATAAT AATTAATAT
301 TGGATTGTTT TGGGGGGGCA TATACCTAGA TTTTTTTTTT GACAAGGATT
351 CATGTATTTG AAACCTGACCT CAACTAACT GTATAGCCAA GGACGACCTT
401 GAAATTTTCA ATCCTCTGCA TCTATCAGTT CAGTGTGTAG ATTACAGGTA
451 TGCACAATCA GGCCTGATTT TTCAGTGCTG GGAATTGAAC TCAGGTCTTT
501 GTATGTGCTG GGCAAACACT GTACCAACTG AGCTATTGCC CAACCCTCAT
551 ATCTAATTGT TTTATTTTCA AAATCTTTTA GTCGACAAA CB_R4
      Sal I

```

Abbildung 4.14: Generierung des PCR-Fragments

(A) Original-Sequenz des Xba I – Sal I Fragments, die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind farblich hinterlegt. (B) Sequenz des mittels PCR generierten Fragments mit loxP-Erkennungssequenz (grau hinterlegt) und den verwendeten Primern (unterstrichen).

Auf Grund der geringeren Fehlerrate der Pfx-Polymerase wurde die PCR mit diesem Enzym durchgeführt, das Amplikon über Gelelektrophorese aufgereinigt, in den pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] subkloniert und komplett durch Sequenzierung auf die Abwesenheit von Fehlern kontrolliert.

Zusammenbau des langen Arms der homologen Rekombination:

Das PCR-Fragment wurde mit Xba I und Sal I aus dem pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] wieder ausgeschnitten, über eine CHROMA SPINTM-Säule aufgereinigt und in den nach demselben Prinzip vorbereiteten und dephosphorylierten Hilfsvektor 1 mit Fragment F1 (HV1 + Fragment F1) einkloniert (Abbildung 4.15). Anschließend wurde zur Komplettierung des langen Arms aus diesem Vektor (HV1 + F1 + F2) der Bereich von Not I bis Sal I (Fragment F1 + PCR-Fragment) wiederum ausgeschnitten, über Gelelektrophorese isoliert, gereinigt und in den dephosphorylierten Vektor HV2 + Fragment F3 einkloniert (Abbildung 4.16). Somit liegt der gesamte lange Arm flankiert von Not I und BamH I im Hilfsvektor HV2 (HV2 + LA) vor und kann über diese Schnittstellen in den *knockout*-Basisvektor eingebracht werden.

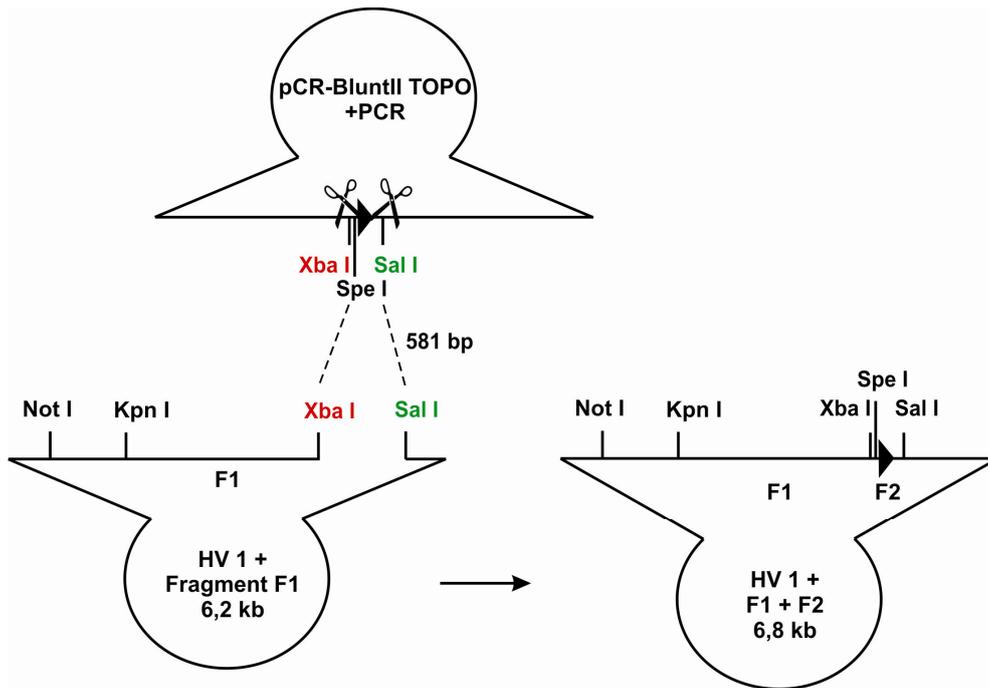


Abbildung 4.15: Einbau des PCR-Fragments in Hilfsvektor HV1 + Fragment F1

Das PCR-Fragment aus pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] wurde über Xba I und Sal I in den Hilfsvektor HV1 mit Fragment F1 einkloniert.

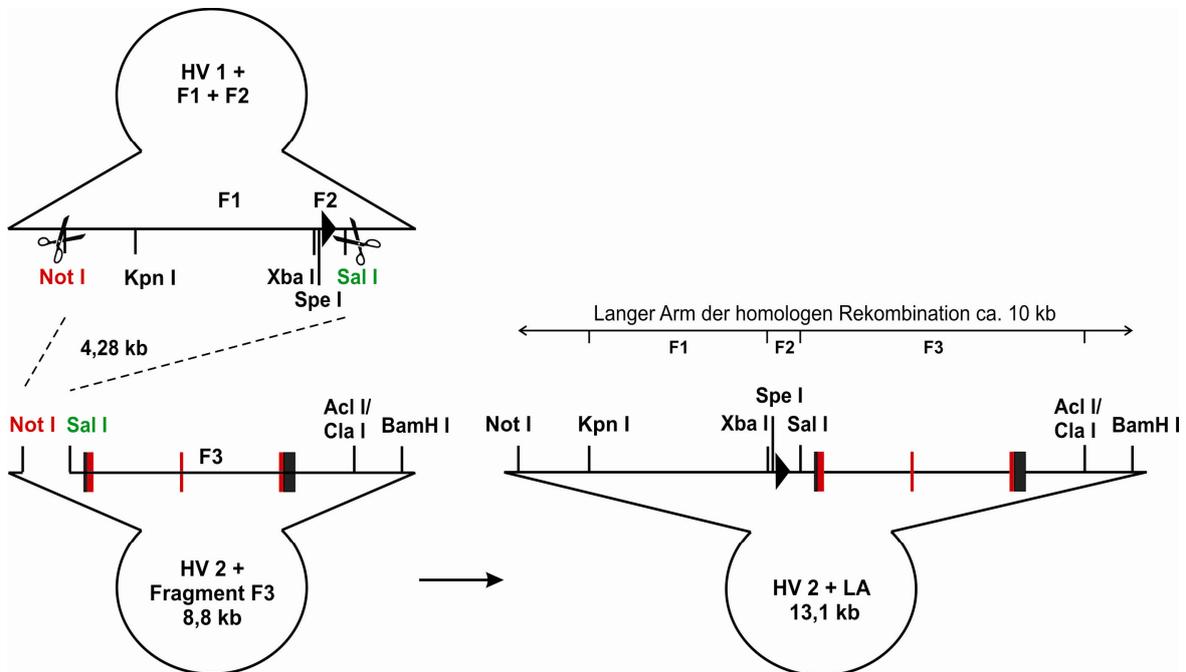


Abbildung 4.16: Fertigstellung des langen Arms der homologen Rekombination

Zum Zusammenbau des langen Arms wurden Fragment 1 und das PCR-Fragment gemeinsam aus HV1 über Not I und Sal I ausgeschnitten und in Hilfsvektor HV 2 mit Fragment F3 ligiert.

4.2.3.2 3'-Homologer Bereich („Kurzer Arm“)

Der kurze Arm der homologen Rekombination erstreckt sich über einen 3,8 kb-Bereich zwischen zwei Acl I-Schnittstellen. Dieses Fragment könnte theoretisch direkt über die Schnittstelle Cla I in den *knockout*-Basisvektor eingebaut werden, da Acl I und Cla I dieselben Überhänge produzieren. Klonierungen in größere Plasmide wie beispielsweise das *knockout*-Basiskonstrukt gestalten sich allerdings wesentlich schwieriger als Klonierungen in kleinere Vektoren, weshalb auch der kurze Arm der homologen Rekombination zunächst aus der BAC-DNS ausgeschnitten und in ein *high copy*-Plasmid subkloniert wurde. Die BAC-DNS wurde mit Acl I verdaut und der Ansatz über eine CHROMA SPINTM-Säule gereinigt. Hilfsvektor HV3 wurde mit Cla I linearisiert, dephosphoryliert sowie ebenfalls über CHROMA SPINTM-Säulen aufbereitet und anschließend mit dem Acl I-Verdauansatz ligiert (Abbildung 4.17). Somit konnte nun aus diesem *high copy*-Plasmid (HV3 + KA) genügend Fragment-DNS des kurzen Arms gewonnen werden, um die eigentliche Klonierung in das *knockout*-Basiskonstrukt zu ermöglichen.

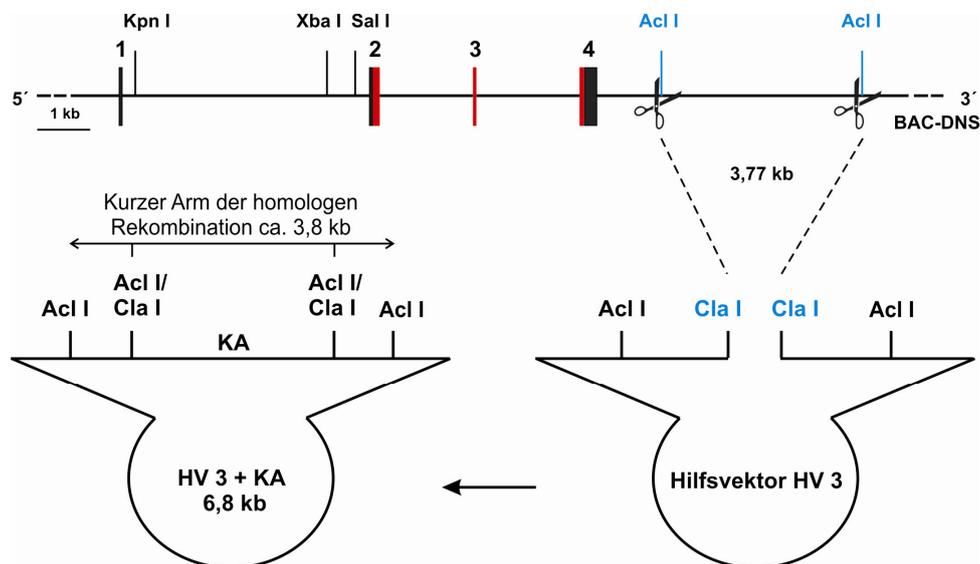


Abbildung 4.17: Subklonierung des kurzen Arms der homologen Rekombination

Der kurze Arm wurde zur Subklonierung durch Restriktionsverdau mit Acl I aus BAC-DNS gewonnen und über Cla I in Hilfsvektor HV3 eingebaut.

4.2.3.3 Zusammenbau des *knockout*-Vektors

Nachdem beide Arme der homologen Rekombination in den entsprechenden Hilfsvektoren subkloniert waren, mussten diese nun abschließend in das *knockout*-Basiskonstrukt eingebaut werden. Zunächst wurde der 3'-homologe Bereich mit Acl I aus HV3 + KA ausgeschnitten und das Fragment mittels Gelelektrophorese identifiziert und aufgereinigt. Das *knockout*-Basiskonstrukt wurde mit Cla I verdaut, dephosphoryliert und über eine CHROMA SPINTM-Säule gereinigt. Da Acl I und Cla I dieselben Überhänge produzieren, konnte die DNS des kurzen Arms mit dieser Strategie in den *knockout*-Vektor ligiert werden (Abbildung 4.18), die aus dieser Ligation hervorgegangenen Plasmide mussten allerdings zusätzlich durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf die richtige Orientierung des Fragments geprüft werden.

Nach der Identifikation eines Plasmids mit kurzem Arm in der richtigen Orientierung wurde dieses weiter zum Einbau des 5'-homologen Bereichs verwendet. Zu diesem Zweck wurde der lange Arm mit Not I und BamH I aus HV2 + LA ausgeschnitten und mittels Gelelektrophorese und -extraktion isoliert. Der Vektor mit schon eingebautem kurzem Arm wurde mit Not I und BamH I geöffnet, dephosphoryliert, über eine CHROMA SPINTM-Säule gereinigt und mit dem langen Arm ligiert (Abbildung 4.18).

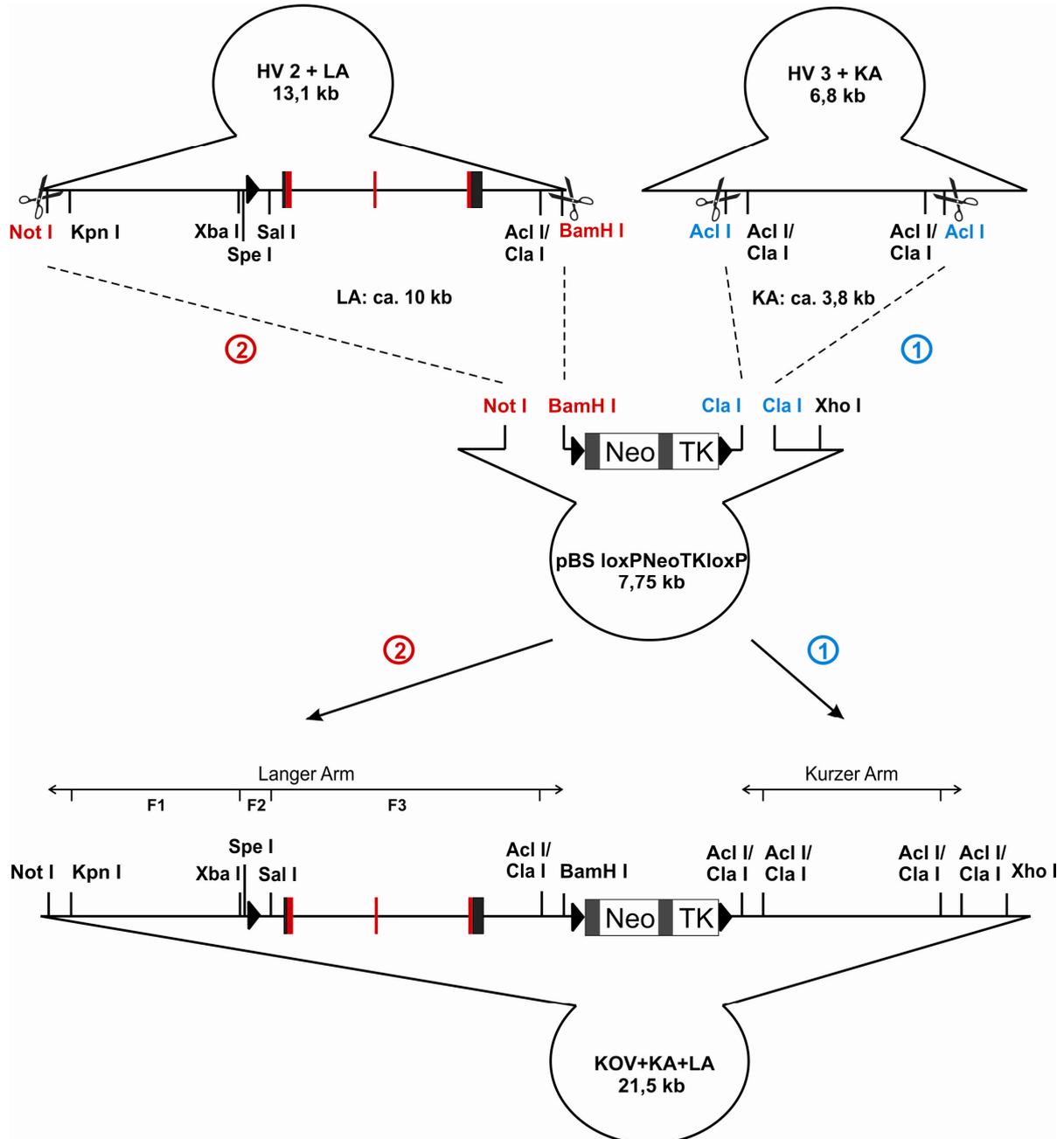


Abbildung 4.18: Fertigstellung des Pde6h-knockout-Konstrukts

Der kurze Arm der homologen Rekombination wurde über Acl I/Cla I in den *knockout*-Basisvektor eingebaut (1), die Orientierung geprüft und das Konstrukt durch Einklonieren des langen Arms über Not I und BamH I vervollständigt (2).

Somit war das Pde6h-*knockout*-Konstrukt (KOV+KA+LA) fertiggestellt und die korrekte Zusammensetzung wurde durch Ansequenzierung aller Klonierungsstellen sowie die komplette Sequenzierung der Exonbereiche überprüft.

4.3 Herstellung und Testung der Sonden

4.3.1 5'-Sonde

Wie unter 4.1.3 beschrieben sollte die 5'-Sonde im Bereich zwischen den Schnittstellen Spe I und Kpn I binden und nach Southern-Hybridisierung in mit Spe I verdauter wildtyp-DNS spezifisch ein Fragment von 14,7 kb detektieren. Mit Hilfe des Online-Programms „Repeat Masker“ (<http://www.repeatmasker.org>) wurde der entsprechende Bereich auf repetitive Sequenzen untersucht und fünf verschiedene in Frage kommende Sonden hergestellt und getestet. Die Sonden wurden mittels PCR mit der Pfx-Polymerase an Mausschwanz-DNS generiert, in pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert und anschließend sequenziert. Für die Southern-Hybridisierung wurde die Sonden-DNS durch Restriktionsverdau mit EcoR I aus pCR[®]2.1-TOPO[®] gewonnen und über ein präparatives Agarosegel mit dem MinElute Gel Extraction Kit aufgereinigt. Die wildtyp-DNS wurde wie unter 3.2.10 beschrieben mit Spe I verdaut, geblottet und mit der jeweiligen markierten Sonde hybridisiert. Die mit den Primern CB_F20 und CB_R6 synthetisierte 5'-Sonde der Länge 321 bp ergab reproduzierbar eine Bande auf der richtigen Höhe und kam daher für das Screening der ES-Zellen auf der 5'-Seite zum Einsatz (Abbildung 4.19).

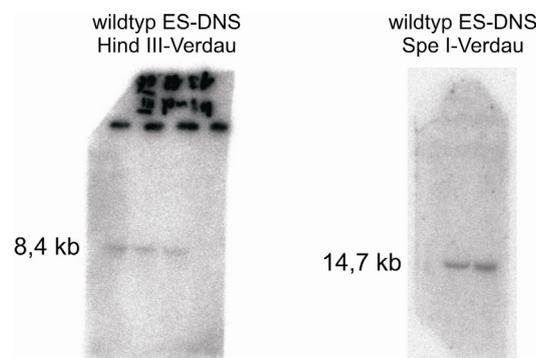


Abbildung 4.19: Testung der Sonden

Test der 3'-Sonde (links) beziehungsweise der 5'-Sonde (rechts) an wildtyp-DNS von embryonalen Stammzellen.

4.3.2 3'-Sonde

Analog zur oben beschriebenen Strategie wurden für die 3'-Seite insgesamt zwei verschiedene Sonden getestet, welche zwischen den Schnittstellen Acl I und Hind III binden und in mit Hind III verdauter wildtyp-DNS spezifisch ein Fragment der Größe 8,4 kb detektieren sollten. Die wildtyp-DNS wurde mit Hind III verdaut, geblottet und mit der jeweiligen markierten Sonde hybridisiert. Hierbei ergab eine Sonde der Länge 229 bp, welche mit den Primern CB_F7 und CB_R7 synthetisiert wurde, reproduzierbar eine Bande der

richtigen Größe und wurde daher für das Massenscreening der ES-Zellen eingesetzt (Abbildung 4.19).

4.4 Gentechnische Modifikation embryonaler Stammzellen

4.4.1 Das 1. Targeting

4.4.1.1 Embryonale Stammzellkultur

Im ersten Targeting wurden embryonale Stammzellen der Linie R1 mit dem linearisierten Pde6h-Targeting-Konstrukt transfiziert, die Selektion mit G418 gestartet, überlebende Zellklone isoliert und auf homologe Rekombination geprüft. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach den unter 3.3 beschriebenen Methoden. Das Pde6h-*knockout*-Konstrukt wurde zunächst mit Not I linearisiert und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion auf die Elektroporation vorbereitet. Embryonale Stammzellen der Passage 13 wurden in eine 25 cm²-Flasche ausgesät und nach Protokoll bis zur Elektroporation kultiviert, sie befanden sich zum Zeitpunkt der Elektroporation also in Passage 15. Zur Elektroporation wurden 60 µg linearisierte DNS mit $1,05 \times 10^7$ ES-Zellen gemischt und der Spannungspuls angelegt. Die Zeitkonstante T_{const} betrug 7,9 msec; der Kontrollwert mit PBS erreichte einen Wert von $T_{\text{const}} = 6,9$ msec. Das Targeting-Konstrukt sollte sich nun in der Zelle an die genomische DNS anlagern und durch homologe Rekombination an der richtigen Stelle integriert werden. In der Folge entstehen Zellen mit einem wildtyp- und einem homolog rekombinierten Allel (siehe Abbildung 1.5). Am Tag nach der Elektroporation begann die Selektion mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin (G418) mit dem Ziel, alle Zellen, welche das Targeting-Konstrukt nicht integriert hatten, abzutöten. Ab Tag 8 nach Selektionsstart wurden überlebende Zellklone nach den unter 3.3.5.3 beschriebenen Kriterien beurteilt und isoliert. Abbildung 4.20 zeigt einige Stammzellklone verschiedener Morphologie und eine Feederzell-Schicht, wie sie für die embryonale Stammzellkultur zum Einsatz kam.

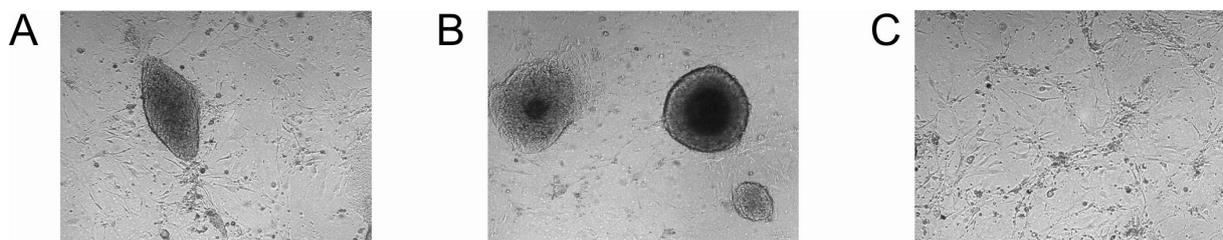


Abbildung 4.20: Embryonale Stammzellen und Feederzellen

(A) Stammzellklon mit optimaler Morphologie und geeigneter Größe zur Isolation. (B) Beispiele für zur Isolation ungeeignete Stammzellklone. Links oben: flacher Zellklon mit beginnender Differenzierung; rechts oben: gut abgegrenzter Zellklon mit sehr dichtem Zentrum, rundes Erscheinungsbild deutet aber auf ein Ablösen des Zellklons hin; rechts unten: Zellklon mit geeigneter Morphologie aber zu geringer Größe. (C) Feederzell-Monolayer.

Innerhalb von 7 Tagen konnten insgesamt 788 Zellklone „gepickt“ und nach weiterer Kultivierung evaluiert werden. Hierbei ergaben sich insgesamt 293 Klone (entsprechend 37% der isolierten Klone) mit gelber bzw. roter Beurteilung, also mit gutem Wachstum und optimalem Aussehen. Eine Kopie jedes Klons wurde bis zur weiteren Verwendung über

Sicherungsplatten bei -80°C eingefroren, die restlichen Kopien wurden lysiert und die DNS isoliert.

Jeder der 788 isolierten Zellklone wurde zunächst mittels Hind III-Verdau und Hybridisierung mit der 3'-Sonde auf homologe Rekombination auf der 3'-Seite hin überprüft. Klone, die hierbei beide Signale, also sowohl für das wildtyp-Allel als auch für das homolog rekombinierte Allel zeigten, wurden anschließend auf homologe Rekombination auf der 5'-Seite (Spe I-Verdau, 5'-Sonde) und Einfachintegration des Konstrukts (BamH I-Verdau, Neo-Sonde) untersucht. In Abbildung 4.21 sind diese Nachweise nochmals in einer Übersicht dargestellt.

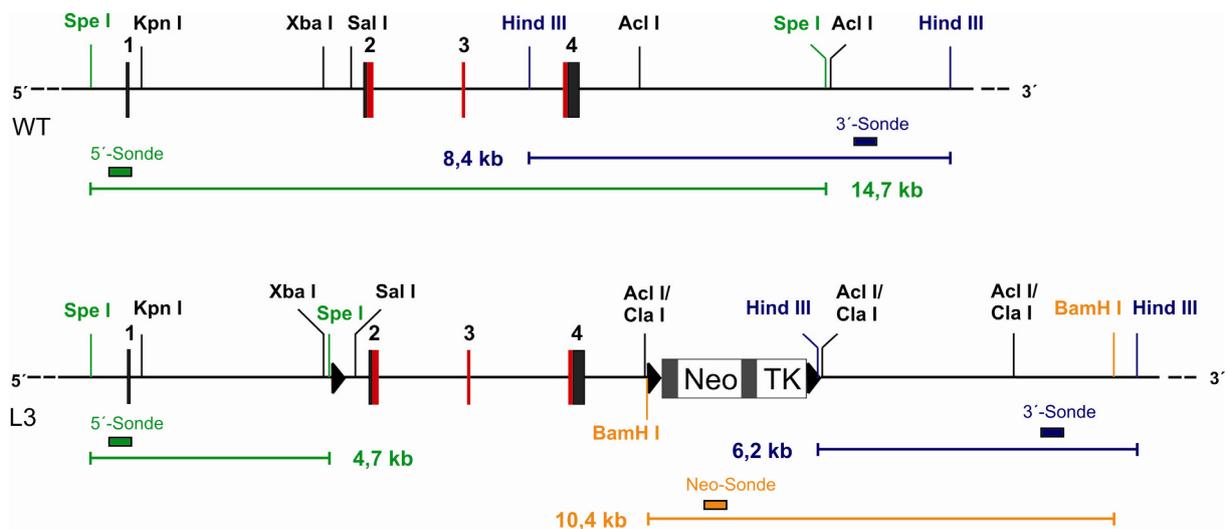


Abbildung 4.21: Übersicht über die Nachweise der homologen Rekombination

4.4.1.2 Kontrolle der 3'-homologen Rekombination

Zum Nachweis der homologen Rekombination auf der 3'-Seite wurde die DNS der Zellklone wie unter 3.2.2.1 beschrieben isoliert, mit Hind III verdaut und nach Gelelektrophorese geblottet. Die Blots wurden mit der 3'-Sonde hybridisiert, gewaschen und die Signale mittels Phosphorimagerplatten detektiert (3.2.10). Nach korrekter Rekombination müsste das Fragment des wildtyp-Allels mit 8,4 kb und das Fragment des rekombinanten Allels mit 6,2 kb zu detektieren sein, da eine homologe Rekombination auf beiden Allelen als äußerst unwahrscheinlich anzusehen ist. Bei insgesamt 101 der 788 analysierten Zellklone konnten die gewünschten Banden detektiert werden. Abbildung 4.22 zeigt exemplarisch einen Blot des 3'-Massenscreenings mit verschiedenen rekombinanten Klonen sowie einige Klone ohne Rekombination auf der 3'-Seite.

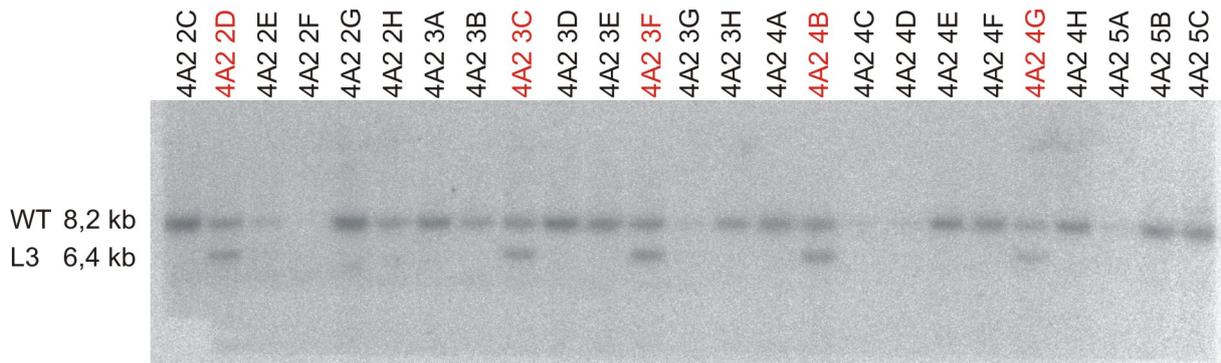


Abbildung 4.22: Nachweis 3'-homologe Rekombination mit der 3'-Sonde

Southern Blot-Analyse von Klonen der Platte I.1 4A2. Die 8,2 kb-Bande entspricht dem Wildtyp, die 6,4 kb-Bande einem auf der 3'-Seite homolog rekombinierten Allel. Rot gekennzeichnete Klone weisen eindeutig eine homologe Rekombination auf der 3'-Seite auf.

Allgemeines Schema zur Bezeichnung der Klone:

I.1 4C2 4G: I.1 = 1. Targeting; Durchführung zum 1. Mal
4C2 = 4. Picktag; 2. Platte; Plattenkopie C
4G = Koordinaten des Klons auf der 96-Loch-Platte

4.4.1.3 Kontrolle der 5'-homologen Rekombination

Alle 101 Klone mit korrekter 3'-Rekombination wurden anschließend mit der 5'-Sonde weiter untersucht. Die DNS wurde nach Isolation mit Spe I verdaut und geblottet. Nach Hybridisierung mit der 5'-Sonde sollten bei korrekter Rekombination zwei Banden der Größe 14,7 kb (wildtyp-Allel) und 4,7 kb (rekombinantes Allel) entstehen. Insgesamt 41 der 101 mit dieser Methode untersuchten Klone zeigten beide Signale, sodass also 41 von 788 Klonen eine homologe Rekombination aufwiesen. Die zweite Bande der als Wildtyp klassifizierten Klone entsteht durch Integration eines Teilstücks des *knockout*-Konstrukts mit zusätzlicher Spe I-Schnittstelle auf der 3'-Seite. In Abbildung 4.23 ist ein ausgewählter Blot der 5'-Kontrolle dargestellt.

