

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Humanbiologie

## Generierung und Analyse von Veränderungen im *CACNB2* Gen

Julia Johanna Brandmayr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Luksch

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann

2. Priv.-Doz. Dr. S. Moosmang

Die Dissertation wurde am 23.03.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09.07.2011 angenommen.



## Abstract

The functions of the *CACNB2* gene involved in physiological and pathophysiological processes in the cardiovascular system still remain unclear, although there is evidence that the  $\text{Ca}_v\beta_2$  protein performs important tasks *in vivo*. The present work explores these processes and tasks by means of two novel knock-in mouse models. The first mouse model, the  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -mouse, analyzes the role of the  $\text{Ca}_v\beta_2$  subunit in phosphorylation cascades (PKA, CaMKII, Akt/PKB). Preliminary biochemical and electrophysiological experiments were initiated to resolve the relevance of these phosphorylation events *in vivo*. The second mouse model, the  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STREP}$  mouse, was generated to systematically analyze the interaction partners and associated signaling pathways of the  $\text{Ca}_v\beta_2$  subunit, by means of combining an innovative affinity purification system with transgenic *in vivo* technologies.

---

## Zusammenfassung

Die Funktionen des *CACNB2* Gens bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im kardiovaskulären System sind bis dato ungeklärt, obwohl es viele Hinweise auf wichtige Aufgaben des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteins *in vivo* gibt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen diese Aufgaben und Prozesse mit Hilfe von zwei neuartigen Mausmodellen beleuchtet werden. Das erste Modell, die  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Mauslinie, dient dazu, die Rolle der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit bei Phosphorylierungskaskaden (PKA, CaMKII, Akt/PKB) zu analysieren. Erste biochemische und elektrophysiologische Experimente wurden durchgeführt, um die Relevanz der Phosphorylierungsstellen *in vivo* zu klären. Das zweite Modell, die  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STREP}$ -Mauslinie, wurde generiert, um die Interaktionspartner und die damit verbundenen Signalwege der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit systematisch, mit einem innovativen Kombinationssystem aus transgenen Technologien und einem neuartigen Affinitätsaufreinigungssystem, zu analysieren.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>SPANNUNGSABHÄNGIGE CALCIUMKANÄLE .....</b>	<b>2</b>
1.2	<b>DIE ROLLE DES CACNB2 GENS IM L-TYP CALCIUMKANALKOMPLEX .....</b>	<b>5</b>
1.2.1	<i>Die Ca<sub>v</sub>β-Untereinheiten .....</i>	<i>5</i>
1.2.2	<i>Die Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit .....</i>	<i>7</i>
1.3	<b>REGULATIONSMECHANISMEN DES L-TYP CALCIUMKANALKOMPLEXES .....</b>	<b>8</b>
1.3.1	<i>Die cAMP-abhängige Proteinkinase PKA .....</i>	<i>8</i>
1.3.2	<i>Phosphorylierung mittels Akt/PKB .....</i>	<i>10</i>
1.3.3	<i>Regulation von L-Typ Calciumkanälen durch CaMKII .....</i>	<i>11</i>
1.4	<b>Ca<sub>v</sub>β-PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN .....</b>	<b>13</b>
1.4.1	<i>Strukturelle Eigenschaften der Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit .....</i>	<i>13</i>
1.4.2	<i>Tandem-Affinitätsaufreinigung: OneStrep-Tag .....</i>	<i>14</i>
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
3.1	<b>VERWENDETE MAUSLINIEN .....</b>	<b>18</b>
3.2	<b>BAKTERIENKULTUR .....</b>	<b>19</b>
3.2.1	<i>Verwendete Plasmide .....</i>	<i>19</i>
3.2.2	<i>Verwendete Bakterienstämme .....</i>	<i>20</i>
3.2.3	<i>Kultivierung der Bakterienstämme .....</i>	<i>20</i>
3.2.4	<i>Transformation von Bakterien .....</i>	<i>21</i>
3.3	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....</b>	<b>22</b>
3.3.1	<b>Isolierung von Nukleinsäuren .....</b>	<b>22</b>
3.3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen .....	22
3.3.1.2	Isolierung von genomischer DNA .....	23
3.3.1.3	Isolierung von RNA aus Gewebe .....	24
3.3.2	<b>Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren .....</b>	<b>25</b>
3.3.3	<b>Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion .....</b>	<b>26</b>
3.3.3.1	Verwendete DNA-Polymerasen .....	27
3.3.3.2	QuikChange II Site-Directed Mutagenese .....	28
3.3.3.3	Reverse-Transkription Polymerasekettenreaktion .....	29
3.3.4	<b>Gelelektrophorese .....</b>	<b>29</b>
3.3.5	<b>Reinigung von Nukleinsäuren .....</b>	<b>31</b>
3.3.6	<b>Quantifizierung von Nukleinsäuren .....</b>	<b>32</b>
3.3.7	<b>Sequenzanalyse von DNA .....</b>	<b>32</b>
3.3.8	<b>Analyse mittels Southern-Blotting .....</b>	<b>32</b>
3.4	<b>KULTIVIERUNG UND VERÄNDERUNG VON HEK293T-ZELLEN .....</b>	<b>35</b>
3.4.1	<i>Ausbringen und Expandieren von HEK293T-Zellen .....</i>	<i>36</i>
3.4.2	<i>Transiente Transfektion und Ernte .....</i>	<i>37</i>
3.5	<b>METHODEN ZUR ERZEUGUNG GENETISCH VERÄNDERTER MÄUSE .....</b>	<b>37</b>
3.5.1	<b>Kultivierung embryonaler Stammzellen .....</b>	<b>37</b>
3.5.1.1	Embryonale Stammzellen .....	37
3.5.1.2	Ausbringen, Passagieren und Einfrieren der ES-Zellen .....	39
3.5.2	<b>Feederzellen .....</b>	<b>40</b>
3.5.2.1	Präparation und Kultivierung der Feederzellen .....	40
3.5.2.2	Inaktivierung und Einfrieren der Feederzellen .....	41
3.5.3	<b>Gentargeting mittels homologer Rekombination .....</b>	<b>41</b>
3.5.3.1	Vorbereitung des Gentargetingkonstrukts, Elektroporation .....	42