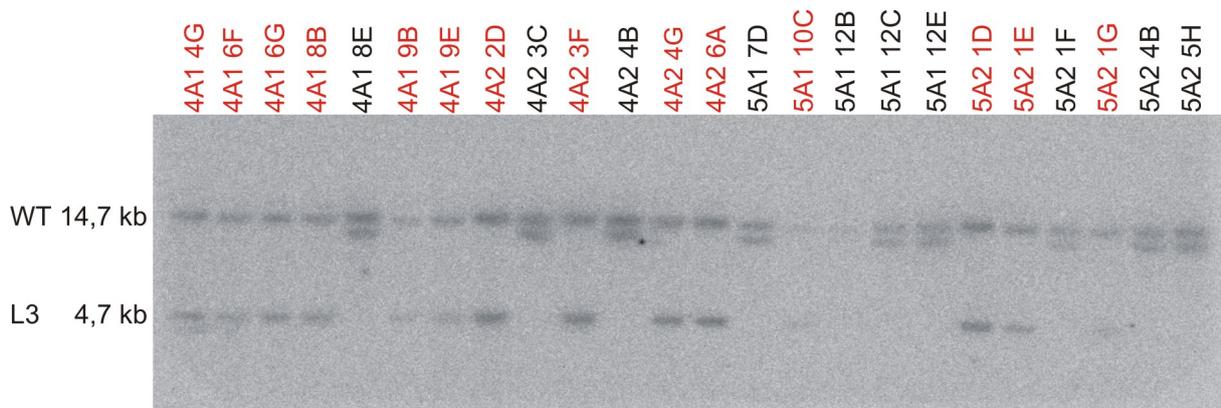


Abbildung 4.23: Nachweis 5'-homologe Rekombination mit der 5'-Sonde

Southern Blot-Analyse ausgewählter Klone mit 3'-homologer Rekombination. Die 14,7 kb-Bande entspricht dem Wildtyp, die 4,7 kb-Bande einem auf der 5'-Seite homolog rekombinierten Allel. Die zweite Bande (ca. 11,4 kb) der als Wildtyp klassifizierten Klone entsteht durch Integration eines Teilstücks des *knockout*-Konstrukts mit Spe I-Schnittstelle auf der 3'-Seite. Rot gekennzeichnete Klone weisen eindeutig eine homologe Rekombination auf der 5'-Seite auf.

4.4.1.4 Kontrolle der Einfachintegration

Parallel zur Analyse auf homologe Rekombination auf der 5'-Seite wurden alle 101 Klone mit korrekter 3'-Rekombination durch BamH I-Verdau und Hybridisierung mit der Neo-Sonde auf einmalige Integration des *knockout*-Konstrukts kontrolliert. Bei Einfachintegration sollte eine singuläre Bande der Länge 10,4 kb zu detektieren sein, Klone mit mehreren Banden oder einem Fragment der falschen Größe wurden als falsch definiert. Abbildung 4.24 zeigt exemplarisch einen Blot der Hybridisierung mit der Neo-Sonde.

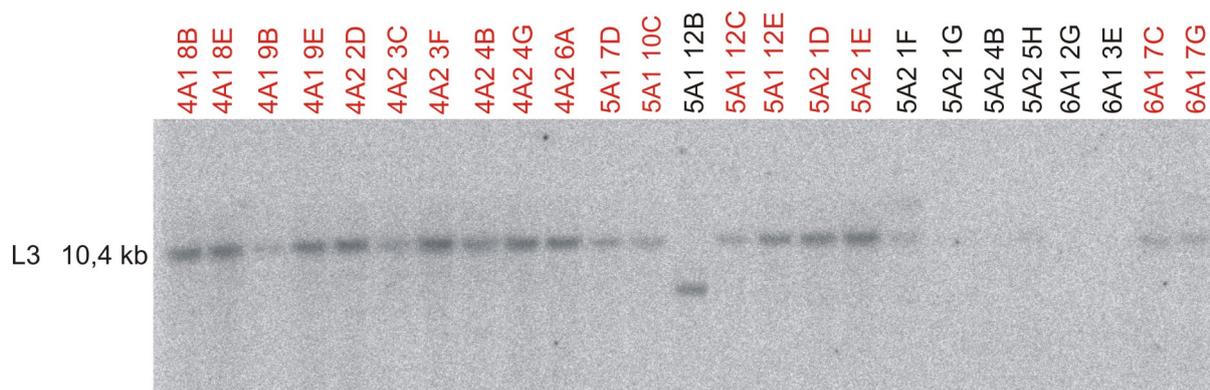


Abbildung 4.24: Nachweis der Einfachintegration mit der Neo-Sonde

Southern Blot-Analyse ausgewählter Klone mit 3'-homologer Rekombination. Die 10,4 kb-Bande entspricht einer Einfachintegration des Targeting-Konstrukts an richtiger Stelle. Klone mit einer Bande der falschen Größe (z.B. 5A1 12B) oder zwei Banden (z.B. 5A2 1F) werden nicht weiter verwendet. Rot gekennzeichnete Klone weisen eindeutig eine Einfachintegration auf.

Insgesamt 81 der 101 untersuchten Klone wiesen eine singuläre Bande der richtigen Länge auf, sodass letztendlich 32 der 788 isolierten Klone eine korrekte homologe Rekombination mit Einfachintegration des *Pde6h-knockout*-Konstrukts zeigten. Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse des 1. Targetings zusammen.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse des 1. Targetings

Isolierte Klone	Positive Nachweise mit			Insgesamt positiv	Evaluation		
	3'-Sonde	5'-Sonde	Neo-Sonde		grün	gelb	rot
788	101	41	81	32	11	14	7

4.4.2 Das 2. Targeting

4.4.2.1 Auftauen von L3-Klonen

Mit zwei der im 1. Targeting identifizierten Klone wurde anschließend ein 2. Targeting durchgeführt. In Tabelle 4.2 sind alle L3-Klone des 1. Targetings mit ihrer genauen Bezeichnung und der weiteren Verwendung aufgelistet. Für das 2. Targeting wurden die Klone 6A und 4G der Platte 4A2 verwendet, die restlichen positiven Klone der Platte sowie die in der Tabelle hellgrau markierten Klone der Platten 2C2, 3C2 und 4C1 wurden ebenfalls von der Sicherungsplatte aufgetaut, zur Dauerlagerung in flüssigem Stickstoff bis zur 25 cm²-Flasche kultiviert, anschließend eingefroren und zusätzlich DNS präpariert (3.3.5.5). Bei einer Auswahl dieser Zellklone (Klone für das 2. Targeting und eventuelle Blastozysteninjektionen)

wurde die homologe Rekombination nochmals mit der 3'-Sonde, der 5'-Sonde und der Neo-Sonde überprüft, um Verwechslungen auszuschließen (Abbildung 4.25). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

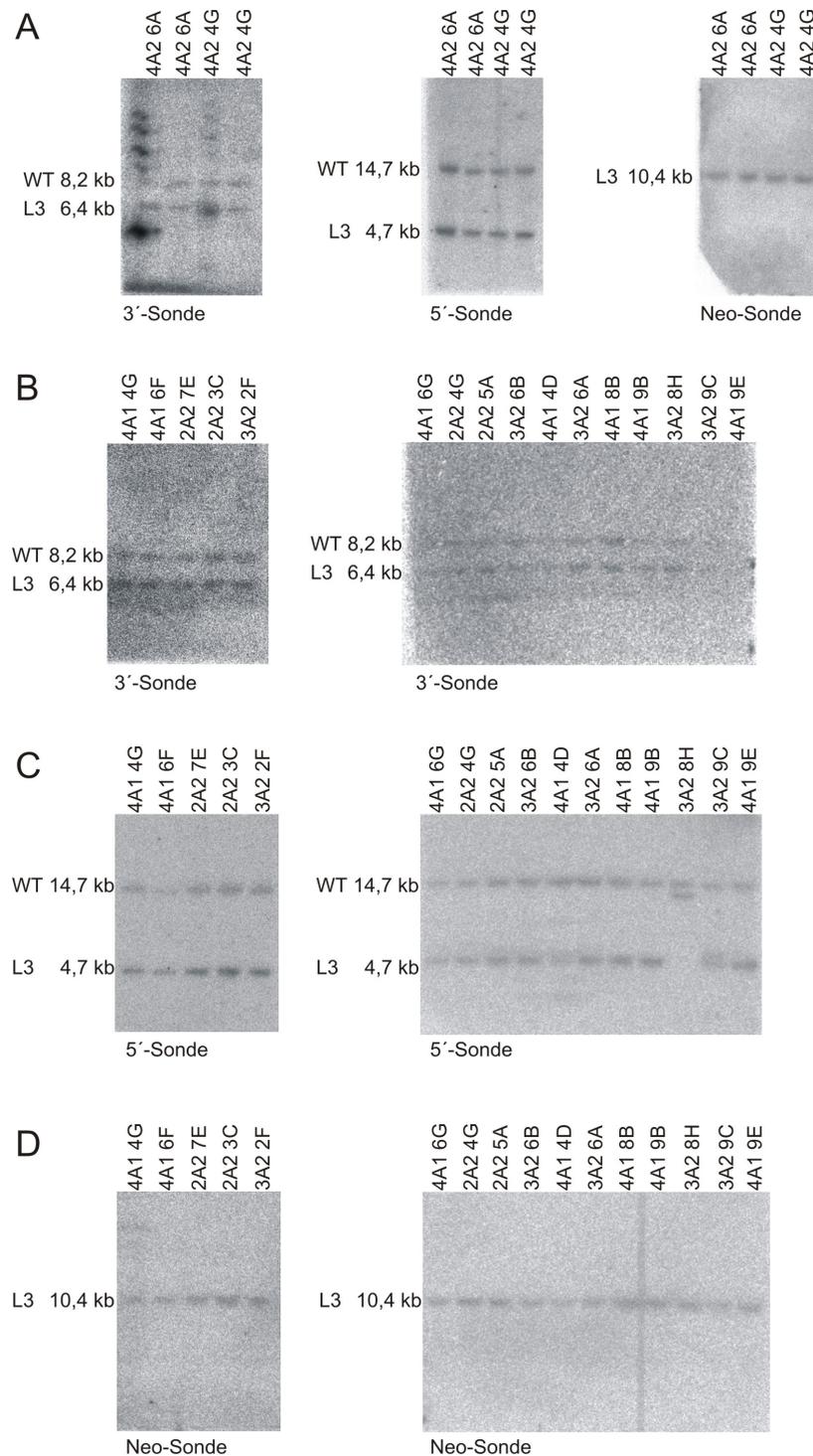


Abbildung 4.25: Southern Blot-Nachweise der aufgetauten L3-Klone

(A) Bestätigung der homologen Rekombination der im 2. Targeting verwendeten Klone I.1 4A2 4G und I.1 4A2 6A. (B) Bestätigung der 3'-homologen Rekombination der aufgetauten Klone. (C) Bestätigung der 5'-homologen Rekombination der aufgetauten Klone. (D) Bestätigung der Einfachintegration der aufgetauten Klone.

Klon I.1 2A2 6E konnte nicht wieder in Kultur genommen werden, da die Zellen nach dem Einfrieren und Auftauen nicht mehr angewachsen waren. Alle anderen 20 Klone konnten nach der Sicherung bei -80°C wieder kultiviert werden, und nach Analyse der DNS wurden 16 Klone mit eindeutig nachgewiesener homologer Rekombination identifiziert. Bei zwei Klonen (4A2 2D, 4A2 3F) wurde die DNS zu diesem Zeitpunkt nicht überprüft, der Klon 3C2 8H zeigte keine 5'-homologe Rekombination in der Kontrolle und Klon 4C1 9E zeigte beim Nachweis mit der 3'-Sonde ein sehr schwaches Signal, weshalb auch dieser zunächst nicht weiter verwendet werden sollte.

Tabelle 4.2: Auflistung der Pde6h-L3-Klone

Platte	Klon	Evaluation	DNS-Kontrolle	Verwendung
I.1 1A1	4B	gelb	-	-
I.1 2A1	2D	grün	-	-
I.1 2A2	3C	gelb	L3	Dauerlagerung
	3D	grün	-	-
	4G	rot	L3	Dauerlagerung
	5A	gelb	L3	Dauerlagerung
	6E	grün	nicht angewachsen	-
	7E	rot	L3	Dauerlagerung
	9D	grün	-	-
I.1 3A1	4D	gelb	-	-
	7H	grün	-	-
	12G	gelb	-	-
I.1 3A2	2F	rot	L3	Dauerlagerung
	6A	grün	L3	Dauerlagerung
	6B	gelb	L3	Dauerlagerung
	8H	grün	nicht L3	-
	9C	gelb	L3	Dauerlagerung
I.1 4A1	4D	grün	L3	Dauerlagerung
	4G	gelb	L3	Dauerlagerung
	6F	rot	L3	Blastozysteninjektion
	6G	gelb	L3	Dauerlagerung
	8B	grün	L3	Dauerlagerung
	9B	grün	L3	Dauerlagerung
	9E	rot	? schwaches Signal	Dauerlagerung
I.1 4A2	2D	rot	nicht kontrolliert	Dauerlagerung
	3F	grün	nicht kontrolliert	Dauerlagerung
	4G	rot	L3	2. Targeting
	6A	gelb	L3	2. Targeting
I.1 5A1	10C	gelb	-	-
I.1 5A2	1D	gelb	-	-
	1E	gelb	-	-
I.1 6A1	7C	gelb	-	-

4.4.2.2 Embryonale Stammzellkultur/Elektroporation

Im 2. Targeting wurden die Klone 4A2 4G und 4A2 6A mit einem Expressionsvektor, welcher für die Cre-Rekombinase kodiert (pIC Cre) transfiziert. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach den unter 3.3.5 beschriebenen Methoden. Der pIC Cre-Vektor wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion auf die Elektroporation vorbereitet, und die Stammzellklone wurden von der 24-Loch-Platte bis zur 75 cm^2 -Flasche für die Elektroporation kultiviert. Die

Stammzellen wurden mit jeweils 21,8 µg nicht linearisierter pIC Cre-DNS gemischt und der Spannungspuls angelegt. Die einzelnen Parameter der Elektroporation sind in Tabelle 4.3 aufgelistet. DNS-Abschnitte zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen sollten nun mit Hilfe der Cre-Rekombinase deletiert werden, sodass insgesamt drei verschiedene Ereignisse zu verzeichnen sind (Abbildung 4.26). 48 Stunden nach der Elektroporation wurde die Negativselektion mit Ganciclovir gestartet mit der Folge des Absterbens derjenigen Zellklone, bei denen die NeoTK-Resistenzgenkassette trotz Cre-Rekombination erhalten blieb. Folglich blieben nach der Selektion nur noch zwei verschiedene Rekombinationsereignisse übrig, nämlich der konstitutive (L1) und der konditionale *knockout* (L2). Bei Klon 4A2 6A wuchsen nach der Selektion nur sehr wenige Zellklone, so dass erst ab Tag 9 nach Selektionsstart über insgesamt 9 Tage 13 überlebende Zellklone isoliert werden konnten. Ähnliche Verhältnisse zeigten sich bei den Zellen von Klon 4A2 4G. Hier fanden sich ab Tag 7 nach Selektionsstart insgesamt 20 überlebende Zellklone, die ebenfalls über einen Zeitraum von 9 Tagen isoliert wurden. Es ergaben sich also nach den beiden Elektroporationen und der Selektion insgesamt 33 Zellklone, von denen 25 (entsprechend 75% der isolierten Klone) in der Evaluation mit „gelb“ oder „rot“ beurteilt wurden. Auch hier wurde eine Platte als Sicherungskopie bei -80°C eingefroren und die restlichen Kopien lysiert und die DNS isoliert.

Tabelle 4.3: Elektroporations-Parameter im 2. Targeting

Klon	Zellzahl	Passage	T _{const}	T _{const} (PBS)	isolierte Klone
4A2 6A	1,5 x 10 ⁷	23	10,4	6,9	13
4A2 4G	1,4 x 10 ⁷	24	10,3	6,9	20

Die isolierten Klone mussten nun mittels Southern Blot oder PCR auf die erfolgte Cre-Rekombination überprüft und Zellklone mit konstitutivem oder konditionalem *knockout* identifiziert werden.

4.4.2.3 Nachweis der Cre-Rekombination

Zum Nachweis der Cre-Rekombination standen zwei verschiedene Methoden zur Verfügung. Durch Restriktionsverdau mit BamH I und Hybridisierung mit der 3'-Sonde des 1. Targetings können alle nach dem 2. Targeting möglichen Rekombinationsereignisse im Southern Blot nachgewiesen werden (Abbildung 4.26).

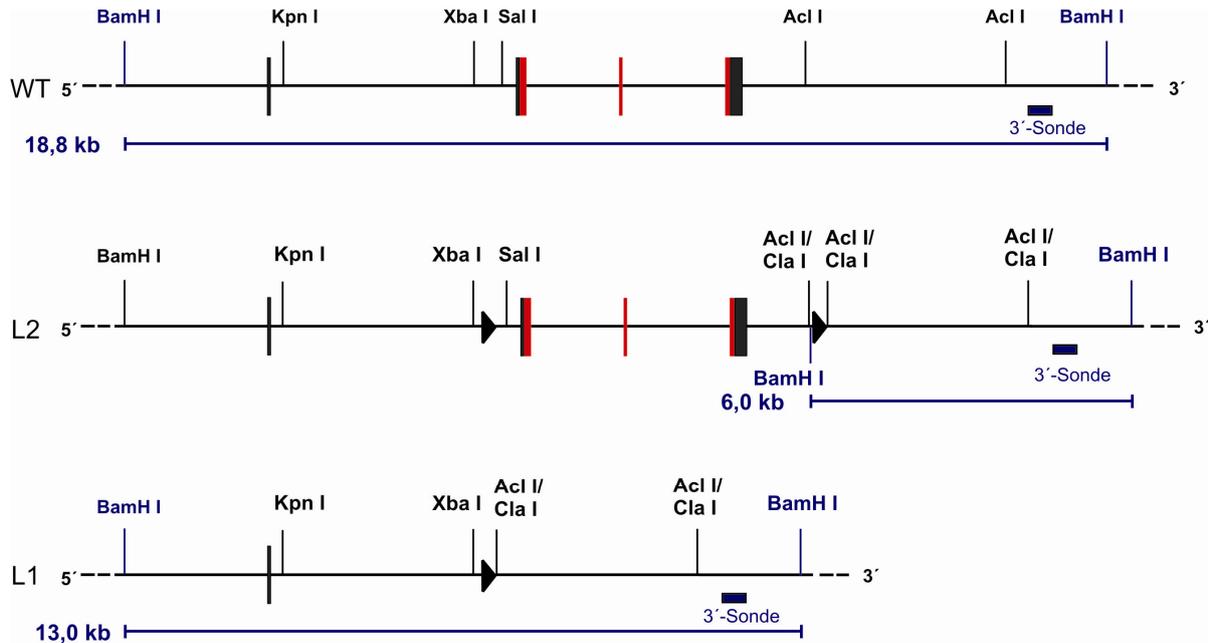


Abbildung 4.26: Nachweis der Cre-Rekombination durch Southern-Hybridisierung

Im Wildtyp ergibt sich ein Signal von 18,8 kb, welches auf 13,0 kb bei L1-Klonen bzw. auf 6,0 kb bei L2-Klonen verkürzt wird. Klone, welche die NeoTK-Kassette nach Cre-Rekombination immer noch beinhalten, sterben während der Selektion ab, da Ganciclovir über die Thymidinkinase aktiviert wird und folglich toxisch auf die Zellen wirkt.

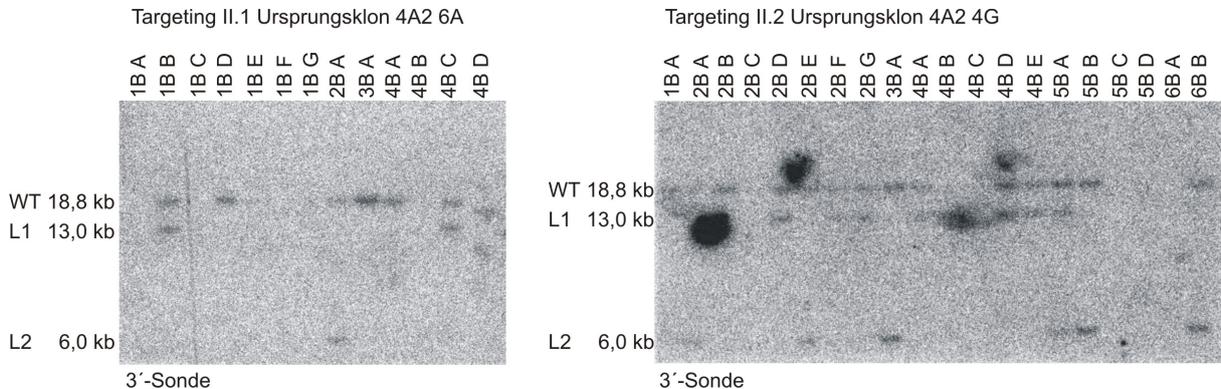


Abbildung 4.27: Southern-Nachweis der Cre-Rekombination im 2. Targeting

Southern Blot-Analyse der im 2. Targeting isolierten Klone. Die 18,8 kb-Bande entspricht dem Wildtyp, die 13,0 kb-Bande einem Allel mit konstitutivem *knockout* (L1) und die 6,0 kb-Bande einem Allel mit konditionalem *knockout* (L2).

Alternativ können auch mit der Pde6h-L1/L2-Genotypisierungs-PCR (Abbildung 4.28) Klone mit konstitutivem oder konditionalem *knockout* identifiziert werden.

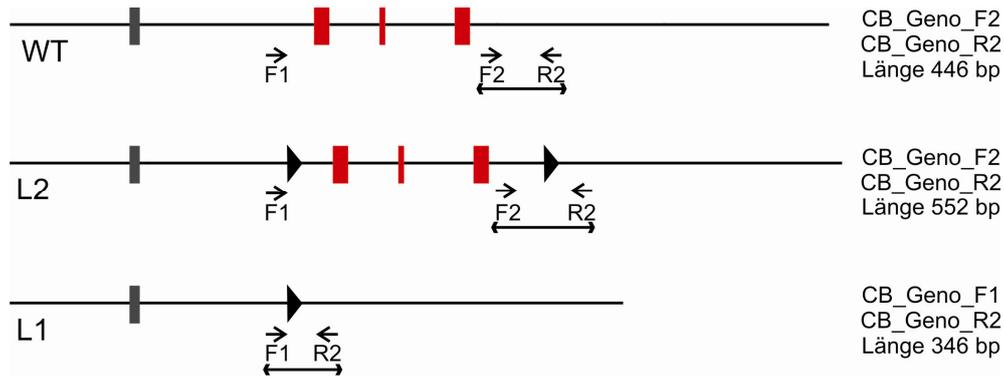


Abbildung 4.28: Nachweis der Cre-Rekombination durch PCR

Bei dieser Methode entstehen durch Kombination von drei Primern abhängig vom Genotyp verschieden große Fragmente. Reine wildtyp-Klone weisen nur die 446 bp-Bande auf, L2-Klone zeigen eine Doppelbande mit 446 bp und 552 bp, und L1-Klone zeigen zwei Banden der Länge 446 bp sowie 346 bp.

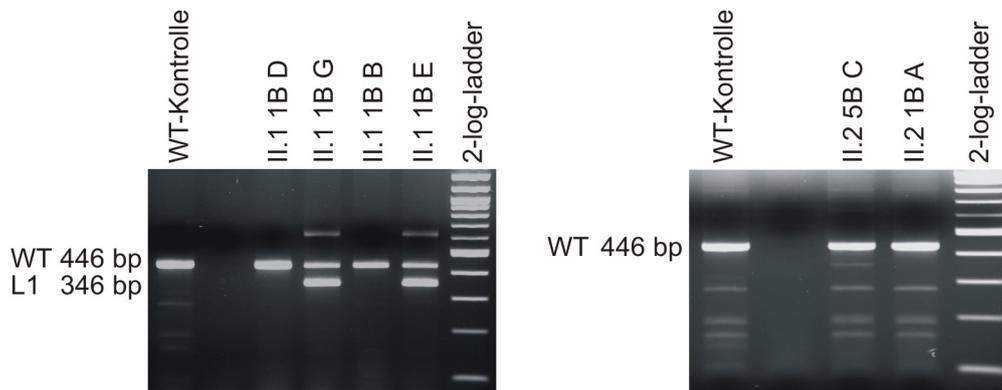


Abbildung 4.29: PCR-Nachweis der Cre-Rekombination im 2. Targeting

PCR-Analyse der restlichen nach dem Auftauen von der Sicherungsplatte wieder angewachsenen Klone des 2. Targetings. Die 446 bp-Bande entspricht dem Wildtyp, die 346 bp-Bande entspricht einem Allel mit konstitutivem *knockout* (L1).

Zunächst wurden alle Klone mittels Southern Blot-Screening untersucht (Abbildung 4.27), es konnten aber nicht von allen Klonen aussagekräftige Signale gewonnen werden. Da nicht genügend DNS für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand, wurde die Mehrzahl der Klone wieder von der Sicherungsplatte aufgetaut und zur Kryokonservierung und Gewinnung weiterer DNS bis zur 25 cm²-Flasche kultiviert. 14 der Klone wuchsen allerdings nicht mehr an, und auf Grund einer Kontamination mussten die restlichen Zellklone vernichtet werden. Somit standen nur noch wenige Sicherungsplatten zur Verfügung, von denen weitere Klone hochgezogen werden konnten. Die verbliebenen Platten mit insgesamt 10 Klonen wurden aufgetaut, die Klone bis zur 25 cm²-Flasche kultiviert, dann eingefroren und nochmals DNS zur Kontrolle isoliert. Hierbei wuchsen allerdings nur noch 6 der 10 Klone an. Bei der Analyse mittels PCR fanden sich dann 4 wildtyp-Klone und zwei L1-Klone, jedoch keine L2-Klone mehr (Abbildung 4.29), sodass nur noch L1-Klone zur weiteren Verwendung zur Verfügung standen.

Tabelle 4.4 fasst die Ergebnisse des 2. Targetings zusammen, in Tabelle 4.5 sind die einzelnen Klone mit den entsprechenden Nachweisen in einer Übersicht dargestellt.

Tabelle 4.4: Ergebnisse des 2. Targetings

Targeting	Ursprungs-Klon	isolierte Klone	gelb/rot	L1	L2	WT/ Mischklone	nicht bestimmbar
II.1	4A2 6A	13	10	3	1	4	5
II.2	4A2 4G	20	15	6	5	4	5

Tabelle 4.5: Auflistung der Klone des 2. Targetings

Hellgrau hinterlegt: L1; dunkelgrau hinterlegt: L2

Klone mit eindeutig bestimmtem Genotyp sind aufgelistet. Nicht aufgeführte Klone zeigten zunächst keine eindeutig aussagekräftigen Signale und gingen nach dem Auftauen durch Kontamination verloren oder wuchsen nicht mehr an.

Platte	Klon	Evaluation	Southern-Nachweis	PCR-Nachweis	Genotyp	Verwendung/ Bemerkung
II.1 1B	B	gelb	L1	WT	WT	-
	D	rot	WT	WT	WT	-
	E	grün	L1	L1	L1	Blastozysteninjektion
	G	gelb	-	L1	L1	Blastozysteninjektion
II.1 2B	A	gelb	L2	-	L2	Kontamination
II.1 3B	A	rot	WT	-	WT	-
II.1 4B	A	gelb	WT	-	WT	-
	C	gelb	L1	-	L1	Kontamination
II.2 1B	A	gelb	-	WT	WT	-
II.2 2B	A	gelb	L2	-	L2	nicht gewachsen
	B	grün	WT	-	WT	-
	D	gelb	L1	-	L1	nicht gewachsen
	E	gelb	L2	-	L2	nicht gewachsen
	F	rot	L1	-	L1	Kontamination
	G	gelb	L1	-	L1	Kontamination
	A	gelb	L2	-	L2	Kontamination
II.2 4B	A	gelb	L1	-	L1	nicht gewachsen
	D	gelb	L1	-	L1	nicht gewachsen
	E	gelb	L1	-	L1	nicht gewachsen
II.2 5B	A	gelb	L1/L2	-	Mischklon	-
	B	gelb	L2	-	L2	Kontamination
	C	grün	-	WT	WT	-
II.2 6B	B	gelb	L2	-	L2	Kontamination

4.4.3 Blastozysteninjektion

Für die Blastozysteninjektionen wurden die beiden noch verbliebenen Klone (II.1 1B E und II.1 1B G) mit konstitutivem *knockout* (L1) des 2. Targetings sowie ein Klon (I.1 4A1 6F) mit homologer Rekombination (L3) des 1. Targetings verwendet. Die Blastozystenisolierungen sowie -injektionen und der Embryotransfer wurden im Karolinska Center for Transgene Technologies, Stockholm, durchgeführt. Hierfür wurde jeweils ein 1 ml-Kryogefäß mit den entsprechenden Klonen verschickt, die Klone wurden von der dortigen Arbeitsgruppe dann in Kultur gebracht, expandiert und die Injektionen vorgenommen. Nach der Reimplantation wurden chimäre Mäuse geboren, die zur Etablierung der Linien zurück gesendet wurden. Der Chimärismus der Tiere wurde anhand des agouti-farbenen Anteils des Fells abgeschätzt (Abbildung 4.30; Tabelle 4.6).

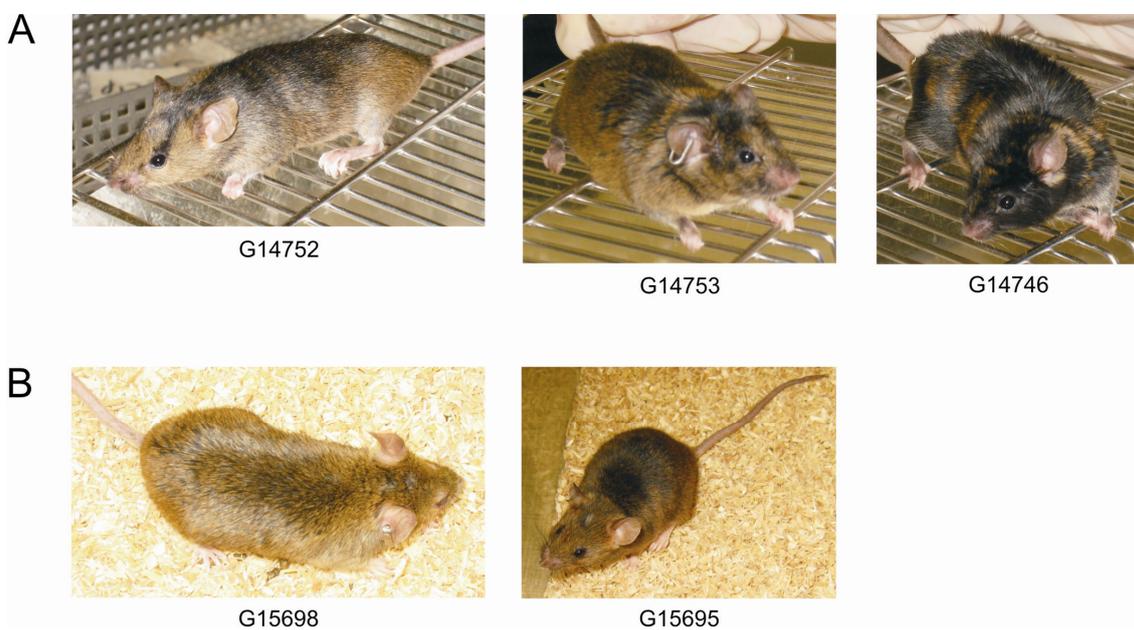


Abbildung 4.30: Pde6h-Chimären

(A) Ausgewählte L1-Chimären mit unterschiedlichem Grad an Chimärismus.
(B) Auswahl hochchimärer L3-Tiere.

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Blastozysteninjektion

Klon	Genotyp	Chimäre	Chimärismus	Geschlecht	Geburtsdatum	Keimbahntransmission
I.1 4A1 6F	L3	G15695	> 90%	♂	23.10.07	bei zwei der 4 Chimären
		G15696	> 90%	♂	23.10.07	
		G15697	> 90%	♂	23.10.07	
		G15698	> 90%	♂	25.10.07	
II.1 1B E	L1	G14768	50%	♂	18.02.08	-
		G14752	40%	♂	13.04.08	+
		G14753	70%	♂	13.04.08	-
		G14750	70%	♀	13.04.08	nicht verpaart
		G14751	70%	♀	13.04.08	nicht verpaart
II.1 1B G	L1	G14746	20%	♂	06.02.08	-

4.5 Etablierung der *knockout*-Mauslinie

4.5.1 Verpaarung der Chimären

Zur Etablierung der *Pde6h-knockout*-Mauslinie musste das über die embryonalen Stammzellen eingebrachte mutierte Allel der Chimären an die Nachkommen weiter vererbt werden (Keimbahntransmission). Zu diesem Zweck wurden die männlichen Chimären mit schwarzen C57BL/6 Weibchen verpaart. Bei braunen Nachkommen ist der Nachweis der Keimbahngängigkeit der Mutation erbracht, da *agouti* dominant über schwarz vererbt wird (Abbildung 3.8). Zwei der L3-Chimären lieferten braune Nachkommen, welche dann mittels *Pde6h-L3*-Genotypisierungs-PCR analysiert wurden. Bei einem der Nachkommen handelte es sich um eine wildtyp-Maus, der zweite Nachkomme (G 15699) aber zeigte die beiden Banden des wildtyp und des mutierten Allels (Abbildung 4.31). Mit dieser Maus der F1-Generation konnte dann durch weitere Verpaarung die Linie etabliert und durch Verpaarung mit CMV-„Cre-Deleter“-Mäusen *in vivo* der konstitutive *knockout* generiert werden.

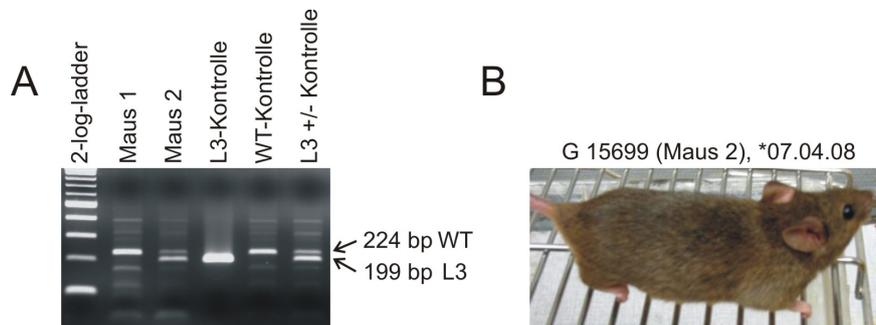


Abbildung 4.31: Genotypisierung der Nachkommen der L3-Chimären

(A) *Pde6h-L3*-Genotypisierungs-PCR der braunen Nachkommen der L3-Chimären (Maus 1 und Maus 2). Maus 1 ist ein wildtyp-Tier, Maus 2 (G15699) ist heterozygot L3 und diente zur Etablierung der *knockout*-Linie. (B) Foto von Maus 2 mit der Ohrclip-Nummer G15699.

Auch bei der Verpaarung der L1-Chimäre G14752 wurden insgesamt zwei braune Nachkommen (G18087 und G18088) geboren, die Keimbahntransmission war also auch in diesem Fall nachgewiesen. Die Analyse mit der *Pde6h-L1/L2*-Genotypisierungs-PCR zeigte allerdings, dass es sich bei beiden Nachkommen um wildtyp-Tiere handelte (Abbildung 4.32).

Chimäre Weibchen wurden für die Verpaarungen zum Test auf Keimbahngängigkeit nicht eingesetzt, da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten embryonalen Stammzellen von männlichen Mäusen stammten und somit eine Weitergabe der Mutation von weiblichen Chimären nicht zu erwarten war.

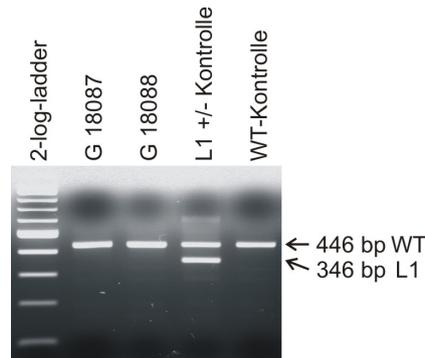


Abbildung 4.32: Genotypisierung der Nachkommen der L1-Chimäre

Pde6h-L1/L2-Genotypisierungs-PCR der braunen Nachkommen G18087 und G18088 der L1-Chimäre G14752.

4.5.2 Gendeletion mit „Cre-Deleter“-Mäusen

Da es sich bei den beiden braunen Nachkommen der L1-Chimäre um wildtyp-Tiere handelte, musste die *Pde6h-knockout*-Linie durch Verpaarung der heterozygoten Nachkommen der L3-Chimäre mit transgenen CMV-„Cre-Deleter“-Mäusen erfolgen (Abbildung 3.10). Aus diesen Verpaarungen resultierten Mäuse mit heterozygotem konstitutivem *knockout*, welche zusätzlich das Transgen der Cre-Rekombinase besaßen. Die Nachkommen aus diesen Verpaarungen wurden mittels dreier verschiedener Genotypisierungs-PCR-Reaktionen analysiert (Pde6h-L3-PCR, Pde6h-L1/L2-PCR und Cre-PCR) und die gewünschten Tiere identifiziert (Abbildung 4.33).

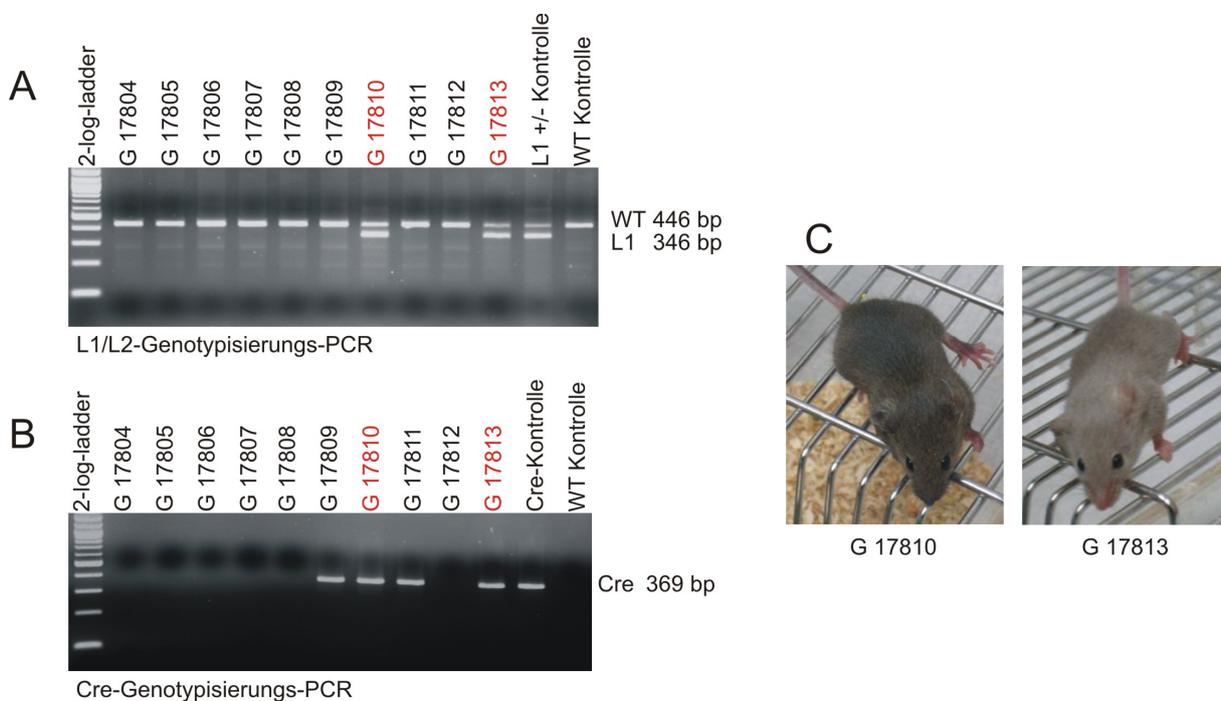


Abbildung 4.33: Gendeletion mit „Cre-Deleter“-Mäusen

(A) Pde6h-L1/L2-Genotypisierungs-PCR der Nachkommen einer Verpaarung $L3^{+/-} \times Cre^{tg}$. (B) Cre-Genotypisierungs-PCR desselben Wurfs. Cre-transgene Tiere mit heterozygotem *Pde6h-knockout* (L1) sind rot dargestellt. (C) Fotos der ersten $L1^{+/-}$ -Mäuse mit Cre-Transgen mit den Clip-Nummern G17810 und G17813.

4.5.3 Auskreuzen des Cre-Transgens

Mäuse mit *Pde6h-knockout* und Cre-Transgen wurden anschließend mit wildtyp-Mäusen verpaart und so das Transgen wieder ausgekreuzt (Abbildung 3.10). Die Nachkommen dieser Verpaarungen wurden ebenfalls mit der *Pde6h-L1/L2*-Genotypisierungs-PCR sowie der Cre-Genotypisierungs-PCR analysiert (Abbildung 4.34). Somit standen nun die ersten heterozygoten *Pde6h-knockout*-Mäuse zur Verfügung und durch weitere Verpaarung konnte die *Pde6h-knockout*-Linie etabliert werden.

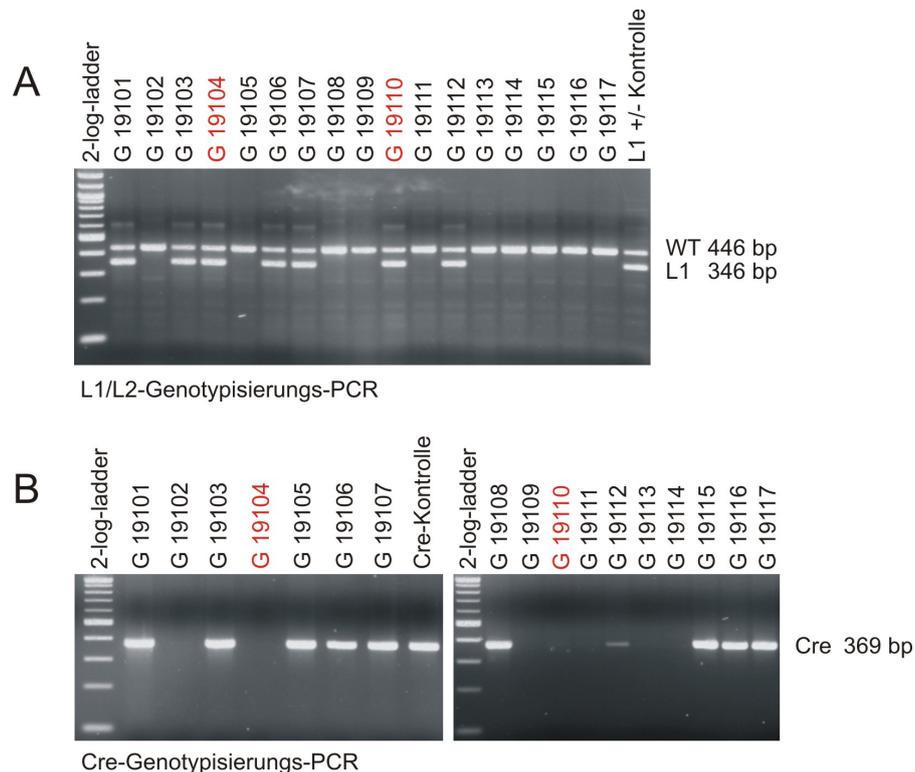


Abbildung 4.34: Auskreuzen des Cre-Transgens

(A) *Pde6h-L1/L2*-Genotypisierungs-PCR der Nachkommen zweier Verpaarungen $L1^{+/-}Cre^{tg} \times WT$. (B) Cre-Genotypisierungs-PCR derselben Würfe. Tiere mit heterozygotem *Pde6h-knockout* ($Pde6h^{+/-}$) ohne Cre-Transgen sind rot dargestellt.

4.5.4 Etablierung der konstitutiven *Pde6h-knockout*-Linie

Der homozygote konstitutive *Pde6h-knockout* wurde durch Kreuzung von heterozygoten *Pde6h-knockout*-Männchen mit heterozygoten *Pde6h-knockout*-Weibchen gezüchtet. Vorteil dieser Verpaarungen ist, dass in jedem Wurf nach den mendelschen Gesetzen der Anteil an wildtyp- und *knockout*-Tieren gleich sein müsste, so dass für nachfolgende Phänotypisierungen Wurfkontrollen zur Verfügung stehen. Alle Nachkommen aus den oben genannten Verpaarungen wurden mit Hilfe der *Pde6h-L1/L2*-PCR genotypisiert (Abbildung 4.35).

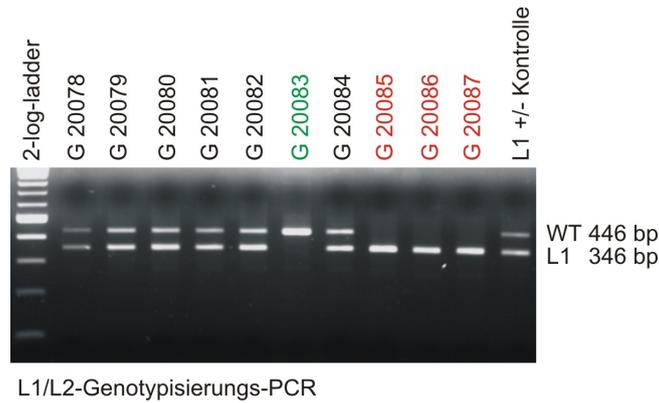


Abbildung 4.35: Etablierung der Pde6h-knockout-Linie

Pde6h-L1/L2-Genotypisierungs-PCR der Nachkommen einer Verpaarung Pde6h^{+/-} x Pde6h^{+/-}. Homozygote Pde6h-knockout-Mäuse (Pde6h^{-/-}) sind rot dargestellt. Homozygote wildtyp-Wurfgeschwister (grün) dienen in Phänotypisierungs-Experimenten als Kontrollen.

4.6 Generierung eines Pde6h-spezifischen Peptid-Antikörpers

4.6.1 Peptiddesign

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war, mit Hilfe eines spezifischen Anti-Pde6h-Antikörpers das Fehlen der γ -Untereinheit der Zapfen-PDE bei Pde6h^{-/-}-Mäusen zu verifizieren. Hierfür wurde ein polyklonaler Anti-Peptid-Antikörper generiert, welcher spezifisch die inhibitorische γ -Untereinheit der Zapfen-PDE detektiert. Nach einem Alignment der Proteinsequenzen von Pde6h und Pde6g wurde ein für Pde6h möglichst spezifischer Sequenz-Bereich ausgewählt, der geringe Homologie zu verwandten Proteinen aufwies. Der ausgewählte, 19 Aminosäuren umfassende N-terminale Bereich der Pde6h wurde am C-terminalen Ende um ein Cystein ergänzt (Abbildung 4.36), um eine Kopplung an das Carrierprotein KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanine*) zu ermöglichen. Die Synthese dieses Peptids mit einem Molekulargewicht von 1957 g/mol und die Kopplung an KLH wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt.

A

```

Pde6g      MNLEPPKGEIRSATRVIGGPVTPRKGPpkfKQRQTRQfKSKPPKKGvQGFGDDIPGMEGL 60
Pde6h      MSDSPS----LSPpAPsQGPTTPRKGPpkfKQRQTRQfKSKPPKKGvKGFgDDIPGMEGL 56
          *  .  .  .          *  .  .          **  *****;*****

```

```

Pde6g      GTDITVICPWEAFNHLELHELAQYGII 87
Pde6h      GTDITVICPWEAFSHLELHELAQFGII 83
          *****_*****;***

```

B

ausgewählte Peptid-Sequenz: NH₂-MSDSPCLSPAPsQGPTTPC-CONH₂

Abbildung 4.36: Auswahl der Peptidsequenz

(A) Alignment der Proteinsequenz von Pde6g und Pde6h. Die zur Herstellung des Antikörpers ausgewählte Peptidsequenz ist rot hinterlegt. * = identische Aminosäure; . = semikonservierte Substitution; ; = konservierte Substitution. (B) Aufbau des zur Immunisierung verwendeten Peptids.

4.6.2 Immunisierung von Kaninchen und Test der Antiseren

Die Immunisierung zweier Kaninchen mit dem an KLH gekoppelten Peptid erfolgte bei Eurogentec nach dem unter 3.5.2 beschriebenen Protokoll. Die Präimmunseren, die Testseren nach der 3. Immunisierung (Tag 59) sowie die durch Ausblutung gewonnenen Seren (Tag 87) wurden anschließend mittels Immunfluoreszenzfärbungen an retinalen Kryoschnitten von 30 Tage alten wildtyp-Mäusen des Stamms C57BL/6 getestet. Dazu wurden Gewebeschnitte von wildtyp-Retinae angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Die Schnitte wurden nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit den Kaninchenseren in verschiedenen Verdünnungen über Nacht inkubiert und das Serum wieder ausgewaschen. Nach Inkubation mit einem mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundäntikörper wurden die Schnitte fixiert, zusätzlich erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol). Die Herstellung und Fixierung der Kryo-Gewebeschnitte sowie die Immunfluoreszenzfärbungen wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für experimentelle Ophthalmologie des Forschungsinstituts für Augenheilkunde in Tübingen durchgeführt. Bei allen untersuchten Antiseren ist eine spezifische Färbung der Zapfen zu erkennen (Abbildung 4.37 A, C), während die jeweils zugehörigen Präimmunseren keine spezifische Färbung der Zapfen oder anderer Strukturen der Netzhaut aufweisen (Abbildung 4.37 B, D).

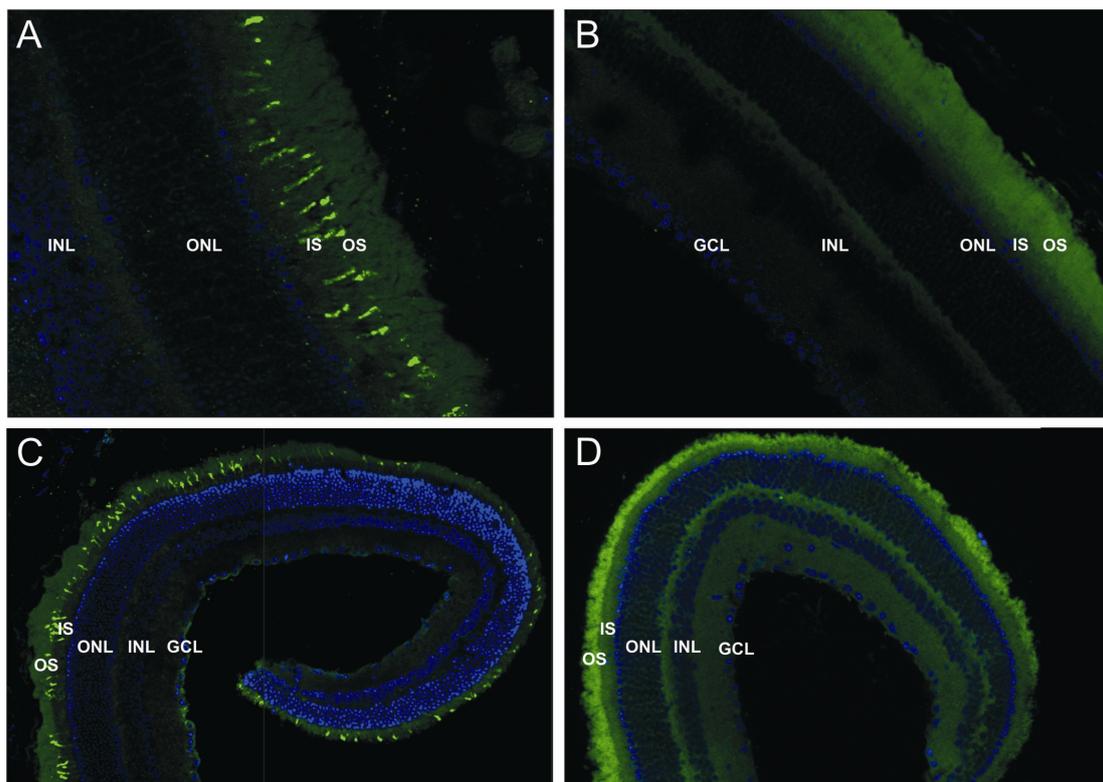


Abbildung 4.37: Antiseren-Test

Immunhistochemische Färbungen retinaler wildtyp-Kryoschnitte mit Antiseren (Tag 59) (A, C) sowie Präimmunseren (B, D). oben: Seren von Kaninchen Nr. 1, Verdünnung 1:3000; unten: Seren von Kaninchen Nr. 2, Verdünnung 1:500. Repräsentative Schnitte durch die Retina zeigen eine Färbung der Zapfen bei Verwendung der Antiseren. Diese Färbung fehlt vollständig bei Verwendung der Präimmunseren. GCL=Ganglienzellschicht; INL=innere Körnerschicht; ONL=äußere Körnerschicht; IS=Innensegmente der Photorezeptoren; OS=Außensegmente der Photorezeptoren. Durchgeführt von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für experimentelle Ophthalmologie des Forschungsinstituts für Augenheilkunde in Tübingen.

4.7 Analyse des retinalen Phänotyps

Auf Grund der physiologischen Funktion der inhibitorischen γ -Untereinheit der Zapfen-PDE in der Phototransduktion und des von Tsang et al. publizierten retinalen Phänotyps der *Pde6g-knockout*-Maus (Tsang et al. 1996) lag zunächst die Annahme nahe, dass die Deletion von *Pde6h* in der Maus zu einer veränderten Morphologie und Funktionalität der Netzhaut beziehungsweise der Zapfen führen könnte. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden verschiedene funktionelle und morphologische Netzhautanalysen an *Pde6h^{-/-}*-Mäusen durchgeführt.

4.7.1 Immunhistochemische Analyse

Zur Analyse der Netzhautmorphologie wurden Retinae von *Pde6h^{-/-}*-Tieren mit immunhistochemischen Methoden untersucht. Die Herstellung und Fixierung der Gewebeschnitte sowie die immunhistochemischen Analysen wurden freundlicherweise von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für experimentelle Ophthalmologie des Forschungsinstituts für Augenheilkunde in Tübingen durchgeführt. Retinae der *Pde6h^{-/-}*-Tiere im Alter von 4 Wochen wurden geschnitten und fixiert. Die Schnitte wurden entweder mit Hämatoxylin-Eosin für Übersichtsanalysen gefärbt oder nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen zunächst mit den entsprechenden Antikörpern (Anti-CNGB3, Anti-Pde6h, Anti-rot/grün-Opisin und Anti-blau-Opisin) inkubiert, anschließend mit einem mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und einer Kernfärbung mit DAPI unterzogen. In der Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsanalyse fanden sich keine morphologischen Auffälligkeiten der *Pde6h^{-/-}*-Tiere (Abbildung 4.38). Zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen standen allerdings noch keine wildtyp-Wurfkontrollen zur Verfügung, so dass die genaue vergleichende Analyse der Morphologie mit wildtyp-Kontrolltieren noch aussteht.

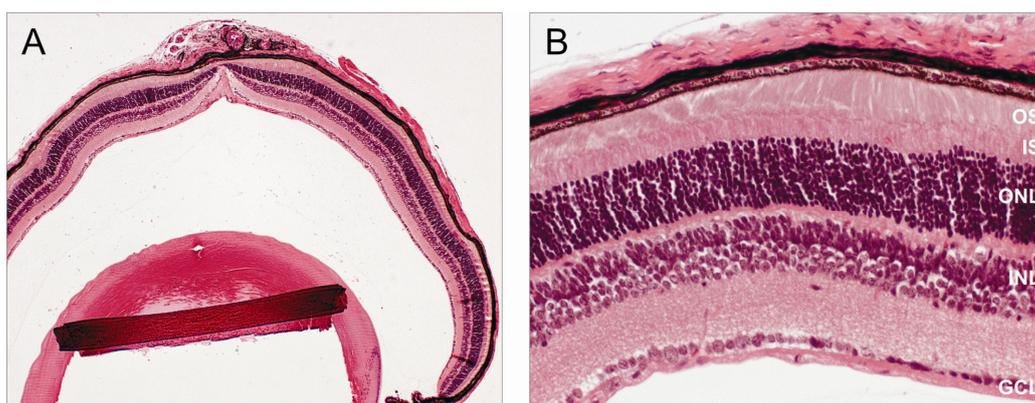


Abbildung 4.38: Immunhistochemische Analyse von *Pde6h^{-/-}*-Retinae

Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Gewebeschnitts aus *Pde6h^{-/-}*-Retina. (A) Übersichtsaufnahme der Retina. (B) Repräsentativer, vergrößerter Ausschnitt aus (A). Es sind keine Auffälligkeiten zu erkennen, welche auf eine Netzhautdegeneration oder Netzhautschäden hindeuten würden.

GCL=Ganglienzellschicht; INL=innere Körnerschicht; ONL=äußere Körnerschicht; IS=Innensegmente der Photorezeptoren; OS=Außensegmente der Photorezeptoren.

Durchgeführt von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für experimentelle Ophthalmologie des Forschungsinstituts für Augenheilkunde in Tübingen.

In der Immunfluoreszenz fanden sich bei der Zapfen-Färbung mit Antikörpern gegen CNGB3, rot/grün-Opisin sowie blau-Opisin ebenfalls weder Anzeichen für eine Netzhautdegeneration noch andere offensichtliche Defekte der Photorezeptoren (Abbildung 4.39 A,C,D). Allerdings standen zum Zeitpunkt der Untersuchung noch keine wildtyp-Wurfskontrollen zur Verfügung, so dass auch hier noch vergleichende Untersuchungen ausstehen. Mit Hilfe des Anti-Pde6h-Antikörpers konnte die Abwesenheit der inhibitorischen γ -Untereinheit der Phosphodiesterase in Zapfen bestätigt werden, womit die erfolgreiche Pde6h-Gendeletion auch auf Proteinebene nachgewiesen ist (Abbildung 4.39 B).

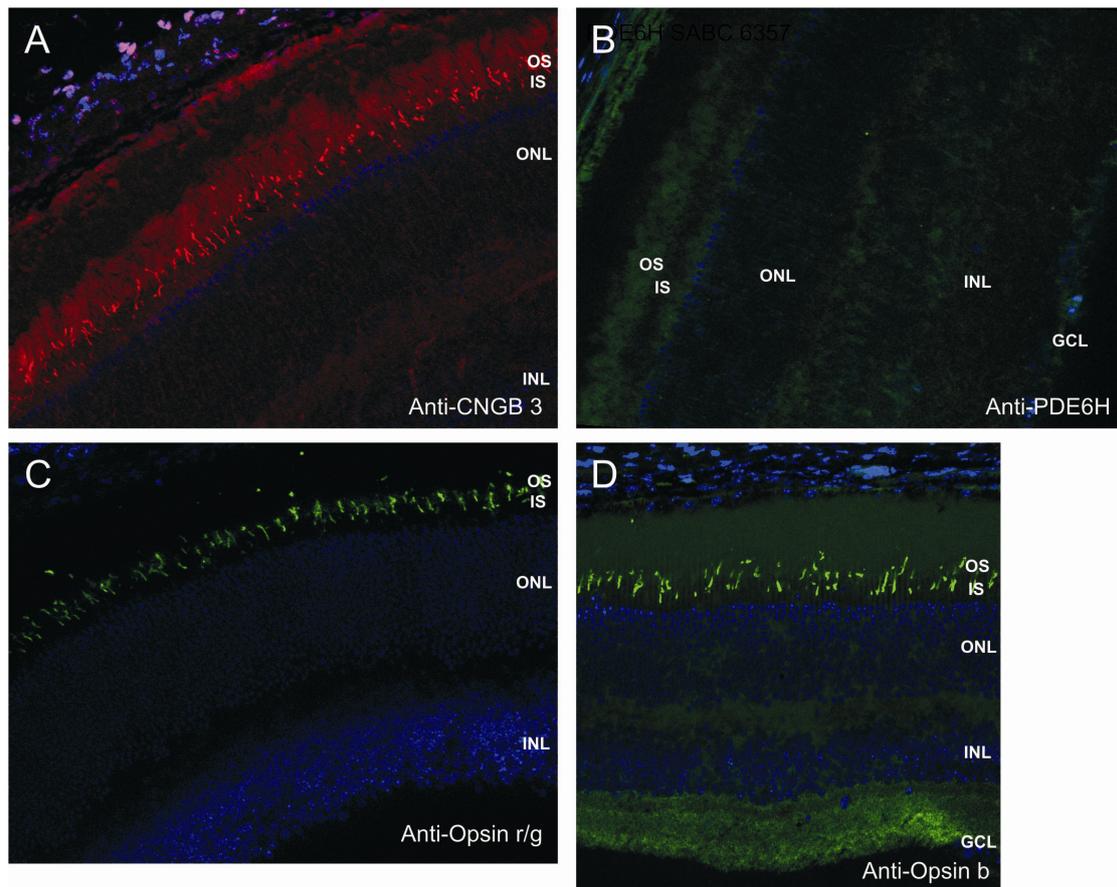


Abbildung 4.39: Immunfluoreszenz-Analyse von Pde6h^{-/-}-Retinae

Immunfluoreszenz-Färbung retinaler Schnitte von Pde6h^{-/-}-Mäusen im Alter von 4 Wochen mit einem Antikörper gegen (A) CNGB3 (Verdünnung 1:400, rot), (B) Pde6h (Verdünnung 1:1000, grün), (C) rot/grün-Opisin (Verdünnung 1:200, grün), (D) blau-Opisin (Verdünnung 1:200, grün) sowie einer DAPI-Färbung (A-D, blau) zur Visualisierung der Zellkerne. Die genetische Ablation von Pde6h resultiert in einem Verlust der inhibitorischen γ -Untereinheit der Zapfen (B) bei unveränderter Anwesenheit und Morphologie der Zapfen (A, C, D).

GCL=Ganglienzellschicht; INL=innere Körnerschicht; ONL=äußere Körnerschicht; IS=Innensegmente der Photorezeptoren; OS=Außensegmente der Photorezeptoren.

Durchgeführt von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für experimentelle Ophthalmologie des Forschungsinstituts für Augenheilkunde in Tübingen.

4.7.2 Visuelle Funktionsanalyse mittels Elektretinogramm

Die Sehfunktion der Mäuse wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Seeliger (AG Neurodegeneration des Auges, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Tübingen) untersucht. Durch Ganzfeld-ERGs wurde die elektrische Antwort von Photorezeptoren der gesamten Retina auf Lichtreize verschiedener Intensitäten gemessen. Im Blitz-ERG wird die gesamte Retina durch Lichtreize aktiviert und die resultierenden elektrischen Antworten bestimmt. Bei Dunkeladaption (über Nacht, skotopische Bedingungen) dient es der Beurteilung der Stäbchenfunktion, bei vorheriger Helladaption zur Absättigung der Stäbchen (Lichtadaption bei 30cd/m^2 für 10 min; photopische Bedingungen) als Funktionstest der Zapfen. Im Flimmer-ERG werden Lichtblitze einer bestimmten Intensität in verschiedenen Frequenzen dargeboten. Bei hohen Frequenzen ab ca. 5 Hz können die langsameren Stäbchen den Reizen nicht mehr folgen, so dass auch hier spezifisch Zapfensignale gemessen werden. Unter Verwendung einer geringen Lichtintensität (Dunkel-Flimmer-ERG) kann mit dieser Methode jedoch auch das Stäbchen-System analysiert werden. Charakteristische Größen des Elektretinogramms sind die a- und die b-Welle. Bei Dunkeladaption erkennt man bei niedriger Blitzintensität nur die positive b-Welle, die die elektrische Aktivität der Bipolarzellen widerspiegelt. Die a-Welle ist ein negativer Ausschlag, der erst bei höheren Blitzintensitäten vor der b-Welle erscheint. Die a-Welle wird der Signaltransduktionskaskade in den Photorezeptoren zugeschrieben.