3.5.3.2	Positivselektion und Isolierung der Zellklone .....	43
3.5.4	<i>Blastozysteninjektion</i> .....	44
3.5.4.1	Vorbereitung der ES-Zellen .....	45
3.5.4.2	Gewinnung der Blastozysten .....	45
3.5.4.3	Injektion und Operation .....	45
3.5.5	<i>Etablieren der Knock-in Mauslinie</i> .....	46
3.6	BIOCHEMISCHE METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DER GENETISCHEN VERÄNDERUNGEN .....	47
3.6.1	<i>Proteingewinnung aus Gewebe</i> .....	47
3.6.2	<i>Proteingewinnung aus Zellen</i> .....	47
3.6.3	<i>Aufreinigung von OneStrep-Tag-Fusionsproteinen</i> .....	48
3.6.4	<i>Überexpression von GST-Fusions-Proteinen</i> .....	49
3.6.5	<i>Quantitative Proteinbestimmung</i> .....	50
3.6.6	<i>Western-Blot</i> .....	50
3.6.7	<i>Co-Immunpräzipitation</i> .....	53
3.7	PHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER GENETISCHEN VERÄNDERUNG .....	54
3.7.1	<i>Ultraschallmessung</i> .....	54
3.7.2	<i>Elektrokardiogramm</i> .....	54
3.7.3	<i>Präparation der Kardiomyozyten und Elektrophysiologie</i> .....	55
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>56</b>
4.1	GENERIERUNG DER $Ca_v\beta_2$ STOP-MAUSLINIE .....	56
4.1.1	<i>Gentargetingstrategie</i> .....	56
4.1.1.1	Herstellung des $Ca_v\beta_2$ STOP-Gentargetingkonstrukts .....	57
4.1.1.2	Überprüfung des Gentargetingkonstrukts .....	60
4.1.2	<i>Gentargeting mittels homologer Rekombination</i> .....	61
4.1.2.1	Untersuchung der ES-Zellklone .....	62
4.1.2.2	Sequenzanalyse des positiven ES-Zellklons .....	63
4.1.3	<i>Blastozysteninjektion</i> .....	64
4.1.4	<i>Untersuchung der <math>Ca_v\beta_2</math>STOP-Mauslinie</i> .....	65
4.1.4.1	Primäre Charakterisierung .....	65
4.1.4.2	Genotypisierung und Sequenzanalyse der genomischen DNA .....	65
4.1.4.3	Sequenzanalyse der cDNA .....	66
4.1.5	<i>Expressionsanalyse</i> .....	68
4.1.6	<i>Physiologische Grundcharakterisierung</i> .....	70
4.1.6.1	Makroskopische Betrachtung des Herzens .....	70
4.1.6.2	Ultraschallmessungen .....	70
4.1.6.3	Elektrokardiogramm .....	71
4.1.6.4	Elektrophysiologie .....	73
4.2	ANALYSE DES $Ca_v\beta_2$ -INTERAKTOMS .....	74
4.2.1	<i>OneStrepTag</i> .....	74
4.2.2	<i>Überexpression von GST-<math>Ca_v\beta_2</math>STREP-Fusionsproteinen</i> .....	74
4.2.2.1	Klonieren des GST- $Ca_v\beta_2$ STREP-Fusionsproteins .....	74
4.2.2.2	Detektion des Fusionsproteins im Herzlysat .....	76
4.2.3	<i>OneStrep-Tag Fusionsexperimente: in vitro Vorversuche in HEK293T-Zellen</i> .....	76
4.2.3.1	Herstellung des Expressionsplasmids $Ca_v\beta_2$ STREP in pcDNA3 .....	76
4.2.3.2	Etablieren der Aufreinigung und Detektion des OneStrepTag-Konstrukts .....	78
4.3	GENERIERUNG DER $Ca_v\beta_2$ STREP-MAUSLINIE .....	80
4.3.1	<i>Gentargetingstrategie</i> .....	80
4.3.1.1	Herstellung des $Ca_v\beta_2$ STREP-Gentargetingkonstrukts .....	81
4.3.1.2	Überprüfung des Gentargetingkonstrukts .....	82
4.3.2	<i>Gentargeting mittels homologer Rekombination</i> .....	84
4.3.2.1	Untersuchung der ES-Zellklone .....	84
4.3.2.2	Sequenzanalyse der positiven ES-Zellklone .....	85