Die Elektretinogramme wurden binokular wie von Seeliger und Tanimoto (Seeliger et al. 2001; Tanimoto et al. 2009) beschrieben an anästhesierten Mäusen mit dilatierten Pupillen durchgeführt. Pde6h^{-/-}-Mäuse sowie wildtyp-Wurfgeschwister im Alter von 4-5 Monaten wurden sowohl dunkel- als auch helladaptiert elektretinographischen Untersuchungen mittels Blitz- (Abbildung 4.40) und Flimmer-ERGs (Abbildung 4.41) unterzogen.

Bei keiner der durchgeführten Messungen konnte ein signifikanter Unterschied der Netzhautfunktion zwischen Pde6h^{-/-}-Mäusen und ihren Wurfgeschwister-Kontrollen festgestellt werden. Die Hypothese der Entwicklung einer Netzhautfunktionsstörung bzw. einer Funktionsstörung spezifisch des Zapfensystems durch Verlust der inhibitorischen γ' -Untereinheit der Zapfen-PDE wurde somit zumindest bei Mäusen im Alter von vier bis fünf Monaten nicht bestätigt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte beispielsweise eine kompensatorische Expression von Pde6g in Pde6h^{-/-}-Zapfen sein, so dass die inhibitorische Untereinheit der Stäbchen-PDE die Funktion des fehlenden Proteins übernehmen könnte und somit die retinale Funktionalität trotz Deletion von Pde6h erhalten bleibt.

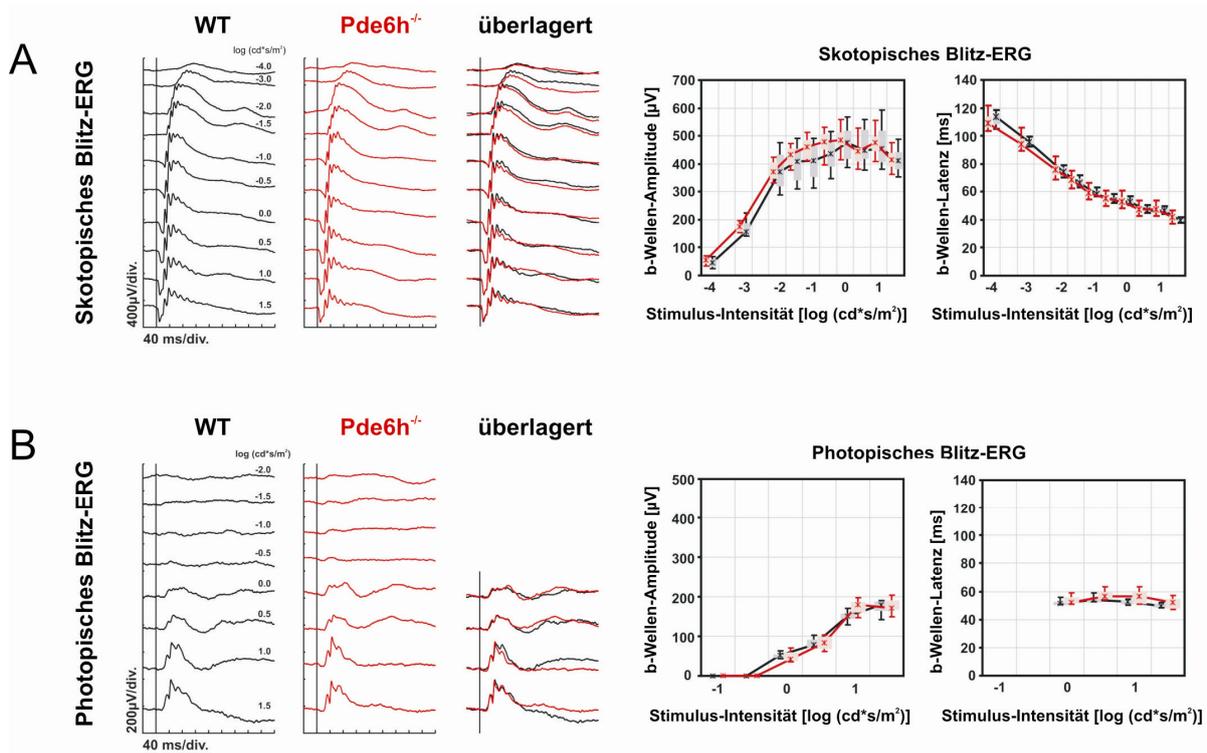


Abbildung 4.40: Blitz-Elektroretinogramme von wildtyp- und $Pde6h^{-/-}$ -Mäusen

Links: repräsentative Antworten der ERG-Messungen jeweils einer Maus und Überlagerung beider Messungen; die senkrechte Linie zeigt den Zeitpunkt des Lichtblitzes an. Rechts: statistische Gesamtauswertung der b-Wellen-Amplitude bzw. der b-Wellen-Latenz in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke. (A) Die Stimulus-Intensität des Lichtblitzes unter skotopischen Bedingungen betrug -4,0 bis 1,5 $\log cd*s/m^2$. (B) Die Stimulus-Intensität des Lichtblitzes unter photopischen Bedingungen betrug -2,0 bis 1,5 $cd*s/m^2$. Statistische Auswertung: Box-Whisker-Plot. Die Rechtecke zeigen die 25% und 75%-Quantilbreite; Whisker (senkrechte Striche) indizieren die 5% und 95%-Quantile; durchgezogene Linien verbinden die Mediane der Daten (rot: $Pde6h^{-/-}$ (n=4); schwarz: WT (n=4)). Unter photopischen und unter skotopischen Bedingungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen wildtyp und *knockout* detektiert werden.

Durchgeführt von Dr. Naoyuki Tanimoto; AG „Neurodegeneration des Auges“, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Tübingen.

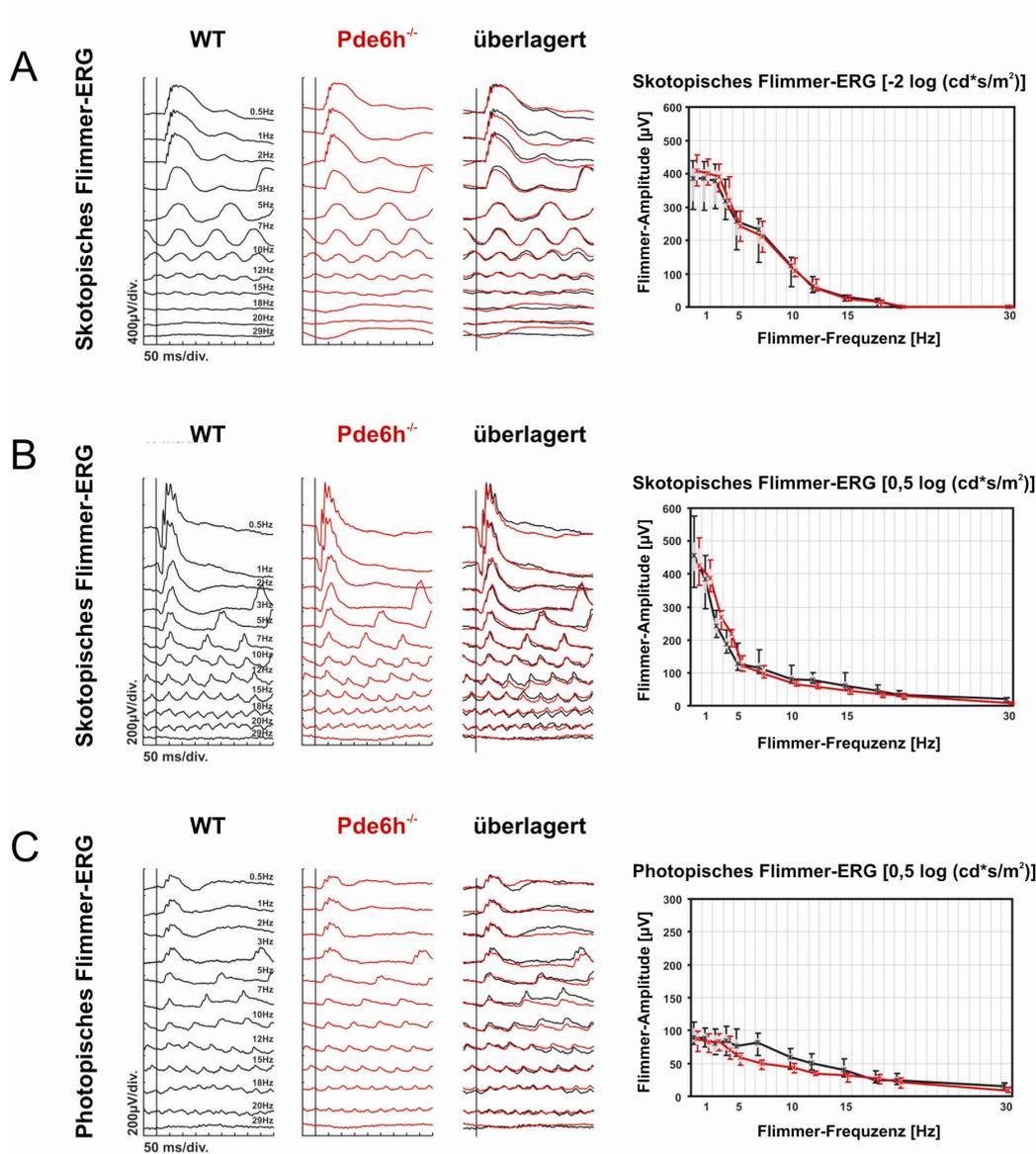


Abbildung 4.41: Flimmer-Elektroretinogramme von wildtyp- und *Pde6h*^{-/-}-Mäusen

Links: repräsentative Antworten der ERG-Messungen jeweils einer Maus und Überlagerung beider Messungen; die senkrechte Linie zeigt den Zeitpunkt des Lichtblitzes an. Rechts: statistische Gesamtauswertung der Flimmer-Amplituden in Abhängigkeit von der Flimmer-Frequenz. Messung der Antworten im Flimmer-ERG mit gleichbleibender Lichtintensität (skotopisch $-2 \log \text{cd}^* \text{s/m}^2$ (A) und $0,5 \log \text{cd}^* \text{s/m}^2$ (B) sowie photopisch $0,5 \log \text{cd}^* \text{s/m}^2$ (C) bei 12 verschiedenen Frequenzen (0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 10; 12; 15; 18; 20 und 30 Hz). Statistische Auswertung: Box-Whisker-Plot. Die Rechtecke zeigen die 25% und 75%-Quantilbreite; Whisker (senkrechte Striche) indizieren die 5% und 95%-Quantile; durchgezogene Linien verbinden die Mediane der Daten (rot: *Pde6h*^{-/-} (n=4); schwarz: WT (n=4)). Unter photopischen und unter skotopischen Bedingungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen wildtyp und *knockout* detektiert werden.

Durchgeführt von Dr. Naoyuki Tanimoto; AG „Neurodegeneration des Auges“, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Tübingen.

4.7.3 *in vivo* morphologische Analysen mittels SLO und OCT

Bei der Scanning Laser Ophthalmoskopie (SLO) und der optischen Kohärenztomographie (*optical coherence tomography*, OCT) handelt es sich um nichtinvasive Verfahren zur Analyse der Netzhautstruktur. So können über die Reflexion von Lichtstrahlen an Netzhautstrukturen die retinale Topographie analysiert, die retinale Struktur im Detail untersucht und beispielsweise die Dicke der verschiedenen Netzhautschichten gemessen werden. Das Grundprinzip des SLO besteht in einer sequentiellen Abtastung des Augenhintergrundes mit einem schwachen Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge, wobei das dabei reflektierte Licht registriert wird. Somit wird eine Darstellung konfokaler horizontaler Schnitte ermöglicht, diese weisen aber eine geringe Tiefenauflösung auf. Auch die OCT verwendet einen schwachen kohärenten Infrarot-Laser zur Analyse der reflektiven Eigenschaften einer Probe. Die Netzhaut wird mit Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs beleuchtet und das reflektierte Licht wird mit einem Spektrometer gemessen. In einem Interferometer wird das zurückgestreute Licht aus dem Probenarm mit Licht aus einem Referenzarm überlagert. Licht, das in tieferen Schichten reflektiert wird, ist länger unterwegs als Licht, das in den oberen Schichten der Netzhaut reflektiert wird. Diese Zeitverzögerung kann gemessen und ausgewertet werden. Über die Veränderung der Referenzarmlänge kann man dabei Punkt für Punkt in die Tiefe scannen, und durch mehrere nebeneinander gelegene Tiefenscans erhält man Schnittbilder. Dabei können Tiefenprofile, welche eine der Histologie vergleichbare Auflösung biologischer Gewebestrukturen aufweisen, erhalten werden.

Die *in vivo* morphologischen Analysen von Pde6h^{-/-}-Mäusen und wildtyp-Wurfskontrollen im Alter von 4-5 Monaten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Seeliger (AG Neurodegeneration des Auges, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Tübingen) nach den von Fischer et al. und Huber et al. beschriebenen Methoden durchgeführt (Fischer et al. 2009; Huber et al. 2009). Auch bei diesen Untersuchungen konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen wildtyp- und Pde6h^{-/-}-Tieren detektiert werden (Abbildung 4.42).

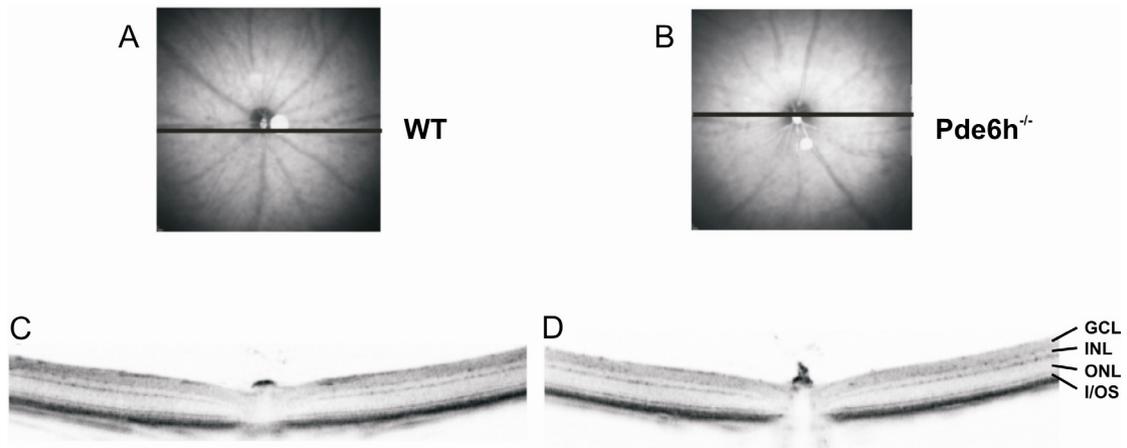


Abbildung 4.42: *in vivo*-Morphologie von wildtyp- und Pde6h^{-/-}-Mäusen

(A) und (C) Repräsentatives Beispiel der retinalen Morphologie bei wildtyp-Kontrolltieren. (B) und (D) Repräsentatives Beispiel der retinalen Morphologie bei Pde6h^{-/-}-Mäusen. (A,B) *En face* Bildgebung (SLO) unter Verwendung des nativen HRA2 Infrarot-Modus (815 nm). (C,D) Korrespondierende OCT-Daten. Die OCT- und SLO-Daten ergaben keinen Unterschied zwischen wildtyp- und Pde6h^{-/-}-Tieren. GCL=Ganglienzellschicht; INL=innere Körnerschicht; ONL=äußere Körnerschicht; I/OS=Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren.

Durchgeführt von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Neurodegeneration des Auges“, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Tübingen.

5 Ergebnisse II (Kcnc2-knockout-lacZ-knockin)

5.1 Vorarbeiten

5.1.1 *knockout*-Strategie

Den im Abschnitt 3.3 beschriebenen zellkulturtechnischen Arbeiten zur Generierung einer *Kcnc2-knockout*-Maus lag ein von Prof. Dr. Bernd Wissinger (Molekulargenetisches Labor der Universitätsaugenklinik Tübingen) generiertes Targeting-Konstrukt zu Grunde. Die Strategie zur Deletion des *Kcnc2*-Gens war grundsätzlich angelehnt an die im vorhergehenden Kapitel beschriebene Strategie des *Pde6h-knockouts*. Für die Entwicklung des Targeting-Konstruktes wurde zunächst die Genstruktur von *Kcnc2* durch Datenbankrecherche ermittelt. Das insgesamt zwei Exone umfassende Gen der Länge 14,6 kb befindet sich auf Chromosom 19 der Maus, die messenger-RNS erstreckt sich über 5092 bp und kodiert für das 562 Aminosäuren umfassende Protein. Durch virtuelle Restriktionsanalyse der DNS-Sequenz wurden im Labor von Prof. Wissinger geeignete Schnittstellen für die Generierung des gewünschten Konstrukts identifiziert und daraus die *knockout*-Strategie entwickelt. Hierbei sollte die kodierende Sequenz des *Kcnc2*-Gens passgenau durch das *lacZ*-Gen ersetzt werden, sodass letzteres unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert und gleichzeitig der konstitutive *knockout* des *Kcnc2*-Gens generiert wird. Durch Analyse der Expression von *lacZ* in verschiedenen Geweben der *knockout*-Mäuse kann somit indirekt die Expression von *Kcnc2* untersucht werden, eine konditionale Deletion des *Kcnc2*-Gens ist bei dieser Methode allerdings nicht möglich.

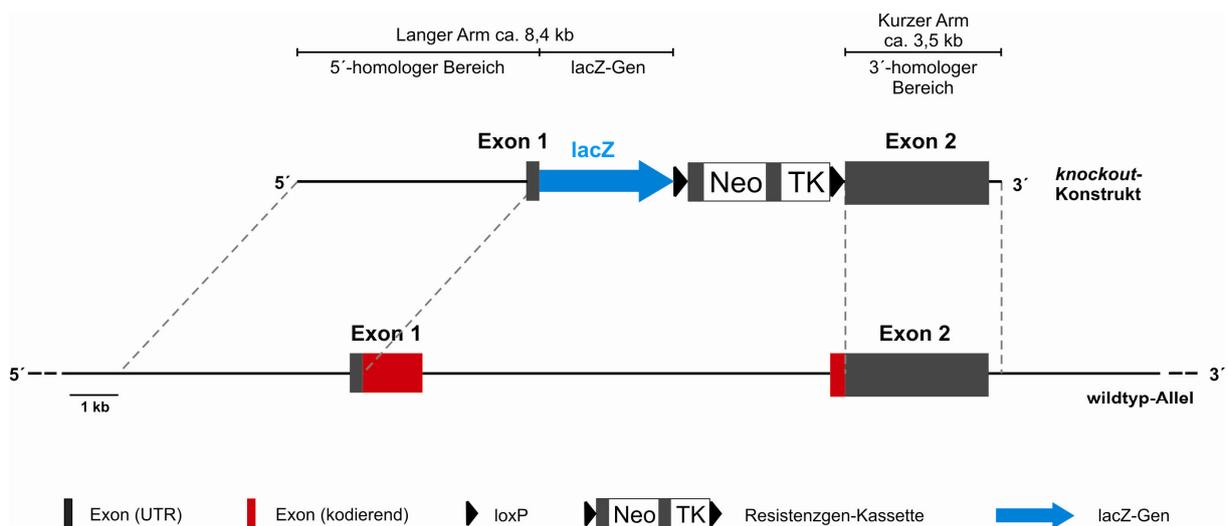


Abbildung 5.1: Aufbau des *Kcnc2-knockout*-Konstrukts

Schematische Darstellung des *Kcnc2-knockout*-Konstrukts im Vergleich zu einem wildtyp-Allel. Die codierenden Bereiche der Exone 1 und 2 wurden passgenau durch das *lacZ*-Gen ersetzt.

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung des Targeting-Konstrukts wurde der BAC-Klon BMQ_176K16 (aus einer 129SV-Klonbank von Geneservice) und das Plasmid pSV- β Gal

verwendet. Der kurze und der lange Arm der homologen Rekombination sowie das lacZ-Gen wurden mittels PCR mit einer *high fidelity proofreading* Polymerase (PfuUltra HF) aus dem entsprechenden Template generiert sowie sequenziert und in mehreren Teilschritten schließlich in das *knockout*-Basiskonstrukt (pBSloxPNeoTKloxP, siehe 4.1.2) inkloniert. Das finale Konstrukt im Vergleich zum wildtyp-Allel ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Dieses Targeting-Konstrukt sollte nun ebenfalls mittels Elektroporation in embryonale Stammzellen von Mäusen eingebracht und durch homologe Rekombination ins Genom der Stammzellen integriert werden.

5.1.2 Nachweis der homologen Rekombination

Für die vereinfachte Vorprüfung von Stammzellklonen mit homologer Rekombination wurde im Labor von Prof. Wissinger eine Long Distance-PCR über den kurzen Arm des Konstrukts etabliert (Abbildung 5.2) und an einem Konstrukt mit „verlängertem Arm“ überprüft. Dabei liegt ein Primer außerhalb und ein Primer innerhalb des homologen Bereichs des Konstruktes, sodass nur dann ein Amplikon der richtigen Größe (3736 bp) gebildet werden kann, wenn das Targeting-Konstrukt an der richtigen Stelle ins Genom integriert wurde. Somit mussten nur PCR-positive Klone mittels Southern Blot-Hybridisierung näher untersucht werden. Für diese Analysen wurden nach den unter 4.1.3 beschriebenen Anforderungen Restriktionsenzyme für den 5'-, den 3'- und den Neo-Nachweis ausgewählt und die entsprechenden Sonden kloniert und an wildtyp-DNS getestet. Die Sonden wurden mittels PCR generiert und in einen pCR[®]2.1-TOPO[®] kloniert, aus dem die Sonden-DNS durch Restriktionsverdau mit EcoR I gewonnen werden konnte. Der Nachweis der homologen Rekombination auf der 5'-Seite wurde mit dem Restriktionsenzym BamH I geplant. Im Wildtyp ergibt sich hierbei ein Fragment der Länge 23,6 kb, welches mit der 5'-Sonde detektiert werden kann und nach homologer Rekombination auf 9,2 kb verkürzt ist. Analog dazu dient EcoR V zum Nachweis der Rekombination auf der 3'-Seite, das wildtyp-Fragment der Länge 6,5 kb wird auf 4,2 kb verkürzt. Die Überprüfung auf Einfachintegration mit der Neo-Sonde erfolgte ebenfalls mit BamH I, hier sollte bei korrekter Integration ein Fragment der Länge 11,2 kb entstehen. Abbildung 5.2 zeigt eine Übersicht über die einzelnen Nachweise der homologen Rekombination.

5.1.3 Nachweis der Cre-Rekombination

Nach Transfektion mit der Cre-Rekombinase und Selektion mit Ganciclovir im 2. Targeting sollten beim *Kcnv2-knockout*-Konstrukt nur noch L1-Klone vorhanden sein. Zur Identifizierung dieser Zellklone wurde ebenfalls im Labor von Prof. Wissinger eine Southern Blot-Nachweisstrategie entwickelt. Durch Verdau mit dem Restriktionsenzym BamH I und Hybridisierung mit der 3'-Sonde aus dem 1. Targeting ergibt sich im Wildtyp ein Fragment der Länge 23,6 kb, welches sich auf 6,5 kb bei L1-Klonen verkürzt (Abbildung 5.3).

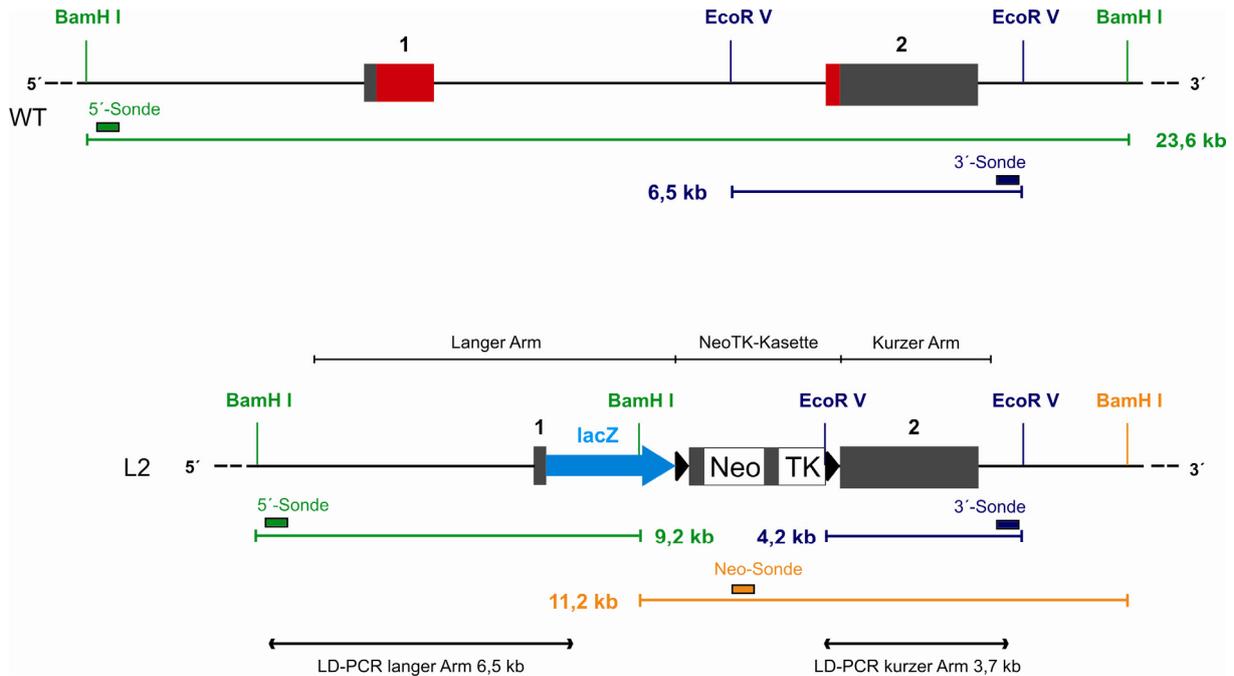


Abbildung 5.2: Übersicht über die Nachweise der homologen Rekombination

Dargestellt ist die Genarchitektur eines wildtyp-Allels (oben) im Vergleich zu einem homolog rekombinierten Allel (unten) mit allen Southern- und PCR-Nachweisen. Erklärungen im Text.

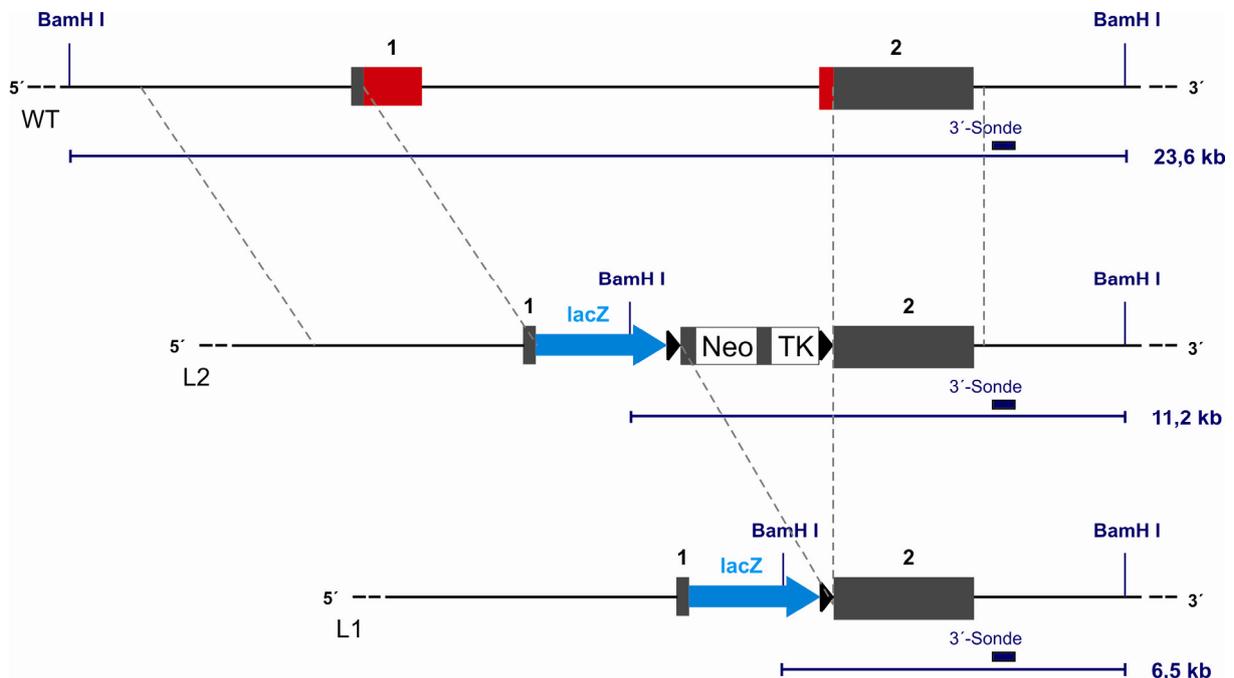


Abbildung 5.3: Nachweis der Cre-Rekombination im 2. Targeting

Die Abbildung zeigt die Genarchitektur eines wildtyp-Allels (WT) im Vergleich zu einem Allel mit homologer Rekombination (L2) und einem Allel mit konstitutivem *Kcnv2-knockout-lacZ-knockin* (L1). Mit BamHI und der 3'-Sonde aus dem 1. Targeting können die entsprechenden Zellklone identifiziert werden.

5.2 Testung der Sonden

Die von Wissinger klonierten und für die Anwendung im Southern Blot etablierten Sonden wurden unter den unter 3.2.10 beschriebenen Bedingungen nochmals auf Reproduzierbarkeit getestet.

Die 5'-Sonde mit einer Länge von 450 bp soll außerhalb des rekombinanten Bereichs binden und nach Southern-Hybridisierung in mit BamH I verdauter wildtyp-DNS spezifisch eine Bande der Größe 23,6 kb detektieren. Zum Test wurde wildtyp-ES-DNS nach dem unter 3.2.10 beschriebenen Protokoll mit BamH I verdaut, geblottet und mit der durch Gelextraktion aufgereinigten und radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Die Sonde ergab reproduzierbar auch unter den für die vorliegende Arbeit verwendeten Bedingungen ein Signal auf der richtigen Höhe und wurde daher für das Screening der ES-Zellen verwendet.

Auch die 3'-Sonde mit der Länge 330 bp bindet außerhalb des rekombinanten Bereichs und dient zum Nachweis eines 6,5 kb-Fragments im Wildtyp nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease EcoR V. Zum Test wurde wildtyp-DNS mit EcoR V verdaut, geblottet und mit der markierten 3'-Sonde hybridisiert. Hierbei zeigte sich ebenfalls reproduzierbar ein Signal der gewünschten Länge, sodass auch diese Sonde für die Analyse der ES-Zellen verwendet wurde (Abbildung 5.4).

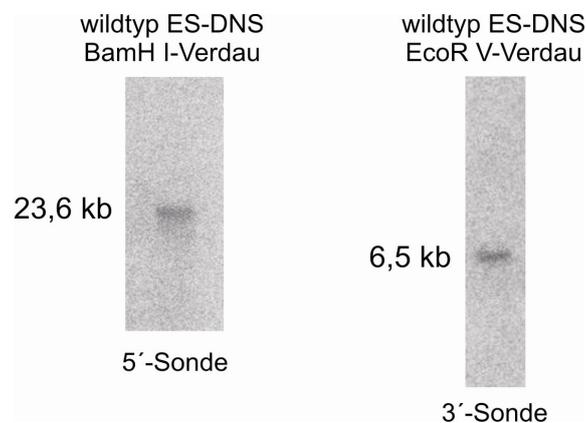


Abbildung 5.4: Testung der Sonden

Test der 5'-Sonde (links) beziehungsweise der 3'-Sonde (rechts) an wildtyp-DNS von embryonalen Stammzellen.

5.3 Gentechnische Modifikation embryonaler Stammzellen

5.3.1 Das 1. Targeting

5.3.1.1 Embryonale Stammzellkultur

Das 1. Targeting des Kcnv2-Konstrukts wurde mit embryonalen Stammzellen von Mäusen der Linie R1 in Passage 14 begonnen. Die Stammzellen wurden auf eine 25 cm²-Flasche ausgesät, zur weiteren Vervielfältigung nochmals auf eine weitere 25 cm²-Flasche passagiert und anschließend nach Protokoll bis zur Elektroporation kultiviert. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach den unter 3.3.5 beschriebenen Methoden. Das Kcnv2-Targeting-Konstrukt wurde mit Not I linearisiert und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender ethanolischer Fällung aufgereinigt. 50 µg des linearisierten Konstrukts wurden mit den durch Trypsinierung vereinzelt Stammzellen aus der 75 cm²-Flasche in einer Elektroporationsküvette gemischt und die Suspension dem Spannungspuls unterzogen. Die Zeitkonstante T_{const} betrug 10,2 msec; der Kontrollwert mit PBS erreichte einen Wert von $T_{\text{const}} = 6,8$ msec. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Stammzellen in Passage 17. Das Konstrukt sollte sich nun auf Grund der homologen Bereiche an die genomische DNS der Stammzellen anlagern und durch *crossing over* an der gewünschten Stelle ins Genom integriert werden. 24 Stunden nach der Elektroporation wurde das ES-LIF-Medium durch G418-haltiges Medium ersetzt, um die Positivselektion von Stammzellen mit integrierter NeoTK-Kassette zu ermöglichen. Ab Tag 8 nach Selektionsstart konnten Zellklone mit optimalem Aussehen und geeigneter Größe isoliert werden. Innerhalb von 3 Tagen wurden insgesamt 1296 Klone „gepickt“ und nach weiterer Kultivierung evaluiert. Es zeigten sich hierbei 791 Klone (entsprechend 61% der isolierten Klone) mit gelber bzw. roter Beurteilung. Von jedem Klon wurden insgesamt vier Kopien generiert, wobei eine Kopie zur Sicherung bei -80°C eingefroren und die restlichen Zellen zunächst lysiert und anschließend die DNS isoliert wurde.

Jeder der 1296 Klone wurde mit Hilfe der unter 5.1.2 beschriebenen Long Distance-PCR auf homologe Rekombination auf der 3'-Seite überprüft. Für das weitere Screening der in dieser Untersuchung positiven Klone wurde eine zweite Long Distance-PCR über den langen Arm des Konstrukts etabliert (Abbildung 5.2) und die entsprechenden Klone weiter untersucht. Zusätzlich wurden alle in der 3'-PCR positiven Klone mittels der unter 5.1.2 beschriebenen Southern-Nachweise auf homologe Rekombination und Einfachintegration kontrolliert.

5.3.1.2 Voranalyse mittels Long Distance-PCR

Für den 3'-Nachweis wurde die DNS von jedem der 1296 Klone wie unter 3.2.2.1 beschrieben isoliert und zunächst immer zwei verschiedene Klone einer 96-Loch-Platte in einem PCR-Ansatz als Template gemischt und diese Mischung dem PCR-Protokoll unterzogen (3.2.8.3). Proben, bei denen in der Gelelektrophorese eine Bande der richtigen Größe zu sehen war, wurden nochmals einzeln untersucht und so die einzelnen PCR-positiven Klone identifiziert (Beispielgele siehe Abbildung 5.5). Als Kontroll-Template kam das Plasmid mit „verlängertem kurzem Arm“ zum Einsatz, an dem die PCR auch etabliert wurde. Insgesamt zeigten sich bei diesem Massenscreening 19 Klone mit PCR-geprüfter 3'-homologer Rekombination.

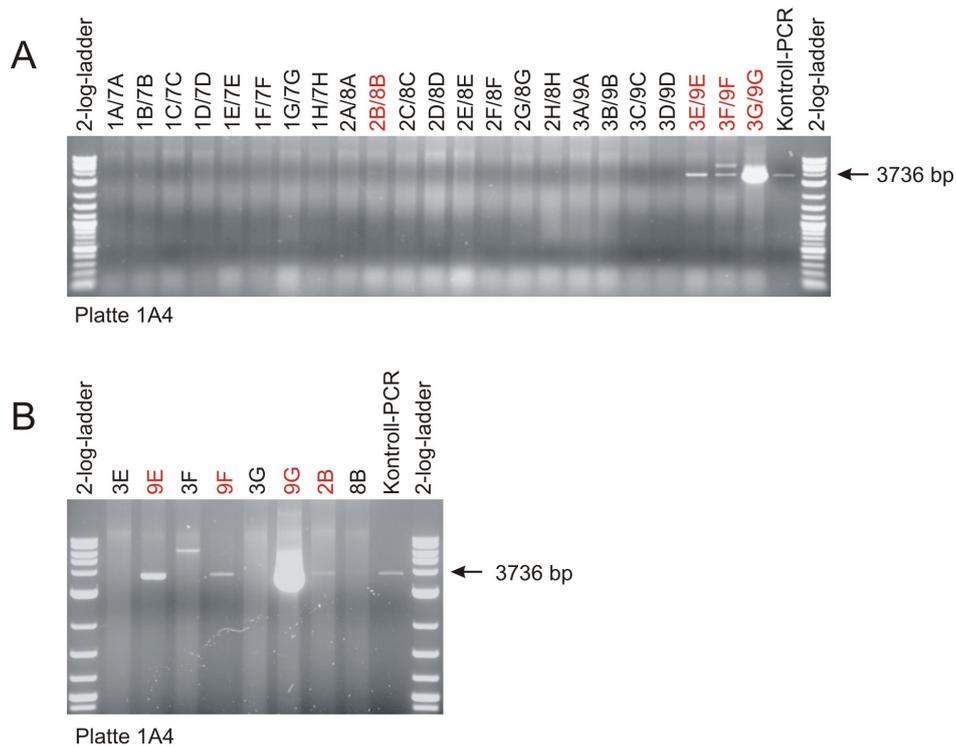


Abbildung 5.5: Long Distance-PCR-Screening über den kurzen Arm

(A) Beispiel der Voruntersuchung von Klonen der Platte 1A4 mittels LD-PCR über den kurzen Arm; als Template für die einzelnen Ansätze wurde eine DNS-Mischung aus zwei Klonen verwendet. Klone für das Einzelscreening sind rot hinterlegt. (B) Einzelscreening der positiven Klonmischungen aus (A). Eindeutig als richtig identifizierte Klone sind rot hinterlegt.

Alle 19 Klone mit der gesuchten 3736 bp-Bande (Tabelle 5.1) wurden anschließend mit einer 5'-Long Distance-PCR weiter analysiert. Hierfür musste zunächst ein PCR-Protokoll über den langen Arm des Targeting-Konstrukts etabliert werden. Auch hier bindet der eine Primer außerhalb und der zweite innerhalb des homologen Bereichs, und bei Rekombination an gewünschter Stelle entsteht ein Amplikon der Länge 6533 bp. Zur Etablierung der Methode wurden Klone, die im 3'-Screening eine Bande der richtigen Größe aufwiesen, gemischt als Template für eine Gradienten-PCR eingesetzt. Es zeigten sich in der Gelelektrophorese bei verschiedenen Annealing-Temperaturen Banden der erwarteten Größe (Abbildung 5.6), und eine Annealing-Temperatur von 59°C wurde für die weitere Analyse der Stammzell-DNS festgelegt.

Bei der Untersuchung mittels Long Distance-PCR über die 5'-Seite waren bei insgesamt 7 der analysierten Klone Banden der Länge von ca. 6,5 kb zu detektieren (Abbildung 5.7).

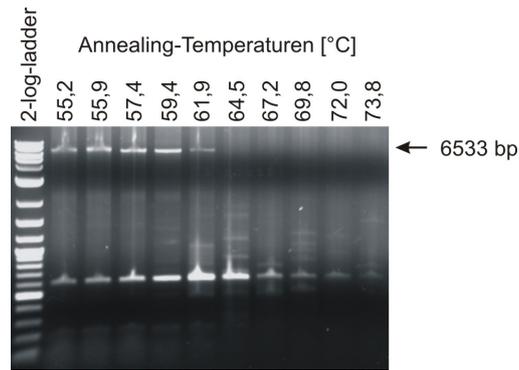


Abbildung 5.6: Etablierung einer LD-PCR über den langen Arm

Dargestellt ist das Ergebnis der Gradienten-PCR mit 10 verschiedenen Annealing-Temperaturen und einer Mischung aus 3'-PCR positiven Klonen als Template. Annealing-Temperaturen von 55°C bis 62°C ermöglichen die Bildung eines Fragments der richtigen Größe.

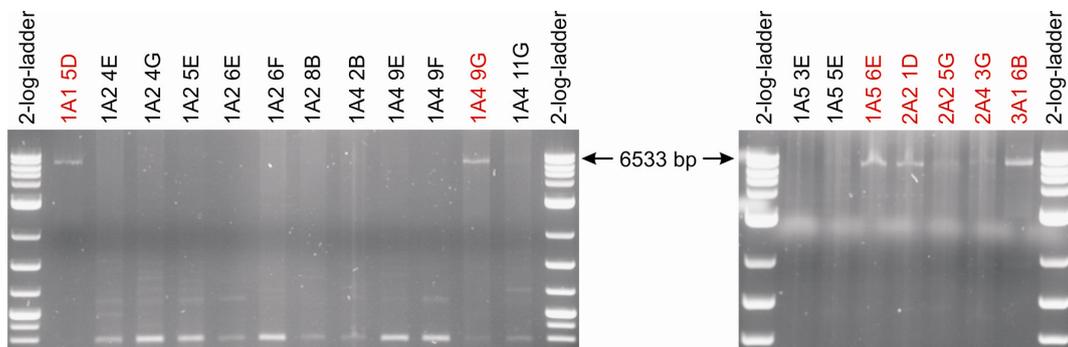


Abbildung 5.7: Long Distance-PCR-Screening über den langen Arm

Einzelscreening der 3'-PCR positiven Klone mittels LD-PCR über den langen Arm. Klone mit Amplikon der richtigen Größe sind rot hinterlegt.

5.3.1.3 Kontrolle der 5'-homologen Rekombination mittels Southern-Hybridisierung

Zum endgültigen Nachweis der homologen Rekombination wurden anschließend alle Klone mit einem positiven 3'-PCR-Nachweis zusätzlich durch Southern-Hybridisierung untersucht. Hierzu wurde die DNS zunächst mit dem Restriktionsenzym BamH I verdaut und geblottet. Nach Hybridisierung mit der radioaktiv markierten 5'-Sonde entsteht nach korrekter Rekombination ein Fragment des wildtyp-Allels mit 23,6 kb und ein Fragment des rekombinanten Allels mit 9,2 kb. In Abbildung 5.8 ist der Blot dieser Southern-Hybridisierung zu sehen, insgesamt 5 der analysierten Stammzellklone wiesen die gewünschten Banden auf.

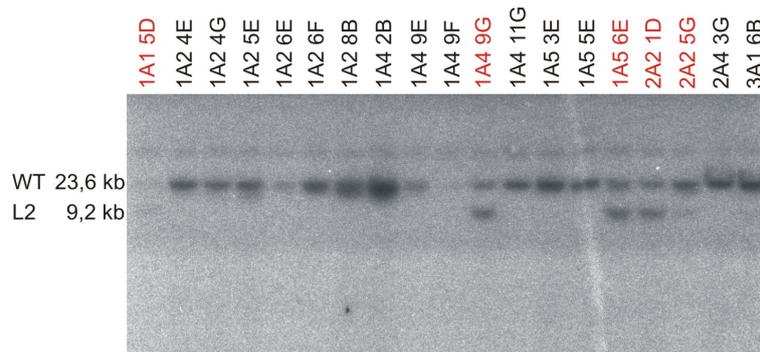


Abbildung 5.8: Nachweis 5'-homologe Rekombination mit der 5'-Sonde

Southern Blot-Analyse aller Klone mit positivem 3'-PCR-Nachweis. Die 23,6 kb-Bande entspricht dem Wildtyp, die 9,2 kb-Bande einem auf der 5'-Seite homolog rekombinierten Allel. Rot gekennzeichnete Klone weisen eine homologe Rekombination auf der 5'-Seite auf.

5.3.1.4 Kontrolle der Einfachintegration mittels Southern-Hybridisierung

Parallel zur Analyse der 5'-homologen Rekombination wurden dieselben Klone durch Verdau mit BamH I und Hybridisierung mit der Neo-Sonde auf Einfachintegration untersucht. Hier ist bei einmaliger Integration des Konstrukts mit einer Bande der Länge 11,2 kb zu rechnen, Klone mit mehreren Signalen oder mit einem Signal der falschen Größe wurden nicht weiter verwendet. Bei vier Klonen war eine singuläre Bande der gewünschten Größe zu sehen (Abbildung 5.9).

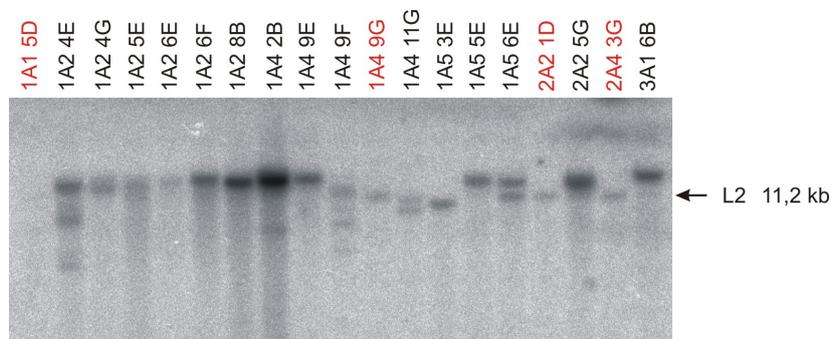


Abbildung 5.9: Nachweis der Einfachintegration mit der Neo-Sonde

Southern Blot-Analyse aller Klone mit positivem 3'-PCR-Nachweis. Die 11,2 kb-Bande entspricht einer Einfachintegration des Targeting-Konstrukts an richtiger Stelle. Klone mit einer Bande der falschen Größe (z.B. 1A5 5E) oder zwei Banden (z.B. 1A5 6E) werden nicht weiter verwendet. Rot gekennzeichnete Klone weisen eindeutig eine Einfachintegration auf.

5.3.1.5 Kontrolle der 3'-homologen Rekombination mittels Southern-Hybridisierung

Im letzten Schritt wurde die ES-Zell-DNS der Klone mit positiver 3'-LD-PCR mit der 3'-Sonde näher untersucht. Die DNS wurde nach Isolation mit EcoR V verdaut und geblottet. Nach Hybridisierung mit der 3'-Sonde entstehen bei korrekter Rekombination zwei Banden der Größe 6,5 kb (wildtyp-Allel) und 4,2 kb (rekombinantes Allel). Bei diesem Nachweis zeigten insgesamt vier Klone die richtigen Banden. Die Klone 1A1 5D, 1A5 6E, 2A4 3G und 3A1 6B wurden mit dieser Methode nicht analysiert.

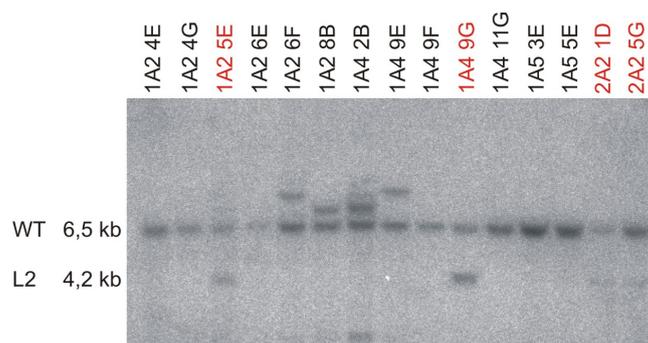


Abbildung 5.10: Nachweis 3'-homologe Rekombination mit der 3'-Sonde

Southern Blot-Analyse von Klonen mit positivem 3'-PCR-Nachweis. Die 6,5 kb-Bande entspricht dem Wildtyp, die 4,2 kb-Bande einem auf der 3'-Seite homolog rekombinierten Allel. Rot gekennzeichnete Klone weisen eine homologe Rekombination auf der 3'-Seite auf.

Die Ergebnisse des 1. Targetings sind in Tabelle 5.1 nochmals zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse des 1. Targetings

Dunkelgrau hinterlegt: Verwendung im 2. Targeting

Hellgrau hinterlegt: von der Sicherungsplatte aufgetaut und nochmals kontrolliert.

n.d. = nicht durchgeführt n.a. = nicht auswertbar

Platte	Klon	Evaluation	3'-PCR	5'-PCR	3'-Sonde	5'-Sonde	Neo-Sonde
1A1	5D	grün	+	+	n.d.	+	n.a.
1A2	4E	gelb	+	-	-	-	-
	4G	gelb	+	-	-	-	-
	5E	gelb	+	-	+	-	-
	6E	grün	+	-	-	-	-
	6F	gelb	+	-	-	-	-
	8B	gelb	+	-	-	-	-
1A4	2B	gelb	+	-	-	-	-
	9E	grün	+	-	-	-	-
	9F	grün	+	-	-	-	-
	9G	grün	+	+	+	+	+
	11G	gelb	+	-	-	-	-
1A5	3E	gelb	+	-	-	-	+
	5E	gelb	+	-	-	-	-
	6E	rot	+	+	n.d.	+	-
2A2	1D	rot	+	+	+	+	+
	5G	grün	+	+	+	+	-
2A4	3G	gelb	+	+	n.d.	-	+
3A1	6B	grün	+	+	n.d.	-	-

Nach Begutachtung aller durchgeführten Nachweise wiesen letztendlich nur zwei (1A4 9G und 2A2 1D) von insgesamt 1296 isolierten Klonen sicher eine korrekte homologe Rekombination mit Einfachintegration des *Kcnev2-knockout-lacZ-knockin*-Konstruktes auf, mit denen auch ein zweites Targeting durchgeführt werden sollte. Vier weitere Klone wurden ebenfalls von der Sicherungsplatte aufgetaut und die DNS nochmals auf homologe Rekombination analysiert.

5.3.2 Das 2. Targeting

5.3.2.1 Auftauen von L2-Klonen

Zur Durchführung des 2. Targetings wurden die Klone 1A4 9G und 2A2 1D von der Sicherungsplatte aufgetaut und nach Protokoll erneut in Kultur genommen. Die Klone 1A1 5D, 1A5 6E, 2A4 3G und 3A1 6B wurden ebenfalls zur Wiederholung der Analyse auf homologe Rekombination aufgetaut, so dass insgesamt sechs Klone von einer 24-Loch- über eine 6-Loch-Platte bis zur 25 cm²-Flasche kultiviert wurden. Von allen Klonen wurde DNS isoliert und die Zellen zur Dauerlagerung in flüssigem Stickstoff präpariert. Die beiden für das 2. Targeting vorgesehenen Klone wurden parallel dazu weiter in Kultur gehalten und auf das Targeting vorbereitet. Die Analyse der DNS erfolgte mit Hilfe der 3'-, der 5'- und der Neo-Sonde sowie der Long Distance-PCR über den kurzen Arm nach den unter 5.1.2 beschriebenen Nachweismethoden (Abbildung 5.11).

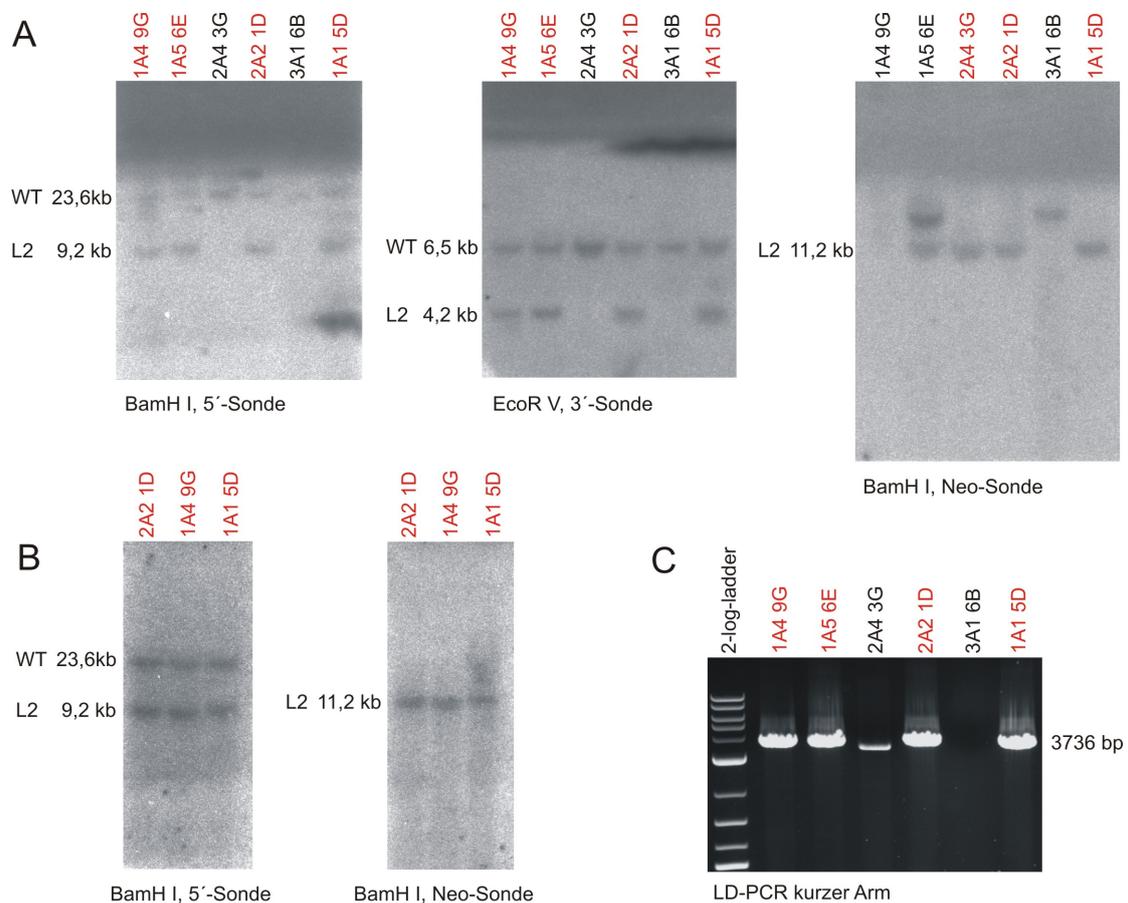


Abbildung 5.11: Kontrolle der aufgetauten Klone des 1. Targetings

(A) Nachweis der homologen Rekombination mit der 5'-Sonde, der 3'-Sonde und der Neo-Sonde. (B) Wiederholung der 5'-Nachweise und der Neo-Nachweise mit den bisher eindeutig identifizierten L2-Klonen. (C) Kontrolle der aufgetauten Klone mittels Long Distance-PCR über den kurzen Arm der homologen Rekombination. Klone mit eindeutig positivem Ergebnis bei den jeweiligen Nachweisen sind rot hinterlegt.

Nach den oben dargestellten Analysen konnte bei den für das 2. Targeting vorgesehenen Klonen 1A4 9G und 2A2 1D die homologe Rekombination bestätigt werden, und ein weiterer Klon 1A1 5D mit eindeutiger homologer Rekombination wurde identifiziert. Von diesen L2-

Klonen wurden Kryostocks für die Dauerlagerung in flüssigem Stickstoff hergestellt. Die Ergebnisse dieser Kontrolluntersuchungen sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Nachweise der homologen Rekombination

Klon	Evaluation	5'-Sonde	3'-Sonde	Neo-Sonde	3'-PCR	Verwendung
I.1 1A1 5D	grün	+	+	+	+	Dauerlagerung
I.1 1A4 9G	grün	+	+	+	+	2. Targeting II.2
I.1 1A5 6E	rot	+	+	-	+	-
I.1 2A2 1D	rot	+	+	+	+	2. Targeting II.1
I.1 2A4 3G	gelb	-	-	+	-	-
I.1 3A1 6B	grün	-	-	-	-	-

5.3.2.2 Embryonale Stammzellkultur/Elektroporation

Die Stammzellen der Klone 1A4 9G und 2A2 1D wurden weiter bis zur 75 cm²-Flasche kultiviert, durch Trypsinierung vereinzelt und mit dem Cre-Rekombinase kodierenden Expressionsvektor pIC Cre transfiziert. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach den unter 3.3.5.6 beschriebenen Methoden. Der Expressionsvektor wurde zunächst mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender ethanolischer Fällung gereinigt. Jeweils 20 µg der gereinigten pIC Cre-DNS wurden dann mit den trypsinisierten Zellen vermischt und der Spannungspuls angelegt. Die einzelnen Elektroporationsparameter können aus Tabelle 5.3 entnommen werden. Nach der Elektroporation wurden die Stammzellen in je vier Petrischalen in verschiedenen Verdünnungen (siehe 3.3.5.6) ausgesät, die restlichen Zellen wurden entsorgt. Mit Hilfe der Cre-Rekombinase sollten nun in den Stammzellen DNS-Abschnitte zwischen zwei gleichgerichteten loxP-Erkennungssequenzen deletiert werden. Im Fall des hier vorliegenden *Kcnv2-knockout*-Konstrukts kann also die NeoTK-Kassette wieder entfernt werden, und man erhält Klone mit *Kcnv2-knockout-lacZ-knockin* (L1). 48 Stunden nach der Elektroporation wurde die Negativselektion mit Ganciclovir-haltigem Medium begonnen, so dass alle Zellen abstarben, welche die NeoTK-Kassette noch im Genom trugen. Bei beiden Ursprungsklonen wuchsen viele Zellklone mit optimalem Aussehen, so dass bei Klon 2A2 1D ab Tag 6 nach Selektionsstart und bei Klon 1A4 9G ab Tag 5 nach Selektionsstart einzelne überlebende Zellklone isoliert wurden. Bei Ursprungsklon 2A2 1D wurden über einen Zeitraum von drei Tagen 62 Klone isoliert, bei Ursprungsklon 1A4 9G konnten ebenfalls über drei Tage insgesamt 100 Zellklone „gepickt“ werden. Die Evaluation ergab einen Anteil an Klonen mit „roter“ und „gelber“ Beurteilung von 60%. Jeweils eine Platte wurde als Sicherungskopie bei -80°C eingefroren, die restlichen Kopien wurden lysiert und die DNS zur weiteren Analyse isoliert.

Tabelle 5.3: Elektroporations-Parameter im 2. Targeting

Klon	Targeting	Passage	T _{const}	T _{const} (PBS)	isolierte Klone	gelb/rot
2A2 1D	II.1	23	10,0	6,4	62	34
1A4 9G	II.2	23	9,5	6,6	100	63

5.3.2.3 Nachweis der Cre-Rekombination

Zum Nachweis der Cre-Rekombination standen zwei verschiedene Methoden zur Verfügung: die *Kcnv2*-Genotypisierungs-PCR (Abbildung 5.12) und die Southern Blot-Hybridisierung. Zunächst wurden alle 162 isolierten Klone mittels *Kcnv2*-Genotypisierungs-PCR überprüft, bei der abhängig vom Genotyp bei Amplifizierung mit drei Primern unterschiedlich große Fragmente gebildet werden. Reine wildtyp-Klone zeigen hierbei die 459 bp-Bande, bei L1-Klonen dagegen entstehen Banden der Länge 459 bp und 321 bp. Abbildung 5.13 zeigt zwei Beispielgele des PCR-Massenscreenings.

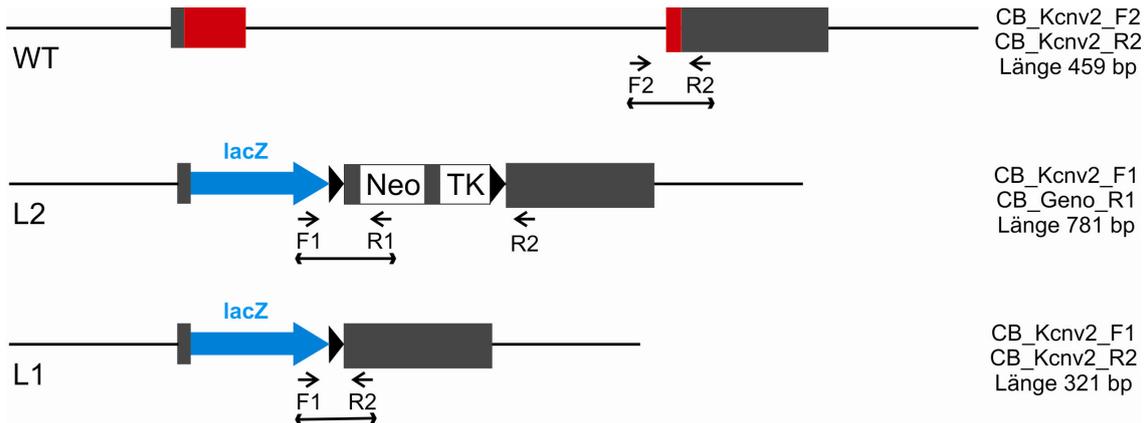


Abbildung 5.12: Nachweis der Cre-Rekombination durch PCR

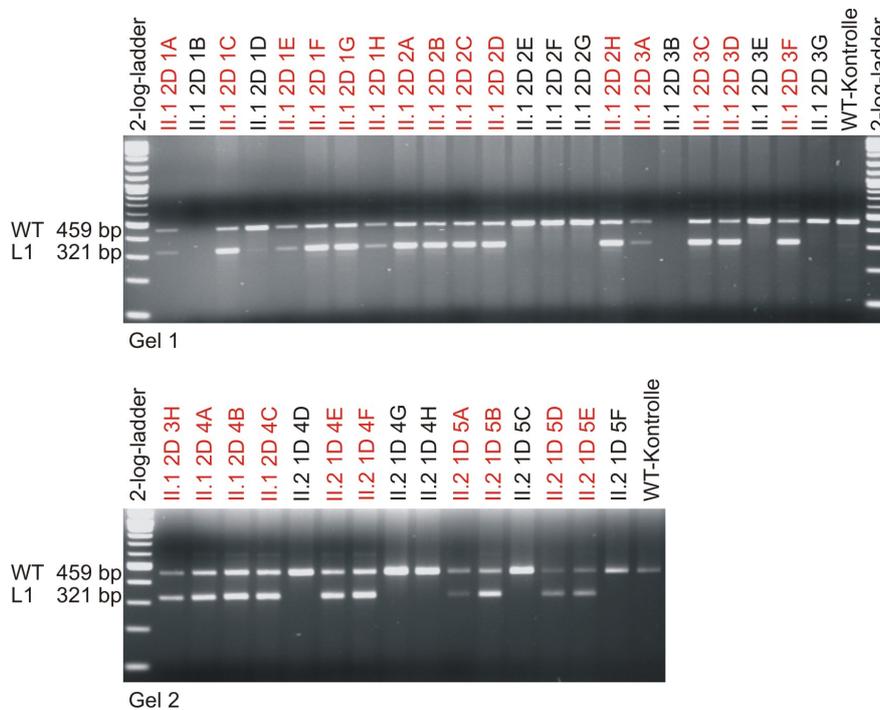


Abbildung 5.13: PCR-Nachweis der Cre-Rekombination im 2. Targeting

Dargestellt sind zwei Beispielgele des PCR-Screenings, Klone mit eindeutigem *Kcnv2-knockout* (L1) sind rot hinterlegt.