---

4.3.3	<i>Blastozysteninjektion</i> .....	86
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>87</b>
5.1	DIE $Ca_v\beta_2$ STOP-MAUSLINIE .....	88
5.1.1	<i>Generierung und primäre Charakterisierung der Mauslinie</i> .....	88
5.1.2	<i><math>Ca_v1.2</math>-Expression der <math>Ca_v\beta_2</math>STOP-Mauslinie</i> .....	90
5.1.3	<i>Akute Regulation der <math>Ca_v\beta_2</math>STOP-Mauslinie via PKA</i> .....	92
5.1.4	<i><math>CaMKII</math>-abhängige Phosphorylierung und Fazilitierung</i> .....	94
5.2	INTERAKTIONSTUDIEN: $Ca_v\beta_2$ STREP-MAUSLINIE .....	96
5.2.1	<i>In vitro-Experimente</i> .....	97
5.2.2	<i>Generierung der <math>Ca_v\beta_2</math>STREP-Mauslinie</i> .....	98
5.3	AUSBLICK .....	98
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>108</b>
8.1	CHEMIKALIEN UND REAGENZEN .....	108
8.2	GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	109
8.3	ENZYME .....	110
8.4	OLIGONUKLEOTIDE .....	111
8.5	ANTIKÖRPER .....	112

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1-1 PHYLOGENTISCHER STAMMBAUM DER <i>CACNA1</i> -GENE.....	2
ABBILDUNG 1-2 AUFBAU EINES L-TYP-CALCIUMKANALS .....	3
ABBILDUNG 1-3 ERREGUNGS-KONTRAKTIONSKOPPLUNG .....	5
ABBILDUNG 1-4 $CA_{vB}$ -STRUKTUR .....	6
ABBILDUNG 1-5 INTERAKTION VON $CA_{v1.2}$ UND $CA_{vB}$ .....	6
ABBILDUNG 1-6 $CA_{vB_2}$ -EXON14: PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN .....	8
ABBILDUNG 1-7 PKA-PHOSPHORYLIERUNG .....	9
ABBILDUNG 1-8 PKA-PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN IM LTCC-KOMPLEX.....	10
ABBILDUNG 1-9 AKT/PKB-SIGNALWEG .....	11
ABBILDUNG 1-10 CAMKII-PHOSPHORYLIERUNG UND FAZILITIERUNG .....	12
ABBILDUNG 1-11 $CA_{vB}$ -MAGUK: VERGLEICH DER STRUKTUR.....	13
ABBILDUNG 1-12 UNTERSUCHUNG DES INTERAKTOMS MITTELS ONESTREP-TAG-SYSTEM.....	15
ABBILDUNG 3-1 AUFBAU KAPILLARBLOTTING .....	34
ABBILDUNG 3-2 TAG AND EXCHANGE-STRATEGIE.....	42
ABBILDUNG 3-3 VORGEHEN BEI DER ES-ZELLKULTUR .....	42
ABBILDUNG 4-1 DETAILDARSTELLUNG VON EXON14 UND DER GENTARGETINGSTRATEGIE .....	56
ABBILDUNG 4-2 GENTARGETINGSTRATEGIE $CA_{vB_2}$ STOP-MAUS.....	57
ABBILDUNG 4-3 VERÄNDERUNGEN IN pBL(CLA1-PST1).....	58
ABBILDUNG 4-4 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KLONIERUNG DES $CA_{vB_2}$ STOP-GENTARGETINGVEKTORS.....	59
ABBILDUNG 4-5 RESTRIKTIONSANALYSE DES $CA_{vB_2}$ STOP-GENTARGETINGVEKTORS.....	60
ABBILDUNG 4-6 CRE-REKOMBINATION .....	60
ABBILDUNG 4-7 SEQUENZANALYSE EXON13 .....	61
ABBILDUNG 4-8 SEQUENZANALYSE EXON 14 .....	61
ABBILDUNG 4-9 PCR-STRATEGIE .....	62
ABBILDUNG 4-10 SOUTHERNBLOT-STRATEGIE.....	63
ABBILDUNG 4-11 SEQUENZANALYSE 3'ARM KLON 2H2B .....	63
ABBILDUNG 4-12 VERPAARUNGSSCHEMA $CA_{vB_2}$ STOP-MAUSLINIE .....	64
ABBILDUNG 4-13 GENOTYPISIERUNGS-STRATEGIE DER $CA_{vB_2}$ STOP-MAUSLINIE .....	65
ABBILDUNG 4-14 GENOTYPISIERUNG UND SEQUENZANALYSE DER KNOCK-IN-MÄUSE .....	66
ABBILDUNG 4-15 SEQUENZANALYSE DER KNOCK-IN-CDNA .....	67
ABBILDUNG 4-16 SEQUENZANALYSE DER KNOCK-IN-CDNA .....	67
ABBILDUNG 4-17 WESTERNBLOT-ANALYSE VON HERZ- UND HIRN-MEMBRANPRÄPARATION .....	68
ABBILDUNG 4-18 CO-IMMUNPRÄZIPITATION VON $CA_{v1.2}$ MIT ANTI $CA_{vB_2N4/1195}$ .....	69
ABBILDUNG 4-19 VERHÄLTNIS VON HERZGEWICHT (HW) ZU TIBIALÄNGE (TL).....	70
ABBILDUNG 4-20 FRACTIONAL SHORTENING .....	71
ABBILDUNG 4-21 EKG-MESSUNG.....	72
ABBILDUNG 4-22 MESSUNG VON CALCIUMSTRÖMEN IN VENTRIKULÄREN MYOZYTEN .....	73
ABBILDUNG 4-23 SEQUENZ ONESTREP-TAG MIT BAMHI-SCHNITTSTELLEN.....	74
ABBILDUNG 4-24 KLONIERUNG DES pGEX- $CA_{vB_2}$ STREP-KONSTRUKTES .....	75
ABBILDUNG 4-25 RESTRIKTIONS- UND SEQUENZANALYSE DES pGEX- $CA_{vB_2}$ STREP-KONSTRUKTES .....	75
ABBILDUNG 4-26 DETEKTION VON GST-FUSIONSPROTEINEN .....	76
ABBILDUNG 4-27 KLONIERUNG DES pCDNA3- $CA_{vB_2}$ STREP-KONSTRUKTES.....	77
ABBILDUNG 4-28 RESTRIKTIONS- UND SEQUENZANALYSE DER $CA_{vB_2}$ STREP-SEQUENZ I.pCDNA3 .....	77
ABBILDUNG 4-29 EXPRESSION UND DETEKTION VON $CA_{vB_2}$ STREP- UND $CA_{v1.2}$ -PROTEIN .....	78
ABBILDUNG 4-30 AUFREINIGUNG VON $CA_{vB_2}$ STREP ÜBER STREP TACTIN SUPERFLOW.....	79
ABBILDUNG 4-31 $CA_{vB_2}$ STREP-GENTARGETINGSTRATEGIE .....	80
ABBILDUNG 4-32 EINFÜGEN DER ONESTREP-SEQUENZ AN EXON 14 DER GENOMISCHEN $CA_{vB_2}$ -DNA-SEQUENZ .....	81
ABBILDUNG 4-33 KLONIERUNG DES $CA_{vB_2}$ STREP-GENTARGETINGKONSTRUKTS .....	82



---

ABBILDUNG 4-34 SEQUENZANALYSE DES CA <sub>v</sub> B <sub>2</sub> STREP GENTARGETINGKONSTRUKTS.....	83
ABBILDUNG 4-35 RESTRIKTIONSANALYSE DES STREP-GENTARGETINGVEKTORS .....	84
ABBILDUNG 4-36 STREP-PCR-STRATEGIE UND POSITIVE ES-KLONE .....	85
ABBILDUNG 4-37 SOUTHERNBLOT-STRATEGIE UND POSITIVE ES-KLONE .....	85
ABBILDUNG 4-38 SEQUENZANALYSE DER POSITIVEN ONESTREPTAG-ES-ZELLKLONE.....	86
ABBILDUNG 5-1 PEST-SEQUENZEN DER CA <sub>v</sub> 1.2-UNTEREINHEIT UND AKT/PKB-PHOSPHORYLIERUNG DER CA <sub>v</sub> B <sub>2</sub> -UNTEREINHEIT ...	91
ABBILDUNG 5-2 PKA-PHOSPHORYLIERUNGSTELLEN IM LTCC-KOMPLEX.....	93

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1-1 EINTEILUNG DER CALCIUMKANÄLE .....	3
TABELLE 1-2 GEWEBEEXPRESSSION DER CA <sub>v</sub> B-UNTEREINHEIT .....	5
TABELLE 4-1 VERERBUNG DER CA <sub>v</sub> B <sub>2</sub> STOP-MUTATION .....	65

## Abkürzungsverzeichnis

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calciumionenkonzentration
°C	Grad Celsius
A, mA	Ampere, Milliampere
ABP	<i>alpha binding pocket</i>
AC	Adenylatzyklase, <i>adenyl cyclase</i>
AID	<i>alpha interaction domain</i>
AKAP	A-Kinase Anker-Protein
Akt/PKB	Serin-/Threonin Proteinkinase, Proteinkinase B
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BK <sub>Ca</sub>	Ca <sup>2+</sup> -aktivierte Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit, <i>big conductance</i>
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
bpm	Schläge pro Minute, <i>beats per minute</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaMKII	Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	zyklisches ( <i>cyclic</i> ) Adenosinmonophosphat
CBP	<i>Calmodulin binding Peptide</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure, <i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, <i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
CMV	Cytomegalovirus
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
C-Terminus, C-terminal	Carboxy-Terminus, Carboxy-terminal
DCT	distaler Carboxy-Terminus
DHP	Dihydropyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonuklein-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAD	frühe Nachdepolarisation, <i>early after depolarizations</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Zellen	embryonale Fibroblasten, "Feederzellen"
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Farad
FBS	fetales, bovines Serum
FS	linksventrikuläre Durchmesserverkürzung, <i>fractional shortening</i>
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GK	Guanylatkinase
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HEK	Humane embryonale Nierenzellen, <i>human embryonic kidney cells</i>
HIS	Hexahistidin
HPC	<i>Heavy Chain of Protein C</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horse radish peroxidase</i>
HVA	Hochspannungs-aktiviert, <i>high voltage activated</i>
HW	Herzgewicht, <i>heart weight</i>
I <sub>Ca</sub>	Calciumeinstrom
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1, <i>Insulin-like growth factor 1</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
Iso	Isoprenalin
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
Ki	knock-in
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
LK1	spezifische Ca <sub>v</sub> 1.2-cDNA für glatte Muskulatur
LTCC	L-Typ Calciumkanäle, <i>L-type calcium channels</i>
LVA	Niedrigspannungs-aktiviert, <i>low voltage activated</i>
M, mM, µM, nM	Mol, Millimol, Micromol, Nanomol
MAGUK	Membran-assoziierte Guanylatkinase
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase, Ladekontrolle
n.s.	nicht signifikant