In diesem PCR-Screening konnten bei insgesamt 108 der 162 isolierten Klone beide Banden detektiert werden (Tabelle 5.4).

Tabelle 5.4: Ergebnisse des 2. Targetings (PCR-Screening)

Targeting	Ursprungs-Klon	isolierte Klone	gelb/rot	L1	WT	nicht bestimmbar
II.1	2C2 1D	62	34	32	15	15
II.2	1C4 9G	100	63	76	17	7

Anschließend wurden 21 dieser PCR-positiven Exemplare ausgewählt und weiter durch Restriktionsverdau mit BamH I und Southern-Hybridisierung mit der 3'-Sonde des 1. Targetings analysiert. Im Wildtyp sollte sich nun ein Signal von 23,6 kb ergeben, welches auf 6,5 kb bei L1-Klonen verkürzt wird (Abbildung 5.14).

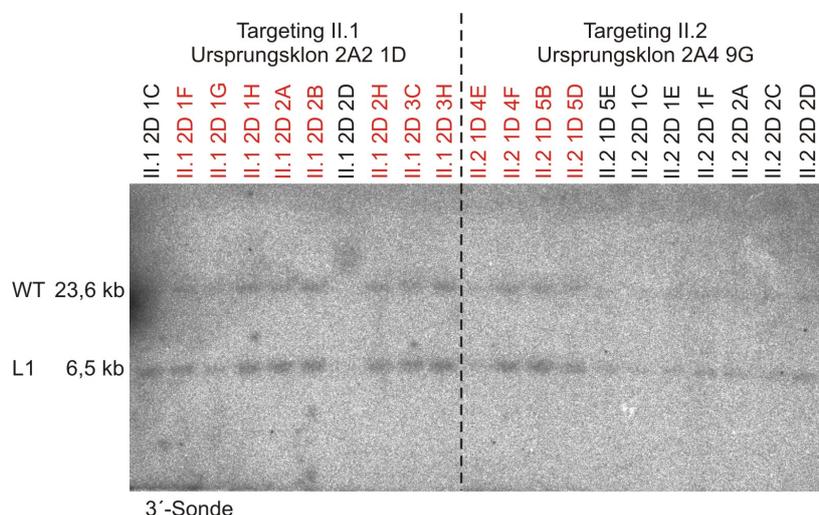


Abbildung 5.14: Southern-Nachweis der Cre-Rekombination im 2. Targeting

Southern Blot-Analyse einer Auswahl PCR-positiver Klone des 2. Targetings. Die 23,6 kb-Bande entspricht dem wildtyp-Allel, die 6,5 kb-Bande einem Allel mit konstitutivem *knockout* (L1). Klone mit eindeutigem *Kcnv2-knockout* sind rot hinterlegt.

In der Southern-Analyse konnten die Ergebnisse des PCR-Screenings grundsätzlich bestätigt werden. Ein Klon wies eindeutig nicht die gewünschten Banden auf (II.1 2D 2D), hier scheint der Restriktionsverdau nicht richtig funktioniert zu haben. Bei einigen anderen Klone waren die Banden des wildtyp-Allels nur schwach zu sehen, sodass für das weitere Vorgehen nur die Klone verwendet wurden, bei denen sowohl der PCR-Nachweis als auch der Southern-Nachweis eindeutige Signale lieferte.

5.3.2.4 Einfrieren von L1-Klonen

Von jedem der beiden Ursprungsklone wurden drei der im 2. Targeting als *knockout* (L1) identifizierten Klone zur Vorbereitung auf die Dauerlagerung in flüssigem Stickstoff wieder in Kultur genommen und nach Protokoll (3.3.5.9) verarbeitet. Die Klone II.1 2D 2H, II.1 2D 3C und II.1 2D 3H sowie die Klone II.2 1D 4F, II.2 1D 5B und II.2 1D 5D wurden also von der Sicherungsplatte aufgetaut und von der 24-Loch über die 6-Loch-Platte bis zur 25 cm²-

Flasche kultiviert, die Zellen anschließend eingefroren und nochmals DNS präpariert. Zur endgültigen Kontrolle der Zellen vor der Blastozysteninjektion wurde der Genotyp mit Hilfe der Kcnv2-Genotypisierungs-PCR sowie der Southern-Hybridisierung nochmals bestätigt (Abbildung 5.15).

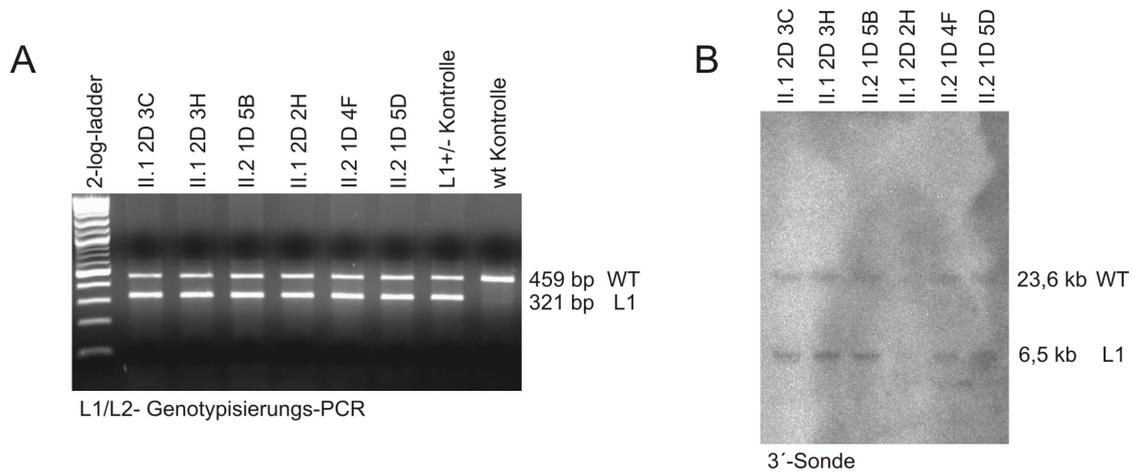


Abbildung 5.15: Kontrolle der aufgetauten Klone des 1. Targetings

(A) Bestätigung der Cre-Rekombination mittels Kcnv2-L1/L2-Genotypisierungs-PCR. (B) Bestätigung der Cre-Rekombination nach Restriktionsverdau mit BamH I mittels Southern-Hybridisierung mit der 3'-Sonde.

Alle sechs Kandidaten erwiesen sich als korrekt rekombinierte L1-Klone und wurden daher zur Dauerlagerung bis zur Blastozysteninjektion in flüssigen Stickstoff überführt.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird die Generierung von neuen *knockout*-Mausmodellen für erbliche Netzhauterkrankungen beschrieben. Im ersten Abschnitt der Arbeit stand die Generierung eines Mausmodells mit konstitutiver und konditionaler Deletion des *Pde6h*-Gens der Maus im Vordergrund. Mittels homologer Rekombination in murinen ES-Zellen wurde das *Pde6h*-Gen gezielt modifiziert, und nach Blastozysteninjektion mit anschließender Reimplantation in scheinsschwangere Ammen wurden verschiedene chimäre Mäuse generiert. Nach Auftreten der Keimbahntransmission konnte schließlich nach mehreren Verpaarungsschritten die *Pde6h-knockout*-Mauslinie etabliert werden, und die ersten Phänotypisierungs-Analysen der Tiere wurden durchgeführt. Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde für den *Kcnv2-knockout* ebenfalls ein Targeting-Konstrukt zur homologen Rekombination in embryonale Stammzellen von Mäusen eingebracht und schließlich Zellklone mit Gendeletion identifiziert. Durch Blastozysteninjektion kann zukünftig aus diesen Stammzellklonen die *Kcnv2-knockout*-Linie etabliert werden.

6.1 Mausmodelle für erbliche Netzhauterkrankungen

Hereditäre Netzhauterkrankungen stellen eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, deren Ursachen in den meisten Fällen in Mutationen von Genen liegen, deren Genprodukte in den Photorezeptoren oder im retinalen Pigmentepithel exprimiert werden. Mit einer Prävalenz von ca. 1:2500 (Rattner et al. 1999; Sohocki et al. 2001) handelt es sich durchaus um eine klinisch relevante Erkrankungsgruppe. Stäbchendystrophien, wie beispielsweise die Retinitis pigmentosa, sind im Vergleich zu Erkrankungen, die primär die Zapfenphotorezeptoren betreffen, recht gut untersucht. Allerdings verursachen gerade die bislang wenig erforschten Zapfen- und Zapfen-Stäbchendystrophien mit die schwersten Sehbehinderungen, da mit der Makula der wichtigste Bereich des Sehsinns betroffen ist. Die größte Lücke im Verständnis von erblichen Netzhauterkrankungen liegt in der mangelnden Kenntnis der Pathomechanismen zwischen genetischer Ursache und klinischem Phänotyp. In der biomedizinischen Forschung stellen Mausmodelle ein geeignetes System dar, mit dessen Hilfe die Pathophysiologie einer Erkrankung erforscht werden kann. Durch kontrollierte Analysen der Netzhautfunktion und histologische Untersuchungen entsprechender Netzhautpräparate von Mausmodellen ist es möglich, den Verlauf einer Erkrankung und das Ausmaß der Defekte im Detail zu studieren.

Voraussetzung für die gezielte Deletion von Genen, also die Generierung von *knockout*-Mäusen, war die Etablierung der Methode des *gene targeting* durch Capecchi (Capecchi 1989). Diese Technologie leistet bis heute einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Funktion von Genen und der zugehörigen Proteine. Beim klassischen, konstitutiven *knockout* werden ein oder mehrere funktional wichtige Exone des Zielgens durch eine Resistenzgenkassette ersetzt oder komplett aus dem Genom entfernt, wodurch die Struktur des Gens zerstört und damit die Funktion verloren geht. Wenn die Resistenzgenkassette im Genom erhalten bleibt, werden allerdings gewisse Nachteile in Kauf genommen, da der

Phänotyp der Mutanten durch die im Genom verbleibenden Resistenzgene beeinflusst werden kann (Rajewsky et al. 1996). Zudem kann bei Deletion eines lebenswichtigen Gens mit der Folge des Fehlens des entsprechenden Proteins durch einen konstitutiven *knockout* schon im Embryonalstadium der Tod der Maus eintreten (Gu et al. 1994). Ein weiterer Nachteil dieses sogenannten globalen oder totalen *knockouts* ist, dass durch Kompensations- oder Regulationsmechanismen komplexe Phänotypen entstehen können, bei denen eine Korrelation zwischen der eigentlichen Genfunktion und dem beobachteten Phänotyp nicht mehr möglich ist.

Eine Weiterentwicklung dieser klassischen Methode stellt die konditionale Mutagenese mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems dar (Rajewsky et al. 1996). Durch Einbau von loxP-Erkennungssequenzen, welche zu deletierende Genbereiche flankieren („gefloxt“ Genbereiche), wird das Zielgen zusätzlich modifiziert. Die Cre-Rekombinase erkennt diese spezifischen Sequenzen und schneidet DNS-Abschnitte zwischen gleichgerichteten loxP-Schnittstellen aus. Wenn der Selektionsmarker zusätzlich von diesen loxP-Sites flankiert wird, kann die Selektionskassette ebenfalls durch die Cre-Rekombinase wieder aus dem Genom entfernt werden, so dass die oben beschriebenen Nachteile vermieden werden. Die Cre-vermittelte Rekombination kann *in vitro* durch transiente Expression des Enzyms in ES-Zellen oder *in vivo* durch Verpaarung der „gefloxt“ Tiere mit Cre-transgenen Mäusen erfolgen. Unter Verwendung einer sogenannten „Cre-deleter“-Maus wird eine komplette Deletion bereits in der Keimbahn erreicht und somit kann wiederum ein konstitutiver *knockout* in allen Geweben der Tiere erzeugt werden (Schwenk et al. 1995) (Abbildung 3.10). Mit Hilfe der EIIa-Cre-Maus, welche die Cre-Rekombinase mosaikartig in der Keimbahn exprimiert (Abbildung 6.1), können aus Mäusen mit „gefloxt“ Exonen und zusätzlich „gefloxter“ Selektionskassette konditionale *knockout*-Tiere generiert werden, indem nur die Selektionskassette deletiert wird (Lakso et al. 1996; Holzenberger et al. 2000). Durch Verpaarung eines konditionalen *knockout*-Tiers mit einer Maus, die aufgrund eines gewebespezifischen Promotors die Cre-Rekombinase nur in einem ganz bestimmten Gewebe exprimiert, lässt sich eine gewebespezifische Gendeletion erzeugen (Akimoto et al. 2004) (Abbildung 6.2). Schließlich kann durch Verwendung eines ligandengesteuerten Promotors nicht nur eine gewebespezifische, sondern auch eine zeitlich kontrollierbare Modifizierung des Zielgens erreicht werden. Hierfür wird eine Ligandenbindungsdomäne an die Cre-Rekombinase fusioniert, so dass die Rekombinase erst nach Bindung eines synthetischen Liganden selektiv aktiviert wird (Feil et al. 1996).

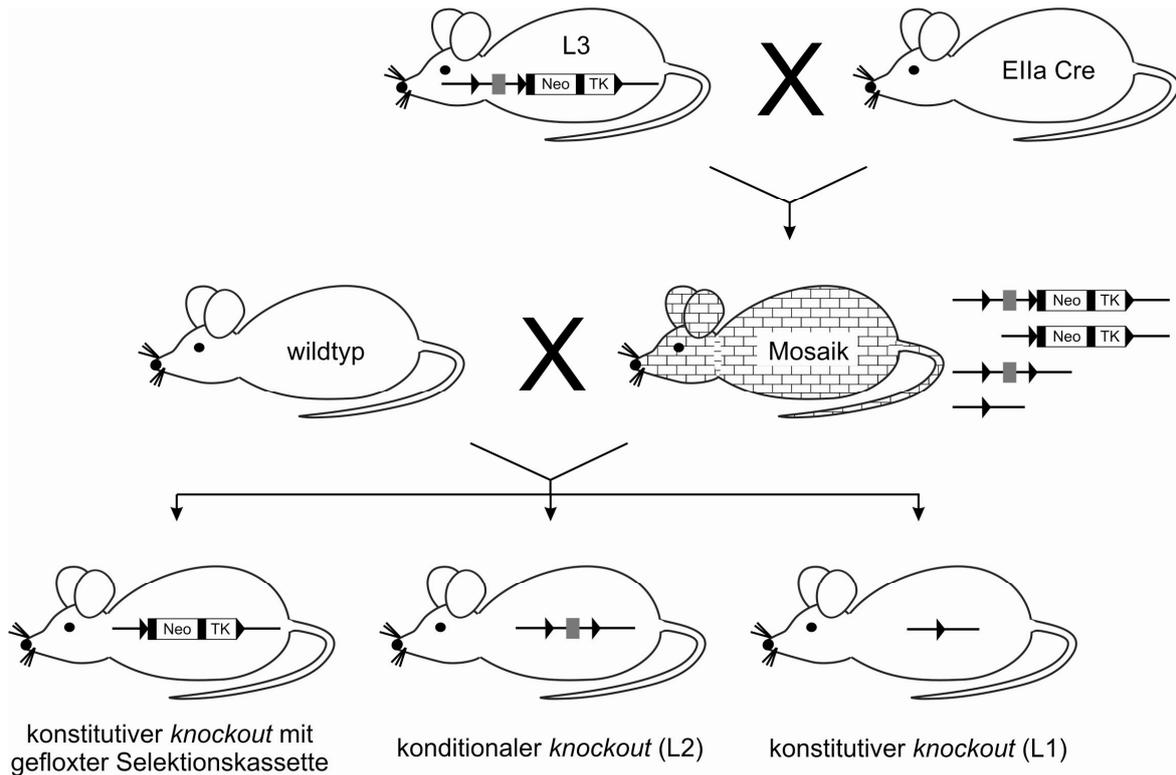


Abbildung 6.1: In vivo-Generierung von *knockout*-Mäusen durch partielle Cre/loxP-Deletion

Eine Verpaarung von L3-Mäusen mit Ella-Cre transgenen Mäusen, welche die Cre-Rekombinase mosaikartig in der Keimbahn exprimieren, resultiert in sogenannten Mosaik-Nachkommen mit unterschiedlicher Deletion von DNS-Abschnitten in verschiedenen Zellen. Durch Einkreuzen von wildtyp-Mäusen erhält man in der zweiten Generation je nach vorliegender Deletion konstitutive (L1) oder auch konditionale *knockout*-Tiere (L2).

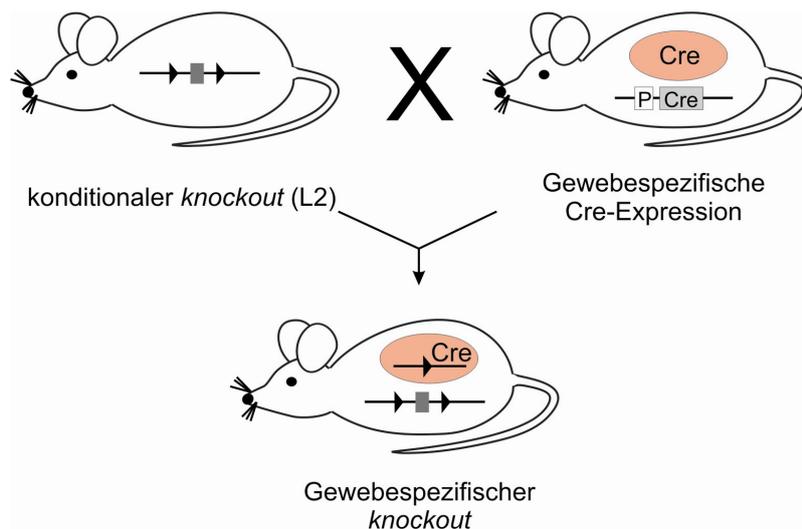


Abbildung 6.2: Gewebespezifischer *knockout*

Durch Verpaarung konditionaler *knockout*-Mäuse (L2) mit Cre-transgenen Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter einem gewebespezifischen Promotor (P) exprimieren, können Tiere mit gewebespezifischem *knockout* generiert werden.

6.2 Pde6h-knockout

Phosphodiesterasen der PDE6-Familie sind wichtige Enzyme der Phototransduktionskaskade und werden in den Außensegmenten der Photorezeptoren exprimiert. Es handelt sich um tetramere Proteine, die aus einem katalytischen Dimer und jeweils zwei inhibitorischen Untereinheiten aufgebaut sind. Die Aktivierung der Phosphodiesterasen erfolgt in der Phototransduktion (Abbildung 1.2) über Transducin, welches im aktivierten Zustand an eine inhibitorische Untereinheit der PDE bindet, diese vom katalytischen Teil abdissoziiert und damit die katalytische Aktivität der PDE in Gang setzt. Hieraus resultiert die Hydrolyse von cGMP, so dass der cytosolische cGMP-Spiegel absinkt, was wiederum das Schließen von CNG-Kanälen mit nachfolgender Hyperpolarisation der Cytoplasmamembran zur Folge hat (Gillespie & Beavo 1989). Der Enzymkern der Stäbchen-PDE ist ein Heterodimer aus α - und β -Untereinheiten (PDE6A, PDE6B), welches mit zwei identischen inhibitorischen γ -Untereinheiten (PDE6G) assoziiert ist (Baehr et al. 1979). Das Tetramer der Zapfen-PDE besteht aus einem katalytischen Homodimer mit zwei α' -Untereinheiten (PDE6C) sowie zwei inhibitorischen γ' -Untereinheiten (PDE6H) (Gillespie & Beavo 1989). Mutationen in PDE6A, PDE6B und PDE6C verursachen verschiedene Formen von erblichen Netzhauterkrankungen beim Menschen (McLaughlin et al. 1993; Bayes et al. 1995; Huang et al. 1995; Danciger et al. 1996; Chang et al. 2009). Krankheitsassoziierte Mutationen im humanen PDE6G-Gen sind bislang nicht bekannt, aber die *Pde6g-knockout*-Maus weist eine der Retinitis pigmentosa ähnliche Netzhautdegeneration auf (Tsang et al. 1996). Über die inhibitorische Untereinheit der Zapfen-PDE ist bislang sehr wenig bekannt, es standen zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit noch keine Mausmodelle zur Erforschung der Bedeutung der *Pde6h* im Rahmen von erblichen Netzhauterkrankungen zur Verfügung. Um die genaue Funktion der *Pde6h* zu evaluieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Mausmodell mit Ausschaltung des *Pde6h*-Gens etabliert. Da *Pde6h* auch außerhalb der Retina, beispielsweise in der Lunge exprimiert wird (Tate et al. 2002), sollte ein *knockout*-Konstrukt hergestellt werden, das sowohl die Generierung von Mauslinien mit konstitutiver (L1) als auch konditionaler Deletion (L2) erlaubt.

Die grundlegende Strategie zur gezielten Inaktivierung des *Pde6h*-Gens in der Maus beruhte auf der Generierung eines Targeting-Konstrukts unter Verwendung des Cre/loxP-Systems (Abremski & Hoess 1984). Dieses Konstrukt ermöglicht nach homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen die Etablierung einer konstitutiven und auch einer konditionalen *knockout*-Mauslinie. Zunächst wurde die Genarchitektur des murinen *Pde6h*-Gens analysiert und hieraus die *knockout*-Strategie entwickelt. Zur Generierung des konstitutiven und des konditionalen *knockouts* war eine Strategie mit insgesamt drei loxP-Erkennungssequenzen (L3) nötig. Sowohl die NeoTK-Resistenzgenkassette als auch die proteincodierenden Genabschnitte wurden von jeweils zwei loxP-Sequenzen flankiert, damit diese Bereiche später auf Ebene der Stammzellen oder direkt in der Maus deletiert werden konnten. Dieses Konstrukt wurde mittels molekularbiologischer Methoden in zahlreichen Klonierungsschritten generiert und durch Teilsequenzierung an kritischen Stellen kontrolliert. Nach Elektroporation in embryonale Stammzellen der Maus und Selektion mit G418 konnten zahlreiche Klone mit korrekter Integration durch Southern Blot-Analyse identifiziert werden. Es lag eine Rekombinationsrate von 4% vor, was im Vergleich zu den in der Literatur

beschriebenen Raten von ca. 1‰ einen recht hohen Wert darstellt (Thomas et al. 1986). Mit zwei der insgesamt 32 korrekt rekombinanten L3-Klonen wurde ein zweites Targeting begonnen. Die jeweilige Transfektion mit einem Vektor, der die Cre-Rekombinase transient exprimiert, lieferte nach Selektion mit Ganciclovir sowohl L1-Klone (konstitutiver *knockout*) als auch L2-Klone (konditionaler *knockout*), die durch PCR- und Southern Blot-Analyse identifiziert wurden. Die nachfolgenden Blastozysteninjektionen wurden mit L1- und L3-Klonen durchgeführt, da einige L2-Klone durch eine Kontamination verloren gingen und die restlichen dieser Klone nicht mehr angewachsen sind. Die Generierung hochchimärer männlicher Nachkommen gelang für beide Genotypen, und sowohl bei den L1-Chimären als auch bei den L3-Chimären konnte eine Keimbahntransmission nachgewiesen werden. Bei den beiden braunen Nachkommen der L3-Chimärenverpaarung war ein Männchen mit heterozygoter Mutation (L3/+) zu finden, und durch Verpaarung dieser Maus mit wildtyp-Weibchen wurde anschließend die Pde6h-L3-Linie aufgebaut. Trotz des Auftretens einer Keimbahntransmission bei den L1-Chimären musste die konstitutive (L1) *knockout*-Linie ebenfalls durch Verpaarung der Pde6h-L3-Linie mit einer CMV-„Cre-Deleter“-Maus und anschließender Auskreuzung des Cre-Transgens gezüchtet werden, da es sich bei den beiden braunen Nachkommen der L1-Chimäre um wildtyp-Tiere handelte. Somit stehen nun eine Pde6h-L3-Linie und die Pde6h-*knockout*-Linie (L1) zur Analyse des Phänotyps und für weitere Verpaarungen zur Verfügung. Die Linie des konditionalen Pde6h-*knockouts* könnte theoretisch zusätzlich *in vivo* durch Verpaarung von Pde6h-L3-Mäusen mit EIIa-Cre-Mäusen generiert werden (Abbildung 6.1). Zur Verifizierung des totalen *knockouts*, also des Fehlens der inhibitorischen Untereinheit der Zapfen-PDE in homozygoten Pde6h-*knockout*-Tieren, sowie zur Untersuchung der Expression von Pde6h in nichtretinalen Geweben wurde außerdem ein spezifischer Anti-Pde6h-Peptidantikörper generiert und mittels Immunofluoreszenz an Retinaschnitten von wildtyp-Mäusen getestet. Alle Testseren wiesen eine spezifische Zapfenfärbung auf, so dass davon auszugehen ist, dass der generierte Antikörper spezifisch das Pde6h-Proteinprodukt detektieren kann. Die Immunofluoreszenz-Analyse retinaler Kryoschnitte von Pde6h^{-/-}-Tieren mit dem Anti-Pde6h-Antikörper konnte den durch PCR nachgewiesenen *knockout* histologisch auf Proteinebene bestätigen, da trotz nachgewiesenem Vorhandensein von Zapfen in diesen Photorezeptoren keine mit dem Anti-Pde6h-Antikörper detektierbaren Strukturen zu finden waren.

Auf Grund der physiologischen Funktion der inhibitorischen γ^2 -Untereinheit der Zapfen-Phosphodiesterase in der Phototransduktion ist zunächst zu vermuten, dass eine Deletion des Pde6h-Gens in der Maus zu einer erhöhten Aktivität der Zapfen-PDE führen sollte. Durch den Wegfall der inhibitorischen γ^2 -Untereinheit könnte eine kontinuierliche Aktivierung der PDE mit der Folge einer dauerhaften Hydrolyse von cGMP eintreten. Nach dieser Theorie sollte bei Pde6h^{-/-}-Tieren der cGMP-Spiegel in den Außensegmenten der Photorezeptoren also vermindert sein. Ungeklärt bliebe bei dieser Hypothese allerdings die Frage der Aktivierung der PDE durch das aktivierte Transducin bei Fehlen der inhibitorischen Phosphodiesterase-Untereinheit. Tsang et al. konnten bei Pde6g-*knockout*-Mäusen, also einer Deletion der inhibitorischen Untereinheit der Stäbchen-PDE, erhöhte cGMP-Spiegel in den Photorezeptoren nachweisen. Eine lichtinduzierte Aktivierung der PDE war bei diesen Mäusen nicht messbar, und auch der cGMP-Spiegel blieb durch Licht unbeeinflusst, die Phototransduktion scheint also durch das Fehlen der Stäbchen-PDE γ gestört zu sein. Die

Aktivität der PDE war bei den *knockout*-Tieren ebenfalls vermindert. Ab einem Alter von drei Monaten fiel der cGMP-Spiegel der Mäuse mit *Pde6g*-Gendeletion schließlich unter den cGMP-Spiegel der wildtyp-Kontrollen, was auf den Verlust der Photorezeptoren in diesem Alter zurückzuführen ist. Diese Photorezeptordegeneration lässt sich wiederum durch über cGMP dauerhaft offengehaltene CNG-Kanäle erklären, was zu einer Überladung der Zelle mit Ca^{2+} und nachfolgender Zelldegeneration führen könnte. Die Ergebnisse der Untersuchung der *Pde6g-knockout*-Maus weisen insgesamt also darauf hin, dass zumindest in Stäbchen eine Interaktion zwischen der γ -Untereinheit und den katalytischen Untereinheiten für die richtige Funktion der PDE wichtig ist und dass alle drei Untereinheiten für die Bildung eines stabilen, aktiven Holoenzym vonnöten sein könnten (Tsang et al. 1996). Wenn der Phänotyp der Deletion von *Pde6g* in der Maus auf die *Pde6h-knockout*-Maus übertragbar wäre, so ist bei dieser Linie potentiell ein Funktionsverlust der Zapfen mit nachfolgender Degeneration dieser Photorezeptoren zu erwarten.

Erste vergleichende elektroretinographische Messungen sowie morphologische Untersuchungen mittels OCT und SLO bei *Pde6h*^{-/-}-Mäusen und wildtyp-Mäusen im Alter von 4-5 Monaten haben gezeigt, dass bei den bislang durchgeführten Untersuchungen kein signifikanter Unterschied zwischen *Pde6h-knockout* und Wildtyp zu sehen ist. Die funktionalen Untersuchungen der *Pde6h*^{-/-}-Tiere zeigen eine den wildtyp-Tieren vergleichbare Reaktion auf Lichtreize, auch die Zapfenfunktion scheint unbeeinträchtigt zu sein. In immunhistochemischen Analysen von *Pde6h*^{-/-}-Mäusen im Alter von 4 Wochen fanden sich ebenfalls keine Hinweise auf eine Netzhautdegeneration oder Defekte an Zapfen-Photorezeptoren.

Auf Grund der ausgeprägten Homologie zwischen den beiden inhibitorischen Untereinheiten der Stäbchen- und der Zapfen-PDE – 78% der Aminosäuren der γ -Untereinheit in Zapfen sind zu denjenigen der Stäbchen-Untereinheit identisch - wäre eine mögliche Erklärung für den in den bislang durchgeführten Messungen beobachteten Phänotyp, dass die inhibitorische Untereinheit der Stäbchen-PDE bei *Pde6h*^{-/-}-Mäusen kompensatorisch auch in Zapfen exprimiert wird und so die Funktion der *Pde6h* übernehmen könnte. Ein ähnliches Phänomen lässt sich beispielsweise bei der humanen Opsinkinase (GRK, G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase) beobachten: In Zapfenphotorezeptoren der gesunden humanen Retina werden zwei Typen der Opsinkinase, GRK1 und GRK7, exprimiert (Chen et al. 2001). Bei Patienten mit ESCS (*enhanced S-Cone Syndrome*), einer degenerativen Netzhauterkrankung, führt das Fehlen beider GRK-Isoformen in S-Opsin-Zapfen zu einer ausgeprägteren Störung der Deaktivierungskinetik der Zapfen als beim Fehlen von nur einer Isoform. Es wird daher vermutet, dass bei einer fehlenden GRK eine partielle Kompensation durch die jeweils andere Form besteht (Cideciyan et al. 2003). Auch andere Kompensationsmechanismen durch verstärkte oder verminderte Expression von Genen, die an der Phototransduktion oder der Regulation des cGMP-Spiegels in den Photorezeptoren beteiligt sind, wären denkbar. Fraglich hierbei bleibt allerdings, wie die Phosphodiesterase bei Abwesenheit der inhibitorischen PDE-Untereinheit in den Zapfen durch Lichteinfall aktiviert werden könnte. In der wildtyp-Maus bindet die aktivierte α -Untereinheit des Transducins an die inhibitorische Untereinheit der PDE und erst durch diese Bindung erfolgt eine Abdissoziation der hemmenden Untereinheit vom katalytischen Teil der PDE. Bei völliger Abwesenheit der inhibitorischen Untereinheit

könnte das Signal des Lichtreizes nicht mehr von Transducin auf die PDE übertragen werden, und selbst bei dauerhaft aktiver PDE wäre dann eine adäquate Reaktion auf Lichtreize kaum mehr möglich, was aber im *Pde6h-knockout* offensichtlich der Fall ist.