Neo, <i>neo</i>	Neomycinresistenzgen
pA	Picoampere
pBI	pBluescript
pF	Picofarad
PBL	Phospholamban
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
p.c.	nach dem Geschlechtsverkehr, <i>post coitum</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PCT	proximaler Carboxy-Terminus
PDK1	Phosphatidyl abhängige Kinase 1, <i>Phosphatidyl dependent kinase 1</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKA <sub>c</sub>	katalytische PKA-Untereinheit
PKA <sub>r</sub>	regulatorische PKA-Untereinheit
PKC	Proteinkinase C
P <sub>o</sub>	Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals, <i>channel open probability</i>
PTEN	Lipidphosphatase, <i>phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10</i>
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>revolutions per minute</i>
RGK	Proteinfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine
RT	Raumtemperatur
RyR2	Ryanodinrezeptor 2
sek, ms	Sekunde, Millisekunde
Ser	Serin
SERCA	Sarko-/endoplasmatisches Retikulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
SF	<i>sine facilitation</i> , Mauslinie mit verminderter Fazilitierung
SH3	Scr homology 3
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
ssDNA	Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure, <i>single stranded DNA</i>
TAC	Hypertrophiemodell durch Verengen der Aorta; <i>tranverse aortic constriction</i>
TAP	Tandemaffinitätsaufreinigung, <i>tandem affinity purification</i>
TBE	Trisborat-gepufferte EDTA-Lösung
TBS	Trisborat-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TGA; TAA	Stop-Codon (Tyrosin-Guanin-Adenosin; Tyrosin-Adenosin-Adenosin)
Thr	Threonin
TL	Tibialänge
U	Einheit, <i>unit</i>
V, mV	Volt, Millivolt
VGCC	Spannungs-aktivierte Calciumkanäle, <i>voltage-gated calcium channels</i>
WT	Wildtyp, Kontrolltiere
β-AR	β-Adrenozeptor, β-adrenerger Rezeptor
β-ME	β-Mercaptoethanol



## 1 Einleitung

Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sind in allen Zellen und Geweben vorkommende Botenstoffmoleküle (*second messenger*), die bei der Regulation einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie Kontraktion, Sekretion, Erinnerung und Gedächtnis, Fertilisation, Gentranskription und Zelltod eine entscheidende Rolle spielen. Wichtige Modulatoren der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sind spannungsabhängige Calciumkanäle, die in unterschiedlichen Zelltypen die physiologische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (100 nM) aufrechterhalten und den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  steuern. Besonders im Herzmuskel ist die Funktion spannungsabhängiger Calciumkanäle entscheidend, um eine verlässliche Pumpfunktion des Herzens zu gewährleisten. Spannungsabhängige Calciumkanäle werden durch Depolarisation der Zellmembran aktiviert und ermöglichen daraufhin, bis zu ihrer Inaktivierung oder Repolarisation der Membran, den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle. Durch die dadurch erfolgende transiente Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration werden unterschiedliche Reaktionen und Signalwege (z.B. Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kinase CaMKII und des Calciumsensors Calmodulin, Aktivierung des Ryanodinrezeptors im Sarkoplasmatischen Retikulum und darauf folgend die Entleerung der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Vorkommen) aktiviert. Der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in Herzmuskelzellen dauert ca. 100 ms und bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration um das Zehnfache des Basalwertes (Übersicht in Clapham, 2007).

Calciumkanäle sind Komplexe, die aus mehreren Untereinheiten bestehen. Die Öffnungseigenschaften der Calciumkanäle (d.h. Öffnung und Inaktivierung bei Subtyp-spezifischem Zellmembranpotential) sind durch die Zusammensetzung des Kanalkomplexes aus den verschiedenen Untereinheiten bestimmt, sie lassen sich aber auch durch Pharmaka, Hormone, Proteinkinasen und Phosphatasen beeinflussen. Eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Calciumkanalkomplexen wird dem *CACNB2* Gen zugeschrieben, das neben dem Transport des Kanalkomplexes zur Plasmamembran Phosphorylierungskaskaden entscheidend beeinflussen kann. Die von dem *CACNB2* Gen codierte  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit stellt jedoch nicht nur einen wichtigen Modulator des Calciumkanalkomplexes dar, sondern steht auch unter Verdacht, mit anderen Makroproteinkomplexen und Signalkaskaden zu interagieren und dadurch verschiedene zelluläre Prozesse zu beeinflussen.

## 1.1 Spannungsabhängige Calciumkanäle

Spannungsabhängige Calciumkanäle (*voltage gated calcium channels, VGCCs*) sind heteromultimere Makromoleküle, die als Haupteintrittswege für Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) den Calciumeinstrom in den meisten erregbaren Zellen, wie z.B. den Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), kontrollieren. VGCCs werden als Antwort auf die Depolarisation der Zellmembran während der Ausbildung von Aktionspotentialen aktiviert. Durch diese Aktivierung öffnet die Pore des Kanals, es kommt zur Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (in Herzmuskelzellen von 100 nM auf 1  $\mu\text{M}$ ). Dadurch wird eine Vielzahl von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Mechanismen wie Muskelkontraktion und -relaxation, Neurotransmission, neuronale Plastizität, Dendritenwachstum, Genexpression und Hormonsekretion angestoßen (Caterall, 2000). Pharmakologische Eigenschaften der VGCCs werden durch die Poren-bildende  $\text{Ca}_v\alpha_1$ -Untereinheit festgelegt; der Transport des Kanalkomplexes zur Zellmembran (Trafficking) sowie die Kinetik und die Amplitude des Stroms werden durch die weiteren Kanaluntereinheiten  $\text{Ca}_v\beta_{1-4}$ ,  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$  und  $\text{Ca}_v\gamma$  und durch den Calciumsensor Calmodulin (CaM) bestimmt (Birnbaumer et al., 1998).