Die Theorie der kompensatorischen Expression der *Pde6g* in Zapfen der *Pde6h^{-/-}*-Mäuse könnte durch Immunfluoreszenz-Analyse mit einem für die inhibitorische Untereinheit der Stäbchen, also das *Pde6g*-Protein, spezifischen Antikörper untersucht werden. Dazu könnten mit Hilfe eines spezifischen Zapfenmarkers wie beispielsweise einer Opsinfärbung die Zapfen zunächst immunhistochemisch markiert und in einer zweiten Färbung das Vorhandensein von *Pde6g* in Zapfen untersucht werden. Problematisch hierbei wird allerdings das sicherlich sehr starke Signal der *Pde6g* in Stäbchen sein, das die potentielle Fluoreszenz der *Pde6g* in Zapfen möglicherweise überstrahlen wird und so eine zuverlässige Aussage mit dieser Methode erschwert. Um dieses Problem zu umgehen, eröffnet sich beispielsweise durch Einkreuzen der *Nrl^{-/-}*-Maus die Möglichkeit der Generierung einer Doppelmutante. *Nrl* (*neural retina leucine zipper*) ist ein Transkriptionsfaktor, der vor allem in Stäbchen exprimiert wird und unter anderem an der Regulation der Transkription von Rhodopsin beteiligt ist (Rehmtulla et al. 1996; Swain et al. 2001). Eine Deletion von *Nrl* in der Maus resultiert elektoretinographisch in einem kompletten Funktionsverlust der Stäbchen sowie einer verstärkten Zapfenfunktion (Mears et al. 2001). Morphologisch sind in der Netzhaut der *Nrl^{-/-}*-Mäuse keine Stäbchen zu detektieren, die vorhandenen Photorezeptoren weisen hingegen zapfenähnliche Morphologie und Eigenschaften auf, so dass die *Nrl^{-/-}*-Maus häufig als Modell verwendet wird, um die Zapfenfunktion und zapfenspezifische Erkrankungen in einer sogenannten „Zapfenretina“ zu untersuchen (Daniele et al. 2005). Durch Verpaarung von *Pde6h^{-/-}*-Mäusen mit *Nrl^{-/-}*-Mäusen würden also Tiere generiert, welche eine Netzhaut mit Zapfen- und zapfenähnlichen Photorezeptoren, aber keine Stäbchen besitzen, und bei denen zusätzlich die inhibitorische Untereinheit der Zapfen-PDE deletiert ist. Wenn *Pde6g* in der *Pde6h^{-/-}*-Maus kompensatorisch hochreguliert ist, so sollte dies in der *Nrl^{-/-}/Pde6h^{-/-}*-Doppelmutante durch Immunfluoreszenz-Nachweis der *Pde6g* in Zapfen ohne störende Signale der Stäbchen zu analysieren sein. Dieses Mausmodell könnte auch für weitere funktionale oder morphologische Untersuchungen verwendet werden, da durch das vermehrte Vorhandensein von Zapfen bzw. zapfenähnlichen Photorezeptoren die Analyse zapfenspezifischer Gen- und Proteinfunktionen erleichtert wird.

Eine Verpaarung der *Pde6h^{-/-}*-Mäuse mit *Pde6g^{-/-}*-Tieren würde ebenfalls in einer Doppelmutante resultieren, bei der durch das Fehlen der inhibitorischen Untereinheit der Stäbchen-PDE die eventuell vorhandene Kompensation aufgehoben wäre und so der Phänotyp der Doppelmutante im Vergleich zur reinen *Pde6g^{-/-}*-Variante bestimmt werden könnte. Durch die fehlende Kompensation sollte bei dieser Methode der eigentliche zapfenspezifische Phänotyp des *Pde6h-knockout* offenbar werden. Problematisch wäre hierbei allerdings die Tatsache, dass bei den *Pde6g^{-/-}*-Tieren eine progressive Photorezeptor-degeneration mit einem Verlust eines Großteils der Außensegmente im Alter von 13 Tagen zu beobachten ist, welche in einem kompletten Verlust der Photorezeptorschicht ab einem Alter von ca. 8 Wochen gipfelt (Tsang et al. 1996). Die Analysen der entsprechenden Tiere müssten also in einem Alter von nur wenigen Tagen bis Wochen durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit kompensatorische Mechanismen aufzuklären besteht in der Transkriptomanalyse. Hierbei können mittels DNS-Chip-Expressionsanalyse diejenigen Gene identifiziert werden, die in einer bestimmten Umgebung, also beispielsweise der Retina, exprimiert werden. Wenn die inhibitorische Untereinheit der Stäbchen in den *Pde6h*^{-/-}-Tieren kompensatorisch auch in Zapfen exprimiert wird, so müsste die retinale *Pde6g*-Gesamtexpression in den *Pde6h*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu wildtyp-Mäusen erhöht sein.

Auch mit Hilfe des konditionalen *Pde6h-knockouts* könnte eine den eigentlichen Phänotyp verschleiende Kompensation identifiziert werden. Hierfür müsste zunächst durch Verpaarung der *Pde6h*-L3-Tiere mit EIIa Cre-Tieren die konditionale *knockout*-Linie *in vivo* generiert werden (Abbildung 6.1). Durch weiteres Einkreuzen einer Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase induzierbar entweder in Zapfen oder generell induzierbar in allen Geweben exprimiert, können Tiere generiert werden, die das *Pde6h*-Gen flankiert von zwei loxP-Sequenzen tragen und bei denen abhängig vom verwendeten Promotor die Expression der Cre-Rekombinase zu einem bestimmten Zeitpunkt durch Zufuhr eines Liganden induziert werden kann (Feil et al. 1996). Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit stehen allerdings lediglich transgene Mäuse mit einer Expression der Cre-Rekombinase spezifisch in M-Zapfen- oder S-Zapfen-Photorezeptoren zur Verfügung (Akimoto et al. 2004), es gibt jedoch keine Publikationen zu Mäusen mit induzierbarer zapfenspezifischer Expression der Cre-Rekombinase. Nach Induktion der Expression der Rekombinase zu einem bestimmten Zeitpunkt würde dann die Gendeletion *in vivo* stattfinden und der eigentliche Phänotyp würde sich im adulten Tier entwickeln. Da kompensatorische Mechanismen in der Regel erst nach einigen Tagen bis Wochen voll zum Tragen kommen, kann dieser Zeitraum genutzt werden, um den eigentlichen, nicht regulierten *Pde6h*^{-/-}-Phänotyp zu evaluieren.

6.3 *Kcnv2-knockout/lacZ-knockin*

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich ebenfalls mit einer Gendeletion, bei der der codierende Bereich des *Kcnv2*-Gens der Maus passgenau durch ein *lacZ*-Gen ersetzt wurde. Es handelt sich in diesem Fall also um eine Kombination aus *Kcnv2-knockout* und *lacZ-knockin*. Über die genaue Funktion von *Kcnv2* ist bislang nur sehr wenig bekannt. Es wird vermutet, dass das Gen für eine modulatorische α -Untereinheit Kv8.2 eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals kodiert. Wichtige Funktionen von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen sind beispielsweise die Aufrechterhaltung des Membranpotentials oder die Kontrolle der Form, Dauer und Frequenz von Aktionspotentialen. Es handelt sich um tetramere Proteine, die aus vier kanalbildenden α -Untereinheiten zusammengesetzt sind, die mit zusätzlichen modulatorischen β -Untereinheiten assoziiert sein können. Das *KCNV2*-Gen ist in den Innensegmenten der Zapfen und Stäbchen stark exprimiert (Wu et al. 2006), aber auch in zahlreichen anderen Geweben ist eine unterschiedlich ausgeprägte Expression zu finden (Ottshytsch et al. 2002). *KCNV2* ist im Zusammenhang mit erblichen Netzhauterkrankungen von besonderem Interesse, da Mutationen in diesem Gen beim Menschen als Ursache einer besonderen Form der Netzhautdystrophie, nämlich der *cone dystrophy with supernormal rod response* (CDSRR) angesehen werden (Wu et al. 2006; Wissinger et al. 2008). Typisch für diese Patienten ist eine ausgeprägte Zapfenfunktionsstörung mit abhängig von der Lichtintensität vermindertem und verzögertem oder verstärktem

skotopischem ERG (Gouras et al. 1983). Kv8.2 bildet alleine keine funktionalen Kanäle, heteromerisiert aber in Koexpressionsuntersuchungen mit einer weiteren Untereinheit spannungsgesteuerter Kaliumkanäle, Kv2.1 (Otschysch et al. 2002). Man vermutet, dass dieser heterotetramere spannungsgesteuerte Kaliumkanal aus Kv2.1 und Kv8.2 in den Innensegmenten der Photorezeptoren an der Signalmodulation der lichtinduzierten Membranpotentialänderungen beteiligt ist. Zur genauen Analyse der Funktion des *Kcnv2*-Genprodukts und der Pathophysiologie der CDSRR wurden in der vorliegenden Arbeit die zellkulturtechnischen Arbeiten und das Screening der entsprechenden ES-Zellklone zur Generierung einer *Kcnv2-knockout/lacZ-knockin*-Maus durchgeführt.

Die Strategie zur Generierung einer Mauslinie mit *Kcnv2*-Gendeletion und *lacZ-knockin* entsprach in ihren Grundzügen der zur Generierung der *Pde6h-knockout*-Maus verwendeten Strategie. Mittels molekularbiologischer Methoden wurde von Prof. Dr. Bernd Wissinger ein Targeting-Konstrukt generiert, in dem der codierende Bereich des *Kcnv2*-Gens passgenau durch das *lacZ*-Gen ersetzt wurde, so dass später in der lebenden Maus das *lacZ*-Gen unter dem nativen Promotor exprimiert wird. Zusätzlich beinhaltete das Konstrukt zur Durchführung einer Positiv- und Negativselektion eine von zwei loxP-Erkennungssequenzen flankierte NeoTK-Resistenzgenkassette, die mittels Cre-Rekombination deletiert werden konnte. Dieses Konstrukt wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Elektroporation in embryonale Stammzellen von Mäusen eingebracht und nach homologer Rekombination und Selektion mit G418 wurden insgesamt drei von 1296 isolierten Klonen mit korrekter Rekombination identifiziert (L2-Klone). Dies entspricht einer Rekombinationseffizienz von ca. 2%, was den in der Literatur beschriebenen Werten von ca. 1% nahe kommt (Thomas et al. 1986). Mit zwei dieser L2-Klone wurde anschließend ein zweites Targeting begonnen, indem die gewählten Zellklone mit einem die Cre-Rekombinase transient exprimierenden Vektor transfiziert wurden. Nach Negativselektion mit Ganciclovir wurden zahlreiche L1-Klone, also Stammzellklone mit *Kcnv2-knockout/lacZ-knockin* isoliert und der Genotyp mittels PCR und Southern Blot-Analyse verifiziert. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit stehen mehrere Klone zur Blastozysteninjektion bereit, um auch hier chimäre Mäuse zu generieren. Bei erfolgreicher Blastozysteninjektion mit dem Ergebnis hochchimärer männlicher Mäuse würde sich als nächstes die Verpaarung der chimären Tiere zur Überprüfung der Keimbahntransmission anschließen.

Abgeleitet von der bisher bekannten Funktion von Kv8.2 und den Symptomen der CDSRR-Patienten mit Mutationen in *KCNV2* ist zu vermuten, dass Mäuse mit homozygotem *Kcnv2-knockout* eine Funktionsbeeinträchtigung sowohl der Zapfen- als auch der Stäbchenphotorezeptoren aufweisen werden. Möglich wäre beispielsweise eine eingeschränkte Farbwahrnehmung und eine beeinträchtigte Verarbeitung der Lichtreize bzw. eine veränderte Anpassungsfähigkeit der Photorezeptoren an verschiedene Lichtverhältnisse. Nach Etablierung der entsprechenden Mauslinie sollen diese Parameter durch funktionale Analysen der Netzhaut untersucht werden. Da das *Kcnv2*-Gen in den zu generierenden Mäusen passgenau durch das Reportergen *lacZ* ersetzt wurde, können durch Analyse der Expression von *lacZ* (β -Galactosidase) über eine X-gal-Färbung in verschiedenen Geweben der homozygot mutierten Tiere Aussagen über das native Expressionsmuster von *Kcnv2* in der Maus getroffen werden (Hall et al. 1983). Dabei wird X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -

D-Galactopyranosid) in Gewebeschnitten als Substrat der β -Galactosidase, welche durch das lacZ-Gen kodiert wird, zu 5-Bromo-4-Chloro-3-Hydroxyindol umgesetzt, ein unlösliches blaues Produkt, das in den Schnitten leicht zu detektieren ist und somit eine einfache Expressionsanalyse zulässt (Lojda 1970).

6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die genetische Ablation von Pde6h und Kcnv2 in der Maus mittels molekularbiologischer Methoden mit dem Ziel der Generierung der Pde6h-*knockout*-sowie der Kcnv2-*knockout*-lacZ-*knockin*-Mauslinie als neue Krankheitsmodelle für erbliche Netzhauterkrankungen.

Das Pde6h-Gen codiert für die inhibitorische γ '-Untereinheit der zapfenspezifischen Phosphodiesterase, welche in der Phototransduktion an der Umwandlung des Lichtsignals in ein neuronales Signal beteiligt ist. Die Aktivierung der PDE in der Phototransduktion erfolgt nach Lichteinfall in die Netzhaut über Transducin, welches im aktivierten Zustand an die inhibitorische Untereinheit der Zapfen-PDE bindet, diese vom katalytischen Kern abdissoziiert und somit die katalytische Aktivität der PDE in Gang setzt. Die Hydrolyse von cGMP durch die PDE resultiert schließlich in einem Schließen von CNG-Kanälen, was wiederum eine verminderte Glutamatfreisetzung an der Photorezeptorsynapse zur Folge hat. Abgesehen von der beschriebenen physiologischen Funktion ist bislang noch sehr wenig über Pde6h bekannt, das Gen wird aber schon seit längerer Zeit als potentielles Krankheitsgen im Zusammenhang mit erblichen Netzhauterkrankungen diskutiert und erforscht. Um die genaue Funktion von Pde6h und die biochemischen Funktionsparameter der Zapfen-Phototransduktion sowie die Expression und Funktion von Pde6h auch in nichtretinalen Geweben zu erforschen, sollte in der vorliegenden Arbeit das Pde6h-Gen sowohl konstitutiv als auch konditional in der Maus deletiert werden. Durch Vergleich der Phänotypen der *knockout*-Mäuse mit wildtyp-Kontrolltieren können dann Rückschlüsse auf die biologische Funktion von Pde6h gezogen werden.

Basierend auf dem Cre/loxP-System wurde eine Strategie entwickelt, mit der die Generierung sowohl des konstitutiven als auch des konditionalen Pde6h-*knockouts* erreicht werden kann. Anhand der Genstruktur wurden die proteincodierenden Exone 2-4 ausgewählt, um sie mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus mit zwei loxP-Sequenzen zu flankieren. In zahlreichen Klonierungsschritten wurde hierfür ein geeignetes DNS-Konstrukt hergestellt, und dieses in Stammzellen von Mäusen eingebracht. Das Konstrukt integrierte an entsprechender Stelle ins Genom der Stammzellen, und die gewünschten Stammzellklone mit homologer Rekombination konnten durch Verwendung von Selektionsmedium und Southern Blot-Analyse identifiziert werden. Nach Blastozysteninjektion dieser Stammzellklone mit anschließendem Embryotransfer in pseudoschwangere Ammen wurden mehrere hochchimäre Mäuse geboren. Die Chimärenverpaarung resultierte in zwei Tieren mit nachgewiesener Keimbahngängigkeit der Mutation, und durch Einkreuzen von CMV-„Cre-Deleter“-Tieren sowie anschließendem Auskreuzen des Cre-Transgens konnte so die Pde6h-*knockout*-Linie etabliert werden. Immunfluoreszenz-Analysen mit einem spezifisch gegen die inhibitorische γ '-Untereinheit der Zapfen-PDE gerichteten Antikörper an Pde6h^{-/-}-

Retinaschnitten bestätigten die Deletion von Pde6h. Mäuse mit dieser konventionellen Deletion des Pde6h-Gens sind lebensfähig und können nun mit verschiedenen Tests auf verhaltensbiologische und physiologische Störungen hin untersucht werden. Erste Analysen der Netzhautfunktion mittels Elektroretinogramm, OCT und SLO zeigten jedoch bislang keinen Unterschied zwischen Pde6h^{-/-}-Tieren und wildtyp-Kontrollen, was eventuell auf kompensatorische Effekt zurückzuführen sein könnte. Eine potentielle Möglichkeit hierfür wäre beispielsweise die kompensatorische Expression von Pde6g nicht nur in Stäbchen sondern auch in Pde6h^{-/-}-Zapfen. Weitere Untersuchungen beispielsweise an Mäusen mit einem Pde6g/Pde6h-Doppelknockout oder auch die Generierung von Pde6h^{-/-}-Nrl^{-/-}-Mäusen mit einer „zapfendominierten“ Netzhaut könnten zur Aufklärung dieser kompensatorischen Mechanismen beitragen. Durch Verpaarung der Mäuse mit von zwei loxP-Sequenzen flankierten Exonen mit entsprechenden Cre-exprimierenden Mäusen kann das Pde6h-Gen auch selektiv in ausgewählten Geweben oder zeitlich kontrollierbar deletiert werden. Dies bietet weitere Möglichkeiten zur Aufklärung der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen des Pde6h-Gens.

Vom Kcnv2-Gen wird vermutet, dass es für eine modulatorische Untereinheit des spannungsgesteuerten Kaliumkanals in den Innensegmenten der Photorezeptoren codiert, welcher an der Modulation von lichtinduzierten Signalen beteiligt ist. Mutationen in KCNV2 verursachen beim Menschen eine bestimmte Form der Netzhautdystrophie, weshalb das Gen für die Erforschung erblicher Netzhauterkrankungen ebenfalls von großem Interesse ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Kcnv2-*knockout-lacZ-knockin*-Konstrukt, welches ebenfalls auf dem Cre/loxP-System basiert und das lacZ-Gen unter dem nativen Kcnv2-Promotor exprimiert, mittels homologer Rekombination in embryonale Stammzellen von Mäusen eingebracht und in den Stammzellen die Selektionskassette mit Hilfe der Cre-Rekombinase entfernt. Stammzellklone mit homologer Rekombination sowie Deletion der Selektionskassette wurden mittels Southern Blot sowie PCR-Analyse identifiziert und ausgewählte Klone zur Blastozysteninjektion vorbereitet. Mit Hilfe der Blastozysteninjektion können zukünftig chimäre Tiere generiert werden, und nach weiterer Verpaarung mit wildtyp-Mäusen wird getestet, ob eine Keimbahntransmission vorliegt. Nach Etablierung der entsprechenden Mauslinie sollen anschließend physiologische und pathophysiologische Parameter studiert und indirekt über die Expression von lacZ auch die Expression von Kcnv2 in nichtretinalen Geweben analysiert werden.

7 Literaturverzeichnis

- Abremski & Hoess (1984). "Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein." *J Biol Chem* **259**(3): 1509-1514.
- Abremski, Hoess & Sternberg (1983). "Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination." *Cell* **32**(4): 1301-1311.
- Akimoto, Filippova, Gage, Zhu, Craft & Swaroop (2004). "Transgenic mice expressing Cre-recombinase specifically in M- or S-cone photoreceptors." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(1): 42-47.
- al-Jandal, Farrar, Kiang, Humphries, Bannon, Findlay, Humphries & Kenna (1999). "A novel mutation within the rhodopsin gene (Thr-94-Ile) causing autosomal dominant congenital stationary night blindness." *Hum Mutat* **13**(1): 75-81.
- al-Ubaidi, Hollyfield, Overbeek & Baehr (1992). "Photoreceptor degeneration induced by the expression of simian virus 40 large tumor antigen in the retina of transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(4): 1194-1198.
- Aravind & Ponting (1997). "The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins." *Trends Biochem Sci* **22**(12): 458-459.
- Arshavsky & Bownds (1992). "Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP." *Nature* **357**(6377): 416-417.
- Arshavsky, Dumke, Zhu, Artemyev, Skiba, Hamm & Bownds (1994). "Regulation of transducing GTPase activity in bovine rod outer segments." *J Biol Chem* **269**(31): 19882-19887.
- Artemyev, Rarick, Mills, Skiba & Hamm (1992). "Sites of interaction between rod G-protein alpha-subunit and cGMP-phosphodiesterase gamma-subunit. Implications for the phosphodiesterase activation mechanism." *J Biol Chem* **267**(35): 25067-25072.
- Atkinson, Robertson & Ganetzky (1991). "A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus." *Science* **253**(5019): 551-555.
- Babinet & Cohen-Tannoudji (2001). "Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian biology." *An Acad Bras Cienc* **73**(3): 365-383.
- Baehr, Devlin & Applebury (1979). "Isolation and characterization of cGMP phosphodiesterase from bovine rod outer segments." *J Biol Chem* **254**(22): 11669-11677.
- Balling (2001). "ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2**: 463-492.
- Bareil, Hamel, Delague, Arnaud, Demaille & Claustres (2001). "Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the beta-subunit of the rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa." *Hum Genet* **108**(4): 328-334.
- Barry & Nerbonne (1996). "Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity." *Annu Rev Physiol* **58**: 363-394.
- Bayes, Giordano, Balcells, Grinberg, Vilageliu, Martinez, Ayuso, Benitez, Ramos-Arroyo, Chivelet & et al. (1995). "Homozygous tandem duplication within the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase as a cause for autosomal recessive retinitis pigmentosa." *Hum Mutat* **5**(3): 228-234.
- Beddington & Robertson (1989). "An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo." *Development* **105**(4): 733-737.

- Beech & Barnes (1989). "Characterization of a voltage-gated K⁺ channel that accelerates the rod response to dim light." *Neuron* **3**(5): 573-581.
- Bender & Beavo (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use." *Pharmacol Rev* **58**(3): 488-520.
- Birnboim & Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523.
- Bondarenko, Desai, Dua, Yamazaki, Amin, Yousif, Kinumi, Ohashi, Komori, Matsumoto, Jackson, Hayashi, Usukura, Lipkin & Yamazaki (1997). "Residues within the polycationic region of cGMP phosphodiesterase gamma subunit crucial for the interaction with transducin alpha subunit. Identification by endogenous ADP-ribosylation and site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* **272**(25): 15856-15864.
- Bradley, Evans, Kaufman & Robertson (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." *Nature* **309**(5965): 255-256.
- Branda & Dymecki (2004). "Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice." *Dev Cell* **6**(1): 7-28.
- Bruder, Schultz & Schultz (2006). "Characterization of the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 5 using a cyanobacterial adenylyl cyclase as a reporter enzyme." *J Biol Chem* **281**(29): 19969-19976.
- Burns & Baylor (2001). "Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells." *Annu Rev Neurosci* **24**: 779-805.
- Capecchi (1989). "Altering the genome by homologous recombination." *Science* **244**(4910): 1288-1292.
- Carter-Dawson & LaVail (1979). "Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy." *J Comp Neurol* **188**(2): 245-262.
- Chang, Grau, Dangel, Hurd, Jurklies, Sener, Andreasson, Dollfus, Baumann, Bolz, Artemyev, Kohl, Heckenlively & Wissinger (2009). "A homologous genetic basis of the murine cpfl1 mutant and human achromatopsia linked to mutations in the PDE6C gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(46): 19581-19586.
- Chang, Hawes, Hurd, Davisson, Nusinowitz & Heckenlively (2002). "Retinal degeneration mutants in the mouse." *Vision Res* **42**(4): 517-525.
- Chen, Zhang, Church-Kopish, Huang, Zhang, Chen, Frederick & Baehr (2001). "Characterization of human GRK7 as a potential cone opsin kinase." *Mol Vis* **7**: 305-313.
- Cideciyan, Jacobson, Gupta, Osawa, Locke, Weiss, Wright, Birch & Milam (2003). "Cone deactivation kinetics and GRK1/GRK7 expression in enhanced S cone syndrome caused by mutations in NR2E3." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(3): 1268-1274.
- Coetzee, Amarillo, Chiu, Chow, Lau, McCormack, Moreno, Nadal, Ozaita, Pountney, Saganich, Vega-Saenz de Miera & Rudy (1999). "Molecular diversity of K⁺ channels." *Ann N Y Acad Sci* **868**: 233-285.
- Cook, Ghomashchi, Gelb, Florio & Beavo (2001). "The delta subunit of type 6 phosphodiesterase reduces light-induced cGMP hydrolysis in rod outer segments." *J Biol Chem* **276**(7): 5248-5255.
- Corbin, Blount, Weeks, Beasley, Kuhn, Ho, Saidi, Hurley, Kotera & Francis (2003). "[³H]sildenafil binding to phosphodiesterase-5 is specific, kinetically heterogeneous, and stimulated by cGMP." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1364-1372.
- Corbin, Turko, Beasley & Francis (2000). "Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities." *Eur J Biochem* **267**(9): 2760-2767.

- Cote, Bowns & Arshavsky (1994). "cGMP binding sites on photoreceptor phosphodiesterase: role in feedback regulation of visual transduction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 4845-4849.
- Curcio, Sloan, Packer, Hendrickson & Kalina (1987). "Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry." *Science* **236**(4801): 579-582.
- Czirjak, Toth & Enyedi (2007). "Characterization of the heteromeric potassium channel formed by kv2.1 and the retinal subunit kv8.2 in *Xenopus* oocytes." *J Neurophysiol* **98**(3): 1213-1222.
- DAmours & Cote (1999). "Regulation of photoreceptor phosphodiesterase catalysis by its non-catalytic cGMP-binding sites." *Biochem J* **340** (Pt 3): 863-869.
- Danciger, Heilbron, Gao, Zhao, Jacobson & Farber (1996). "A homozygous PDE6B mutation in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa." *Mol Vis* **2**: 10.
- Daniele, Lillo, Lyubarsky, Nikonov, Philp, Mears, Swaroop, Williams & Pugh (2005). "Cone-like morphological, molecular, and electrophysiological features of the photoreceptors of the Nrl knockout mouse." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(6): 2156-2167.
- Danielian, Muccino, Rowitch, Michael & McMahon (1998). "Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase." *Curr Biol* **8**(24): 1323-1326.
- Deterre, Bigay, Forquet, Robert & Chabre (1988). "cGMP phosphodiesterase of retinal rods is regulated by two inhibitory subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(8): 2424-2428.
- Dolly & Parcej (1996). "Molecular properties of voltage-gated K⁺ channels." *J Bioenerg Biomembr* **28**(3): 231-253.
- Dryja, Finn, Peng, McGee, Berson & Yau (1995). "Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22): 10177-10181.
- Dryja, Hahn, Reboul & Arnaud (1996). "Missense mutation in the gene encoding the alpha subunit of rod transducin in the Nougaret form of congenital stationary night blindness." *Nat Genet* **13**(3): 358-360.
- Evans & Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." *Nature* **292**(5819): 154-156.
- Fauser, Lubrichs & Schuttauf (2002). "Genetic animal models for retinal degeneration." *Surv Ophthalmol* **47**(4): 357-367.
- Feil, Brocard, Mascrez, LeMeur, Metzger & Chambon (1996). "Ligand-activated site-specific recombination in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 10887-10890.
- Feinberg & Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal Biochem* **132**(1): 6-13.
- Feinberg & Vogelstein (1984). ""A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum." *Anal Biochem* **137**(1): 266-267.
- Fischer, Huber, Beck, Tanimoto, Muehlfriedel, Fahl, Grimm, Wenzel, Reme, van de Pavert, Wijnholds, Pacal, Bremner & Seeliger (2009). "Noninvasive, in vivo assessment of mouse retinal structure using optical coherence tomography." *PLoS One* **4**(10): e7507.
- Francis, Turko & Corbin (2001). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **65**: 1-52.
- Gal, Orth, Baehr, Schwinger & Rosenberg (1994). "Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness." *Nat Genet* **7**(1): 64-68.
- Gal, Orth, Baehr, Schwinger & Rosenberg (1994). "Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness." *Nat Genet* **7**(4): 551.

- Gillespie & Beavo (1988). "Characterization of a bovine cone photoreceptor phosphodiesterase purified by cyclic GMP-sepharose chromatography." *J Biol Chem* **263**(17): 8133-8141.
- Gillespie & Beavo (1989). "cGMP is tightly bound to bovine retinal rod phosphodiesterase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(11): 4311-4315.
- Gillespie, Prusti, Apel & Beavo (1989). "A soluble form of bovine rod photoreceptor phosphodiesterase has a novel 15-kDa subunit." *J Biol Chem* **264**(21): 12187-12193.
- Gonzalez-Fernandez, Kurz, Bao, Newman, Conway, Young, Han & Khani (1999). "11-cis retinol dehydrogenase mutations as a major cause of the congenital night-blindness disorder known as fundus albipunctatus." *Mol Vis* **5**: 41.
- Gouras, Eggers & MacKay (1983). "Cone dystrophy, nyctalopia, and supernormal rod responses. A new retinal degeneration." *Arch Ophthalmol* **101**(5): 718-724.
- Granovsky, Natochin & Artemyev (1997). "The gamma subunit of rod cGMP-phosphodiesterase blocks the enzyme catalytic site." *J Biol Chem* **272**(18): 11686-11689.
- Gu, Marth, Orban, Mossmann & Rajewsky (1994). "Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting." *Science* **265**(5168): 103-106.
- Gutman, Chandy, Grissmer, Lazdunski, McKinnon, Pardo, Robertson, Rudy, Sanguinetti, Stuhmer & Wang (2005). "International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels." *Pharmacol Rev* **57**(4): 473-508.
- Hall, Jacob, Ringold & Lee (1983). "Expression and regulation of Escherichia coli lacZ gene fusions in mammalian cells." *J Mol Appl Genet* **2**(1): 101-109.
- Hasty, Rivera-Perez & Bradley (1991). "The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells." *Mol Cell Biol* **11**(11): 5586-5591.
- Hayashi (1994). "Light-dependent in vivo phosphorylation of an inhibitory subunit of cGMP-phosphodiesterase in frog rod photoreceptor outer segments." *FEBS Lett* **338**(2): 203-206.
- He, Cowan & Wensel (1998). "RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction." *Neuron* **20**(1): 95-102.
- Heginbotham, Lu, Abramson & MacKinnon (1994). "Mutations in the K⁺ channel signature sequence." *Biophys J* **66**(4): 1061-1067.
- Hille (1978). "Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches." *Biophys J* **22**(2): 283-294.
- Hoess & Abremski (1984). "Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(4): 1026-1029.
- Holzenberger, Lenzner, Leneuve, Zaoui, Hamard, Vaultont & Bouc (2000). "Cre-mediated germline mosaicism: a method allowing rapid generation of several alleles of a target gene." *Nucleic Acids Res* **28**(21): E92.
- Huang, Pittler, Huang, Oliveira, Berson & Dryja (1995). "Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the alpha subunit of rod cGMP phosphodiesterase." *Nat Genet* **11**(4): 468-471.
- Huber, Beck, Grimm, Sahaboglu-Tekgoz, Paquet-Durand, Wenzel, Humphries, Redmond, Seeliger & Fischer (2009). "Spectral domain optical coherence tomography in mouse models of retinal degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(12): 5888-5895.
- Hugnot, Salinas, Lesage, Guillemare, de Weille, Heurteaux, Mattei & Lazdunski (1996). "Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels." *EMBO J* **15**(13): 3322-3331.