Die  $\text{Ca}_v\alpha_1$ -Untereinheit ist ein Membranprotein, das aus vier Domänen (I-IV) mit je sechs Transmembransegmenten (S1-S6) besteht. Sie enthält die Bindungsstellen für die bekannten Calciumkanalblocker und -aktivatoren, den Spannungssensor (IS4-IVS4), der Änderungen des Zellmembranpotentials registriert, und den Selektivitätsfilter (IS5/S6-IVS5/S6) für zweiwertige Kationen. Es existieren zehn  $\text{Ca}_v\alpha_1$ -Untereinheiten, die unterschiedlich starke Homologien aufweisen und aufgrund ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften in LVA- (*low voltage activated*) und HVA- (*high voltage activated*) Calciumkanäle eingeteilt werden. Die Sequenzhomologie zwischen LVA- und HVA-Calciumkanälen liegt bei 30 %.

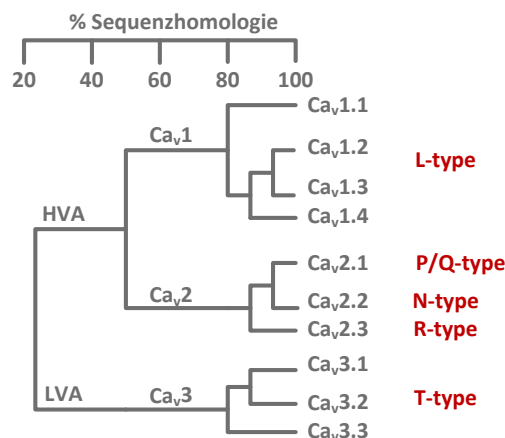


Abbildung 1-1 Phylogenetischer Stammbaum der *CACNA1*-Gene; Einteilung in HVA- und LVA-Kanäle

LVA-Calciumkanäle werden aufgrund ihrer transienten Eigenschaften, d.h. Aktivierung bei niedrigem Membranpotential (-70 mV bis -60 mV), geringe Leitfähigkeit (-30 mV bis -10 mV) und schnelle Inaktivierung (nach 10 ms), als T-Typ Kanäle (transient, tiny) bezeichnet (Übersicht in Ono and Iijima, 2010). Die HVA-Kanäle lassen sich anhand ihrer Gewebeexpression und ihrer Sensitivität gegenüber

spezifischen Pharmaka in L-Typ Calciumkanäle (L-type calcium channel, LTCC), P- (Purkinje), Q-, R- (remaining) und N- (neither L- nor T-Typ) Typ Calciumkanäle unterteilen (Tabelle 1-1) (Übersicht in Hofmann et al., 1999)

Bezeichnung		Gewebeexpression		Spezifische Blocker
HVA	L	Ca <sub>v</sub> 1.1 (α <sub>1S</sub> )	Skelettmuskel	1,4-Dihydropyridine(DHP) Phenylalkylamine (PAA) Benzothiazepine (BTZ)
		Ca <sub>v</sub> 1.2 (α <sub>1C</sub> )	Herzmuskulatur, glatte Muskulatur, Neuronen, Pankreas	
		Ca <sub>v</sub> 1.3 (α <sub>1D</sub> )	Sinusknoten, Haarzellen der Cochlea, Neuronen	
		Ca <sub>v</sub> 1.4 (α <sub>1F</sub> )	Retina	cis-Diltiazem
	P/Q	Ca <sub>v</sub> 2.1 (α <sub>1A</sub> )	Neuronen	ω-Agatoxin, ω-Conotoxin (MVIIC)
	N	Ca <sub>v</sub> 2.2 (α <sub>1B</sub> )	Neuronen	ω-Conotoxin (GVIA, MVIIC)
	R	Ca <sub>v</sub> 2.3 (α <sub>1E</sub> )	Neuronen, Pankreas	SNX-482
LVA	T	Ca <sub>v</sub> 3.1 (α <sub>1G</sub> )	Neuronen, Sinusknoten	Kurtoxin
		Ca <sub>v</sub> 3.2 (α <sub>1H</sub> )	Neuronen, Koronararterien	Kurtoxin
		Ca <sub>v</sub> 3.3 (α <sub>1I</sub> )	Neuronen	Kurtoxin

Tabelle 1-1 Einteilung der Calciumkanäle, Gewebeexpression und spezifische Blocker

### L-Typ Calciumkanäle

Im Herzmuskel spielen L-Typ Calciumkanäle („L“: *long lasting*, lange Öffnungszeit der Kanalpore) eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Herzmuskelkontraktion. L-Typ Calciumkanäle (Ca<sub>v</sub>1.x/Cav2.x) sind Multiproteinkomplexe, die mindestens aus vier Komponenten bestehen (Abbildung 1-2): der transmembranären, Poren-bildenden Ca<sub>v</sub>α<sub>1</sub>-Untereinheit, der im Zytoplasma lokalisierten Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit, der Membran-durchspannenden Ca<sub>v</sub>α<sub>2</sub>δ-Untereinheit und dem Calciumsensor Calmodulin (Van Petegem and Minor, 2006). In der Skelettmuskulatur ist zusätzlich die Ca<sub>v</sub>γ-Untereinheit ein Teil des Kanalkomplexes (Melzer et al., 2006).

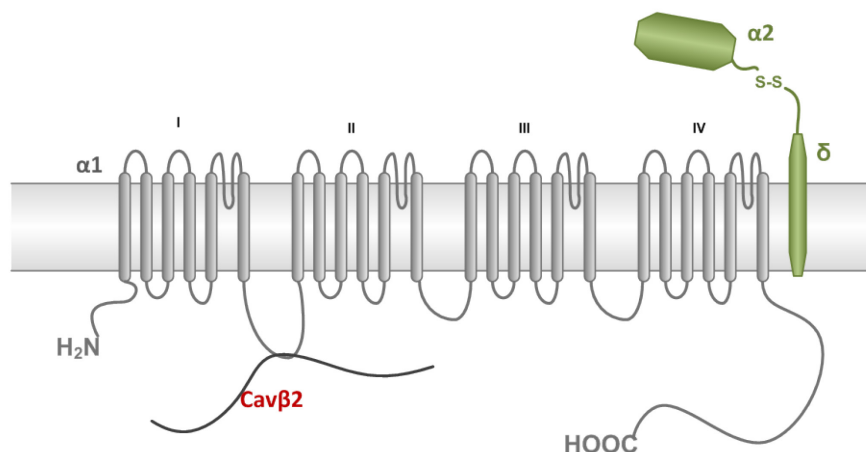


Abbildung 1-2 Aufbau eines L-Typ-Calciumkanals; grau: transmembranäre Ca<sub>v</sub>1.x-Untereinheit; grün: α<sub>2</sub>δ-Untereinheit; schwarz: intrazelluläre β-Untereinheit

Im Herzen ist v.a. der Ca<sub>v</sub>1.2-Calciumkanal (Myokard, Ventrikel und Vorhöfen), aber auch der Ca<sub>v</sub>1.3-Calciumkanal (Sinusknoten) exprimiert. Der knock-out des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals in der Maus (*Mus musculus*) führt zu einem fetal-letalen Phänotyp (Tag 14,5 p.c.)(Seisenberger et al., 2000).

## Die Erregungs-Kontraktions-Kopplung im Herzen

Ca<sub>v</sub>1.2 L-Typ Calciumkanäle kontrollieren über die Erregungs-Kontraktionskopplung die Kontraktion und Relaxation des Herzens. Unter Erregungs-Kontraktionskopplung versteht man die durch Aktionspotentiale ausgelöste Kontraktion der Herzmuskelzellen. Aktionspotentiale werden von Schrittmacherzellen erzeugt und breiten sich von Zelle zu Zelle aus. Dadurch wird die Erregung von den Vorhöfen auf die Ventrikeln übertragen. Ist die Erregungs-Kontraktionskopplung gestört, wie während einer Herzhypertrophie oder Herzinsuffizienz, kommt es zur Dysfunktion des Herzmuskels, z.B. zur Entstehung von Arrhythmien mit verlängerter Plateauphase des Aktionspotentials (Anderson, 2004; Wu et al., 2002).

Für die Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels ist das exakte Zusammenspiel unterschiedlicher Ionenkanäle und Ionentransporter notwendig. Während eines kardialen Aktionspotentials depolarisiert die Zellmembran, wodurch sich Ca<sub>v</sub>1.2 Calciumkanäle öffnen und Ca<sup>2+</sup> in die Zelle strömt. Durch die darauf folgende lokale Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration wird der Ryanodinrezeptor Typ 2 (RyR2) im Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) aktiviert, wodurch Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem SR freigesetzt werden (Bers, 2002). Dieser Prozess wird als Calcium-induzierte Calciumfreisetzung (*Ca<sup>2+</sup> induced Ca<sup>2+</sup> release*, CICR) bezeichnet. Durch diese Kombination aus Calciuminflux und CICR wird die globale Konzentration an freien Calciumionen ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) in der Zelle von 100 nM auf 1 µM angehoben. Die globale Erhöhung von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> führt zur Kontraktion der Muskelzellen. Dazu ist das Zusammenspiel von Bestandteilen der Myofilamente in den Muskelfasern in einer definierten Reihenfolge notwendig. Myofilamente stellen den Hauptbestandteil der Muskelfasern dar, sind fadenförmige Proteine und aus Myosin- und Aktinfilamenten aufgebaut. Ca<sup>2+</sup> bindet zunächst an Troponin C, einem Bestandteil der Aktinfilamente, was zur Konformationsänderung des Bestandteils Tropomyosin führt. Die dadurch bedingte Konformationsänderung des Tropomyosins ermöglicht das „Anheften“ und „Abdocken“ der Myosinfilamente an bzw. von Aktinfilamenten. Durch die spezifische Anordnung von Myosin- und Aktinfilamenten und die Verankerung der Aktinfilamente in Z-Scheiben der Muskelfasern, kommt es durch die beschriebenen Konformationsänderungen zu einer Verkürzung der Myofilamente und zur Kontraktion des Muskels. Für die Relaxation des Muskels muss Ca<sup>2+</sup> von Troponin C dissoziieren und das intrazellulär vorkommende, freie Calcium [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> entfernt werden. Das Entfernen von Ca<sup>2+</sup> aus dem Intrazellulärraum erfolgt über Natrium-Calcium-Austausch, Wiederaufnahme von Ca<sup>2+</sup> in das SR über die Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase) und Phospholamban oder Aufnahme von Ca<sup>2+</sup> durch Ca<sup>2+</sup>-Uniport in die Mitochondrien (Bers, 2002) (Schematische Darstellung in Abbildung 1-3).