- Jeon, Strettoi & Masland (1998). "The major cell populations of the mouse retina." *J Neurosci* **18**(21): 8936-8946.

- Jin, Hatton, Swartz, Xia, Harrington, Larsen & Rhoades (2000). "Hypoxia activates jun-N-terminal kinase, extracellular signal-regulated protein kinase, and p38 kinase in pulmonary arteries." *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**(5): 593-601.
- Johnston, Pickett & Barker (1990). "Autoradiography using storage phosphor technology." *Electrophoresis* **11**(5): 355-360.
- Jorgenson & Lukacs (1983). "Capillary zone electrophoresis." *Science* **222**(4621): 266-272.
- Kawamura & Tachibanaki (2008). "Rod and cone photoreceptors: molecular basis of the difference in their physiology." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **150**(4): 369-377.
- Kellendonk, Tronche, Monaghan, Angrand, Stewart & Schutz (1996). "Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486." *Nucleic Acids Res* **24**(8): 1404-1411.
- Kellner, Renner & Tillack (2004b). "[Hereditary retinchoroidal dystrophies. Part 2: differential diagnosis]." *Ophthalmologe* **101**(4): 397-412; quiz 413-394.
- Kellner, Tillack & Renner (2004a). "[Hereditary retinchoroidal dystrophies. Part 1: Pathogenesis, diagnosis, therapy and patient counselling]." *Ophthalmologe* **101**(3): 307-319; quiz 320.
- Kellner & Wachtlin (2008). *Retina - Diagnostik und Therapie der Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts*. Stuttgart, Thieme Verlag.
- Kilby, Snaith & Murray (1993). "Site-specific recombinases: tools for genome engineering." *Trends Genet* **9**(12): 413-421.
- Klenchin, Sukharev, Serov, Chernomordik & Chizmadzhev Yu (1991). "Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis." *Biophys J* **60**(4): 804-811.
- Kohl, Baumann, Broghammer, Jagle, Sieving, Kellner, Spegal, Anastasi, Zrenner, Sharpe & Wissinger (2000). "Mutations in the CNGB3 gene encoding the beta-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated channel are responsible for achromatopsia (ACHM3) linked to chromosome 8q21." *Hum Mol Genet* **9**(14): 2107-2116.
- Kohl, Baumann, Rosenberg, Kellner, Lorenz, Vadala, Jacobson & Wissinger (2002). "Mutations in the cone photoreceptor G-protein alpha-subunit gene GNAT2 in patients with achromatopsia." *Am J Hum Genet* **71**(2): 422-425.
- Kohl, Marx, Giddings, Jagle, Jacobson, Apfelstedt-Sylla, Zrenner, Sharpe & Wissinger (1998). "Total colourblindness is caused by mutations in the gene encoding the alpha-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated cation channel." *Nat Genet* **19**(3): 257-259.
- Kohl, Varsanyi, Antunes, Baumann, Hoyng, Jagle, Rosenberg, Kellner, Lorenz, Salati, Jurklics, Farkas, Andreasson, Weleber, Jacobson, Rudolph, Castellan, Dollfus, Legius, Anastasi, Bitoun, Lev, Sieving, Munier, Zrenner, Sharpe, Cremers & Wissinger (2005). "CNGB3 mutations account for 50% of all cases with autosomal recessive achromatopsia." *Eur J Hum Genet* **13**(3): 302-308.
- Koller, Hagemann, Doetschman, Hagaman, Huang, Williams, First, Maeda & Smithies (1989). "Germline 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.
- Korenbrodt & Rebrük (2002). "Tuning outer segment Ca²⁺ homeostasis to phototransduction in rods and cones." *Adv Exp Med Biol* **514**: 179-203.
- Kramer, Post, Brown & Kirsch (1998). "Modulation of potassium channel gating by coexpression of Kv2.1 with regulatory Kv5.1 or Kv6.1 alpha-subunits." *Am J Physiol* **274**(6 Pt 1): C1501-1510.
- Lakso, Pichel, Gorman, Sauer, Okamoto, Lee, Alt & Westphal (1996). "Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 5860-5865.

- Liu, Timmers, Lewin & Hauswirth (2005). "Ribozyme knockdown of the gamma-subunit of rod cGMP phosphodiesterase alters the ERG and retinal morphology in wild-type mice." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(10): 3836-3844.
- Lochhead, Nekrasova, Arshavsky & Pyne (1997). "The regulation of the cGMP-binding cGMP phosphodiesterase by proteins that are immunologically related to gamma subunit of the photoreceptor cGMP phosphodiesterase." *J Biol Chem* **272**(29): 18397-18403.
- Lojda (1970). "Indigogenic methods for glycosidases. II. An improved method for beta-D-galactosidase and its application to localization studies of the enzymes in the intestine and in other tissues." *Histochemie* **23**(3): 266-288.
- Martin (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.
- Martinez, Bruder, Schultz, Zheng, Schultz, Beavo & Linder (2005). "Crystal structure of the tandem GAF domains from a cyanobacterial adenylyl cyclase: modes of ligand binding and dimerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 3082-3087.
- Martinez, Wu, Glavas, Tang, Turley, Hol & Beavo (2002). "The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 13260-13265.
- Martins, Mumby & Beavo (1982). "Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues." *J Biol Chem* **257**(4): 1973-1979.
- Maugeri, Klevering, Rohrschneider, Blankenagel, Brunner, Deutman, Hoyng & Cremers (2000). "Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy." *Am J Hum Genet* **67**(4): 960-966.
- McLaughlin, Sandberg, Berson & Dryja (1993). "Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa." *Nat Genet* **4**(2): 130-134.
- Mears, Kondo, Swain, Takada, Bush, Saunders, Sieving & Swaroop (2001). "Nrl is required for rod photoreceptor development." *Nat Genet* **29**(4): 447-452.
- Meyers, Lewandoski & Martin (1998). "An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination." *Nat Genet* **18**(2): 136-141.
- Miller (2000). "Ion channels: doing hard chemistry with hard ions." *Curr Opin Chem Biol* **4**(2): 148-151.
- Minet, Arnould, Michel, Roland, Mottet, Raes, Remacle & Michiels (2000). "ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation." *FEBS Lett* **468**(1): 53-58.
- Morin, Vannier, Houdart, Regnacq, Berges & Voisin (2003). "A proline-rich domain in the gamma subunit of phosphodiesterase 6 mediates interaction with SH3-containing proteins." *Mol Vis* **9**: 449-459.
- Mou & Cote (2001). "The catalytic and GAF domains of the rod cGMP phosphodiesterase (PDE6) heterodimer are regulated by distinct regions of its inhibitory gamma subunit." *J Biol Chem* **276**(29): 27527-27534.
- Mou, Grazio, Cook, Beavo & Cote (1999). "cGMP binding to noncatalytic sites on mammalian rod photoreceptor phosphodiesterase is regulated by binding of its gamma and delta subunits." *J Biol Chem* **274**(26): 18813-18820.
- Mullis & Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Muradov, Granovsky, Schey & Artemyev (2002). "Direct interaction of the inhibitory gamma-subunit of Rod cGMP phosphodiesterase (PDE6) with the PDE6 GAFa domains." *Biochemistry* **41**(12): 3884-3890.

- Murray, MacLean & Pyne (2003). "An assessment of the role of the inhibitory gamma subunit of the retinal cyclic GMP phosphodiesterase and its effect on the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway in animal and cellular models of pulmonary hypertension." *Br J Pharmacol* **138**(7): 1313-1319.
- Nagy (2003). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nagy, Moens, Ivanyi, Pawling, Gertsenstein, Hadjantonakis, Purity & Rossant (1998). "Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles." *Curr Biol* **8**(11): 661-664.
- Nagy, Rossant, Nagy, Abramow-Newerly & Roder (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.
- Nakamura, Hotta, Tanikawa, Terasaki & Miyake (2000). "A high association with cone dystrophy in Fundus albipunctatus caused by mutations of the RDH5 gene." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(12): 3925-3932.
- Nasevicius & Ekker (2001). "The zebrafish as a novel system for functional genomics and therapeutic development applications." *Curr Opin Mol Ther* **3**(3): 224-228.
- Neumann, Schaefer-Ridder, Wang & Hofschneider (1982). "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields." *EMBO J* **1**(7): 841-845.
- Nishiwaki, Komori, Sagara, Suzuki, Manabe, Hosoya, Nojima, Wada, Tanaka, Okamoto & Masai (2008). "Mutation of cGMP phosphodiesterase 6alpha'-subunit gene causes progressive degeneration of cone photoreceptors in zebrafish." *Mech Dev* **125**(11-12): 932-946.
- Norton, D'Amours, Grazio, Hebert & Cote (2000). "Mechanism of transducin activation of frog rod photoreceptor phosphodiesterase. Allosteric interactions between the inhibitory gamma subunit and the noncatalytic cGMP-binding sites." *J Biol Chem* **275**(49): 38611-38619.
- Norton, Hosier, Terew, Li, Dhingra, Vardi, Baehr & Cote (2005). "Evaluation of the 17-kDa prenyl-binding protein as a regulatory protein for phototransduction in retinal photoreceptors." *J Biol Chem* **280**(2): 1248-1256.
- Okada & Asakawa (2002). "Allosteric activation of cGMP-specific, cGMP-binding phosphodiesterase (PDE5) by cGMP." *Biochemistry* **41**(30): 9672-9679.
- Okada, Ernst, Palczewski & Hofmann (2001). "Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies." *Trends Biochem Sci* **26**(5): 318-324.
- Olsson, Gordon, Pawlyk, Roof, Hayes, Molday, Mukai, Cowley, Berson & Dryja (1992). "Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa." *Neuron* **9**(5): 815-830.
- Omori & Kotera (2007). "Overview of PDEs and their regulation." *Circ Res* **100**(3): 309-327.
- Otschysch, Raes, Van Hoorick & Snyders (2002). "Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 7986-7991.
- Papazian, Schwarz, Tempel, Jan & Jan (1987). "Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila." *Science* **237**(4816): 749-753.
- Papazian, Timpe, Jan & Jan (1991). "Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence." *Nature* **349**(6307): 305-310.
- Patel, Lazdunski & Honore (1997). "Kv2.1/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed-rectifier K⁺ channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes." *EMBO J* **16**(22): 6615-6625.
- Patterson (1994). "Leukemia inhibitory factor, a cytokine at the interface between neurobiology and immunology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(17): 7833-7835.

- Payne, Downes, Bessant, Taylor, Holder, Warren, Bird & Bhattacharya (1998). "A mutation in guanylate cyclase activator 1A (GUCA1A) in an autosomal dominant cone dystrophy pedigree mapping to a new locus on chromosome 6p21.1." *Hum Mol Genet* **7**(2): 273-277.
- Piri, Gao, Danciger, Mendoza, Fishman & Farber (2005). "A substitution of G to C in the cone cGMP-phosphodiesterase gamma subunit gene found in a distinctive form of cone dystrophy." *Ophthalmology* **112**(1): 159-166.
- Plasterk & Groenen (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.
- Pongs (1999). "Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement." *FEBS Lett* **452**(1-2): 31-35.
- Post, Kirsch & Brown (1996). "Kv2.1 and electrically silent Kv6.1 potassium channel subunits combine and express a novel current." *FEBS Lett* **399**(1-2): 177-182.
- Rajewsky, Gu, Kuhn, Betz, Muller, Roes & Schwenk (1996). "Conditional gene targeting." *J Clin Invest* **98**(3): 600-603.
- Rattner, Sun & Nathans (1999). "Molecular genetics of human retinal disease." *Annu Rev Genet* **33**: 89-131.
- Rehemtulla, Warwar, Kumar, Ji, Zack & Swaroop (1996). "The basic motif-leucine zipper transcription factor Nrl can positively regulate rhodopsin gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1): 191-195.
- Rong & Golic (2001). "A targeted gene knockout in *Drosophila*." *Genetics* **157**(3): 1307-1312.
- Rudy (1988). "Diversity and ubiquity of K channels." *Neuroscience* **25**(3): 729-749.
- Rybalkin, Rybalkina, Shimizu-Albergine, Tang & Beavo (2003). "PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain." *EMBO J* **22**(3): 469-478.
- Saiki, Gelfand, Stoffel, Scharf, Higuchi, Horn, Mullis & Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-491.
- Sakamoto, McCluskey, Wensel, Naggert & Nishina (2009). "New mouse models for recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the *Pde6a* gene." *Hum Mol Genet* **18**(1): 178-192.
- Salchow, Gouras, Doi, Goff, Schwinger & Tsang (1999). "A point mutation (W70A) in the rod PDE-gamma gene desensitizing and delaying murine rod photoreceptors." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(13): 3262-3267.
- Salinas, de Weille, Guillemare, Lazdunski & Hugnot (1997a). "Modes of regulation of shab K⁺ channel activity by the Kv8.1 subunit." *J Biol Chem* **272**(13): 8774-8780.
- Salinas, Duprat, Heurteaux, Hugnot & Lazdunski (1997b). "New modulatory alpha subunits for mammalian Shab K⁺ channels." *J Biol Chem* **272**(39): 24371-24379.
- Sanger, Nicklen & Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Sauer & Henderson (1989). "Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome." *Nucleic Acids Res* **17**(1): 147-161.
- Schneeweis & Schnapf (1995). "Photovoltage of rods and cones in the macaque retina." *Science* **268**(5213): 1053-1056.
- Schwenk, Baron & Rajewsky (1995). "A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells." *Nucleic Acids Res* **23**(24): 5080-5081.
- Seeliger, Grimm, Stahlberg, Friedburg, Jaissle, Zrenner, Guo, Reme, Humphries, Hofmann, Biel, Fariss, Redmond & Wenzel (2001). "New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis." *Nat Genet* **29**(1): 70-74.

- Sheng, Liao, Jan & Jan (1993). "Presynaptic A-current based on heteromultimeric K⁺ channels detected in vivo." *Nature* **365**(6441): 72-75.
- Slep, Kercher, He, Cowan, Wensel & Sigler (2001). "Structural determinants for regulation of phosphodiesterase by a G protein at 2.0 Å." *Nature* **409**(6823): 1071-1077.
- Smith, Heath, Donaldson, Wong, Moreau, Stahl & Rogers (1988). "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." *Nature* **336**(6200): 688-690.
- Sohocki, Daiger, Bowne, Rodriguez, Northrup, Heckenlively, Birch, Mintz-Hittner, Ruiz, Lewis, Saperstein & Sullivan (2001). "Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited retinopathies." *Hum Mutat* **17**(1): 42-51.
- Stargardt (1909). "Über familiäre, progressive Degeneration in der Maculagegend des Auges." *Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol* **71**: 534-550.
- Stearns, Evangelista, Fadool & Brockerhoff (2007). "A mutation in the cone-specific pde6 gene causes rapid cone photoreceptor degeneration in zebrafish." *J Neurosci* **27**(50): 13866-13874.
- Stocker, Hellwig & Kerschensteiner (1999). "Subunit assembly and domain analysis of electrically silent K⁺ channel alpha-subunits of the rat Kv9 subfamily." *J Neurochem* **72**(4): 1725-1734.
- Sukharev, Klenchin, Serov, Chernomordik & Chizmadzhev Yu (1992). "Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores." *Biophys J* **63**(5): 1320-1327.
- Swain, Hicks, Mears, Apel, Smith, John, Hendrickson, Milam & Swaroop (2001). "Multiple phosphorylated isoforms of NRL are expressed in rod photoreceptors." *J Biol Chem* **276**(39): 36824-36830.
- Tachibanaki, Tsushima & Kawamura (2001). "Low amplification and fast visual pigment phosphorylation as mechanisms characterizing cone photoresponses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 14044-14049.
- Tanimoto, Muehlfriedel, Fischer, Fahl, Humphries, Biel & Seeliger (2009). "Vision tests in the mouse: Functional phenotyping with electroretinography." *Front Biosci* **14**: 2730-2737.
- Tate, Arshavsky & Pyne (2002). "The identification of the inhibitory gamma-subunits of the type 6 retinal cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterase in non-retinal tissues: differential processing of mRNA transcripts." *Genomics* **79**(4): 582-586.
- Thomas & Capecchi (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." *Cell* **51**(3): 503-512.
- Thomas, Folger & Capecchi (1986). "High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome." *Cell* **44**(3): 419-428.
- Thomas, Francis & Corbin (1990). "Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP." *J Biol Chem* **265**(25): 14971-14978.
- Tsang, Gouras, Yamashita, Kjeldbye, Fisher, Farber & Goff (1996). "Retinal degeneration in mice lacking the gamma subunit of the rod cGMP phosphodiesterase." *Science* **272**(5264): 1026-1029.
- Venter, Adams, Myers, Li, Mural, Sutton, Smith, Yandell, Evans, Holt, Gocayne, Amanatides, Ballew, Huson, Wortman, Zhang, Kodira, Zheng, Chen, Skupski, Subramanian, Thomas, Zhang, Gabor Miklos, Nelson, Broder, Clark, Nadeau, McKusick, Zinder, Levine, Roberts, Simon, Slayman, Hunkapiller, Bolanos, Delcher, Dew, Fasulo, Flanigan, Florea, Halpern, Hannenhalli, Kravitz, Levy, Mobarry, Reinert, Remington, Abu-Threideh, Beasley, Biddick, Bonazzi, Brandon, Cargill, Chandramouliswaran, Charlab, Chaturvedi, Deng, Di Francesco, Dunn, Eilbeck, Evangelista, Gabrielian, Gan, Ge, Gong, Gu, Guan, Heiman, Higgins, Ji, Ke, Ketchum, Lai, Lei, Li, Li, Liang, Lin, Lu, Merkulov, Milshina, Moore, Naik, Narayan, Neelam, Nusskern, Rusch, Salzberg, Shao, Shue, Sun, Wang, Wang, Wang, Wang, Wei, Wides, Xiao, Yan, Yao, Ye, Zhan, Zhang, Zhang, Zhao, Zheng, Zhong, Zhong, Zhu, Zhao, Gilbert, Baumhueter, Spier, Carter, Cravchik, Woodage, Ali, An, Awe, Baldwin, Baden, Barnstead,

- Barrow, Beeson, Busam, Carver, Center, Cheng, Curry, Danaher, Davenport, Desilets, Dietz, Dodson, Doup, Ferriera, Garg, Gluecksmann, Hart, Haynes, Haynes, Heiner, Hladun, Hostin, Houck, Howland, Ibegwam, Johnson, Kalush, Kline, Koduru, Love, Mann, May, McCawley, McIntosh, McMullen, Moy, Moy, Murphy, Nelson, Pfannkoch, Pratts, Puri, Qureshi, Reardon, Rodriguez, Rogers, Romblad, Ruhfel, Scott, Sitter, Smallwood, Stewart, Strong, Suh, Thomas, Tint, Tse, Vech, Wang, Wetter, Williams, Williams, Windsor, Winn-Deen, Wolfe, Zaveri, Zaveri, Abril, Guigo, Campbell, Sjolander, Karlak, Kejariwal, Mi, Lazareva, Hatton, Narechania, Diemer, Muruganujan, Guo, Sato, Bafna, Istrail, Lippert, Schwartz, Walenz, Yooseph, Allen, Basu, Baxendale, Blick, Caminha, Carnes-Stine, Caulk, Chiang, Coyne, Dahlke, Mays, Dombroski, Donnelly, Ely, Esparham, Fosler, Gire, Glanowski, Glasser, Glodek, Gorokhov, Graham, Gropman, Harris, Heil, Henderson, Hoover, Jennings, Jordan, Jordan, Kasha, Kagan, Kraft, Levitsky, Lewis, Liu, Lopez, Ma, Majoros, McDaniel, Murphy, Newman, Nguyen, Nguyen, Nodell, Pan, Peck, Peterson, Rowe, Sanders, Scott, Simpson, Smith, Sprague, Stockwell, Turner, Venter, Wang, Wen, Wu, Wu, Xia, Zandieh & Zhu (2001). "The sequence of the human genome." *Science* **291**(5507): 1304-1351.
- Vogelstein & Gillespie (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(2): 615-619.
- Wan, Sambhi, Frame, Tate & Pyne (2001). "The inhibitory gamma subunit of the type 6 retinal cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterase is a novel intermediate regulating p42/p44 mitogen-activated protein kinase signaling in human embryonic kidney 293 cells." *J Biol Chem* **276**(41): 37802-37808.
- Wan, Sambhi, Tate, Waters & Pyne (2003). "The inhibitory gamma subunit of the type 6 retinal cGMP phosphodiesterase functions to link c-Src and G-protein-coupled receptor kinase 2 in a signaling unit that regulates p42/p44 mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor." *J Biol Chem* **278**(20): 18658-18663.
- Wang, Kunkel, Martin, Schwartzkroin & Tempel (1993). "Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons." *Nature* **365**(6441): 75-79.
- Wang, Lee & Malbon (2004). "PDE6 is an effector for the Wnt/Ca²⁺/cGMP-signalling pathway in development." *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 5): 792-796.
- Waterston, Lindblad-Toh, Birney, Rogers, Abril, Agarwal, Agarwala, Ainscough, Alexandersson, An, Antonarakis, Attwood, Baertsch, Bailey, Barlow, Beck, Berry, Birren, Bloom, Bork, Botcherby, Bray, Brent, Brown, Brown, Bult, Burton, Butler, Campbell, Carninci, Cawley, Chiaromonte, Chinwalla, Church, Clamp, Clee, Collins, Cook, Copley, Coulson, Couronne, Cuff, Curwen, Cutts, Daly, David, Davies, Delehaunty, Deri, Dermitzakis, Dewey, Dickens, Diekhans, Dodge, Dubchak, Dunn, Eddy, Elnitski, Emes, Eswara, Eyas, Felsenfeld, Fewell, Flicek, Foley, Frankel, Fulton, Fulton, Furey, Gage, Gibbs, Glusman, Gnerre, Goldman, Goodstadt, Grafham, Graves, Green, Gregory, Guigo, Guyer, Hardison, Haussler, Hayashizaki, Hillier, Hinrichs, Hlavina, Holzer, Hsu, Hua, Hubbard, Hunt, Jackson, Jaffe, Johnson, Jones, Jones, Joy, Kamal, Karlsson, Karolchik, Kasprzyk, Kawai, Keibler, Kells, Kent, Kirby, Kolbe, Korf, Kucherlapati, Kulbokas, Kulp, Landers, Leger, Leonard, Letunic, Levine, Li, Li, Lloyd, Lucas, Ma, Maglott, Mardis, Matthews, Mauceli, Mayer, McCarthy, McCombie, McLaren, McLay, McPherson, Meldrim, Meredith, Mesirov, Miller, Miner, Mongin, Montgomery, Morgan, Mott, Mullikin, Muzny, Nash, Nelson, Nhan, Nicol, Ning, Nusbaum, O'Connor, Okazaki, Oliver, Overton-Larty, Pachter, Parra, Pepin, Peterson, Pevzner, Plumb, Pohl, Poliakov, Ponce, Ponting, Potter, Quail, Reymond, Roe, Roskin, Rubin, Rust, Santos, Sapojnikov, Schultz, Schultz, Schwartz, Schwartz, Scott, Seaman, Searle, Sharpe, Sheridan, Shownkeen, Sims, Singer, Slater, Smit, Smith, Spencer, Stabenau, Stange-Thomann, Sugnet, Suyama, Tesler, Thompson, Torrents, Trevaskis, Tromp, Ucla, Ureta-Vidal, Vinson, Von Niederhausern, Wade, Wall, Weber, Weiss, Wendl, West, Wetterstrand, Wheeler, Whelan, Wierzbowski, Willey, Williams, Wilson, Winter, Worley, Wyman, Yang, Yang, Zdobnov, Zody & Lander (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." *Nature* **420**(6915): 520-562.

- Williams, Hilton, Pease, Willson, Stewart, Gearing, Wagner, Metcalf, Nicola & Gough (1988). "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells." *Nature* **336**(6200): 684-687.
- Wilson & Smyth (2006). "Internalization and recycling of the human prostacyclin receptor is modulated through its isoprenylation-dependent interaction with the delta subunit of cGMP phosphodiesterase 6." *J Biol Chem* **281**(17): 11780-11786.
- Winick, Blundell, Galke, Salam, Leal & Karayiorgou (1999). "Homozygosity mapping of the Achromatopsia locus in the Pingelapese." *Am J Hum Genet* **64**(6): 1679-1685.
- Wissinger, Dangel, Jagle, Hansen, Baumann, Rudolph, Wolf, Bonin, Koeppen, Ladewig, Kohl, Zrenner & Rosenberg (2008). "Cone dystrophy with supernormal rod response is strictly associated with mutations in KCNV2." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**(2): 751-757.
- Wissinger, Gamer, Jagle, Giorda, Marx, Mayer, Tippmann, Broghammer, Jurklies, Rosenberg, Jacobson, Sener, Tatlipinar, Hoyng, Castellan, Bitoun, Andreasson, Rudolph, Kellner, Lorenz, Wolff, Verellen-Dumoulin, Schwartz, Cremers, Apfelstedt-Sylla, Zrenner, Salati, Sharpe & Kohl (2001). "CNGA3 mutations in hereditary cone photoreceptor disorders." *Am J Hum Genet* **69**(4): 722-737.
- Wu, Cowing, Michaelides, Wilkie, Jeffery, Jenkins, Mester, Bird, Robson, Holder, Moore, Hunt & Webster (2006). "Mutations in the gene KCNV2 encoding a voltage-gated potassium channel subunit cause "cone dystrophy with supernormal rod electroretinogram" in humans." *Am J Hum Genet* **79**(3): 574-579.
- Xu, Li, Garrett-Beal, Larson, Wynshaw-Boris & Deng (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.
- Yamamoto, Sippel, Berson & Dryja (1997). "Defects in the rhodopsin kinase gene in the Oguchi form of stationary night blindness." *Nat Genet* **15**(2): 175-178.
- Yamazaki, Hayashi, Tatsumi, Bitensky & George (1990). "Interactions between the subunits of transducin and cyclic GMP phosphodiesterase in *Rana catesbiana* rod photoreceptors." *J Biol Chem* **265**(20): 11539-11548.
- Young & Bok (1969). "Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process." *J Cell Biol* **42**(2): 392-403.
- Zhang, Li, Doan, Rieke, Detwiler, Frederick & Baehr (2007). "Deletion of PrBP/delta impedes transport of GRK1 and PDE6 catalytic subunits to photoreceptor outer segments." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(21): 8857-8862.
- Zhang, Liu, Zhang, Chen, Frederick, Prestwich & Baehr (2004). "Photoreceptor cGMP phosphodiesterase delta subunit (PDEdelta) functions as a prenyl-binding protein." *J Biol Chem* **279**(1): 407-413.
- Zoraghi, Corbin & Francis (2004). "Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins." *Mol Pharmacol* **65**(2): 267-278.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2005 bis März 2010 unter wissenschaftlicher Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Peter Ruth und Herrn Prof. Dr. Bernd Wissinger am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Ruth möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung des spannenden Themas und die gute Betreuung während der Doktorarbeit bedanken, sowie für das entgegengebrachte Vertrauen, seine Offenheit und seinen ausgeprägten Optimismus.

Prof. Dr. Bernd Wissinger danke ich für die zuverlässige Betreuung, viele hilfreiche Tipps und Tricks rund um die Molekularbiologie, einige „Leihgaben“ als Klonierungshilfen sowie die Einführung in die Welt der Netzhautforschung.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Stammzellkultur, die Organisation der Blastozysteninjektionen sowie die Organisation des Tierstalls möchte ich mich bei PD Dr. Matthias Sausbier sowie Dr. Ulrike Sausbier bedanken.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Clément, der mit seiner Fröhlichkeit und seiner optimistischen Grundeinstellung selbst in schwierigen Phasen immer gute Laune ins Labor bringt. Seine hervorragenden praktischen Kenntnisse waren eine große Hilfe. Auch Isolde gilt ein großer Dank für die zuverlässige Versorgung des Arbeitskreises mit den nötigen Materialien sowie für ihre große Hilfsbereitschaft.

Herrn Hans Bröckel möchte ich für die Versorgung der Tiere und für die vielen schwäbischen Späße in Labor und Büro danken.

Bei Sylvia Bolz bedanke ich mich für die Einführung in die Immunhistochemie, die Durchführung der immunhistochemischen Analysen sowie die Bereitstellung der Ergebnisse.

Herrn Dr. Naoyuki Tanimoto möchte ich für die zuverlässige Durchführung und Auswertung der funktionalen Netzhautanalysen der Mäuse danken sowie für die geduldige Beantwortung meiner Fragen.

Für die stets zuverlässige und schnelle Sequenzierung aller Proben danke ich Monika Papke und Britta Baumann.

Dank auch an Prof. Dr. Johannes Wilbertz und seine Mitarbeiter vom Karolinska Center for Transgene Technologies, Stockholm, für die erfolgreiche Durchführung der Blastozysteninjektionen.

Ein sehr großer Dank geht insbesondere an Timm, meinen Promotions- und (manchmal auch) Leidensgefährten, für unsere Freundschaft, das große gegenseitige Vertrauen, die hervorragende Zusammenarbeit und die nette Begleitung durch zahlreiche Hochs und Tiefs. Durch seine äußerst zuverlässige Hilfe ermöglichte er während der monatelangen Zellkulturzeit zahlreiche freie Tage, und viele einsame Stunden in Zell- und Isotopenlabor wurden durch seine Mitarbeit belebt und verkürzt.

Claus danke ich für die hervorragende Einführung sowohl in molekularbiologische Arbeitsmethoden als auch in die Geheimnisse der Zellkultur und natürlich für die geduldige Beantwortung unzähliger Fragen.

Bei Anne, Anja, Olga, Julia, Usamah, Markus, Sevi, Katja, Katrin, Karin und allen meinen anderen Kolleginnen und Kollegen sowie ehemaligen Mitarbeitern der 7. Ebene bedanke ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme und fröhliche Atmosphäre während der Arbeit, aber auch bei unseren zahlreichen Unternehmungen nach Laborschluss.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Eltern und meine Familie für jegliche Unterstützung und den grenzenlosen Rückhalt, den sie mir jederzeit gegeben haben.

Franz danke ich von ganzem Herzen für seine unermüdliche persönliche Unterstützung, sein „offenes Ohr“ für alle Probleme und sein Verständnis, sowie für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit.

Schließlich möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danken.

Meine wichtigsten akademischen Lehrer an der Eberhard Karls Universität Tübingen waren neben Prof. Dr. Peter Ruth und Prof. Dr. Bernd Wissinger:

Prof. Dr. Gisela Drews

Prof. Dr. Lutz Heide

Prof. Dr. Karl-Artur Kovar

Prof. Dr. Stefan Laufer

Prof. Dr. Peter C. Schmidt

Prof. Dr. Joachim E. Schultz

Prof. Dr. Martin Wahl

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christina Brennenstuhl
Geburtsdatum	04.01.1980
Geburtsort	Tübingen
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

09/1986 – 07/1990	Grundschule Pfrondorf
09/1990 – 07/1999	Wildermuth-Gymnasium Tübingen

Studium und beruflicher Werdegang

10/1999 – 03/2004	Pharmaziestudium, Eberhard Karls Universität Tübingen
09/2001	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
06/2004	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
06/2004 – 12/2004	Praktikum, Merckle Gmbh, Ulm
12/2004 – 06/2005	Praktikum, Mühlen-Apotheke, Reutlingen-Betzingen
07/2005	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Approbation als Apothekerin
10/2005 – 03/2010	Dissertation bei Herrn Prof. Dr. Peter Ruth, Pharmazeutisches Institut, Pharmakologie und Toxikologie, Universität Tübingen, zum Thema: „Genetische Ablation von Pde6h und Kcnv2 in der Maus zur Generierung neuer Modellsysteme für hereditäre Netzhauterkrankungen“