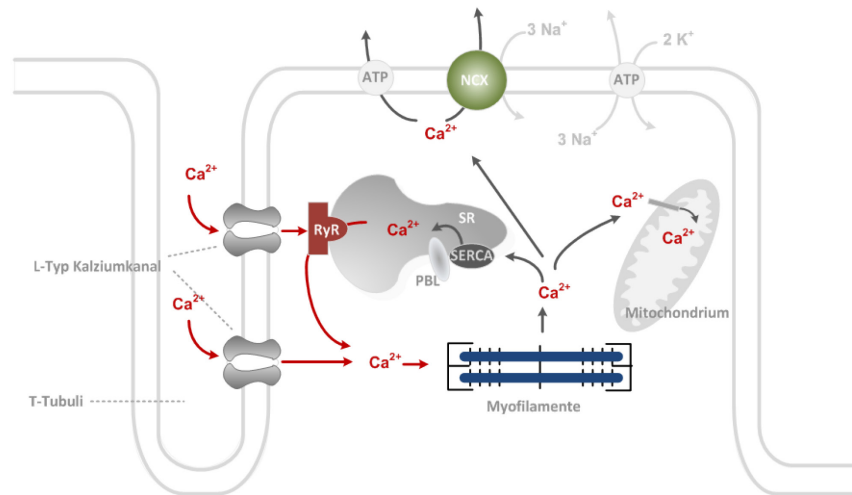


Abbildung 1-3 Erregungs-Kontraktionskopplung ; schematische Darstellung einer Herzzelle; RyR (Ryanodinrezeptor), PBL (Phospholamban), NCX (Natrium-Calcium-Austauscher), SR (Sarkoplasmatisches Retikulum)

Die Erregungs-Kontraktions-Kopplung kann durch verschiedene Faktoren, wie Kinasen und Phosphatasen (z.B. PKA, PKC, CaMKII, Calcineurin), die an den verschiedenen Untereinheiten des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanalkomplexes angreifen können, beeinflusst werden.

## 1.2 Die Rolle des CACNB2 Gens im L-Typ Calciumkanalkomplex

### 1.2.1 Die Ca<sub>v</sub>β-Untereinheiten

Es gibt vier Ca<sub>v</sub>β-Untereinheiten (Ca<sub>v</sub>β<sub>1-4</sub>), die von vier Genen (CACNB1-4) codiert und in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Die kristallographische Struktur der Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit ist bekannt (Van Petegem et al., 2004); der Vergleich der Ca<sub>v</sub>β-Sequenzen mit der räumlichen Struktur zeigt, dass die Ca<sub>v</sub>β-Proteine 5 Domänen beinhalten, wobei die Domänen 2 und 4 in allen Ca<sub>v</sub>β-Untereinheiten konserviert sind. Durch alternatives Spleißen, d.h. die Wahl alternativer Exone für die Domänen 1, 3 und 5, kann eine Vielzahl von Ca<sub>v</sub>β-Spleißvarianten entstehen.

Der knock-out im Mausmodell von Ca<sub>v</sub>β<sub>1</sub> und Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub> führt zu einem letalen Phänotyp (Gregg et al., 1996; Weissgerber et al., 2006), der knock-out von Ca<sub>v</sub>β<sub>3</sub> und Ca<sub>v</sub>β<sub>4</sub> zu einem milden Phänotyp in unterschiedlichen Geweben (Murakami et al., 2002).

	Größe	Gewebeexpression	Referenz
β <sub>1</sub>	55 kDa	Skelettmuskel	(Ludwig et al., 1997; Ruth et al., 1989)
β <sub>2</sub>	72 kDa	Herzmuskulatur (bei Maus nur Ca <sub>v</sub> β <sub>2</sub> in Herzmuskulatur!), glatte Muskulatur, Neuronen (Purkinje Zellen, pyramidale Neuronen), Photorezeptoren	(Hullin et al., 1992; Ludwig et al., 1997)
β <sub>3</sub>	60 kDa	Herzmuskulatur, Neuronen (Olfakt. Bulbus Kortex, Hippocampus) glatte Muskulatur,	(Hullin et al., 1992; Ludwig et al., 1997)
β <sub>4</sub>	58 kDa	Neuronen (Cerebellum, Haarzellen der Cochlea)	(Castellano et al., 1993; Ludwig et al., 1997)

Tabelle 1-2 Gewebeexpression der Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit

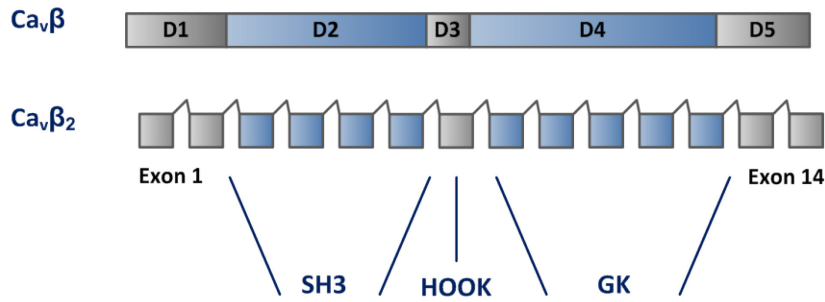


Abbildung 1-4  $Ca_v\beta$ -Struktur; Einteilung in konservierte (blau) und nicht-konservierte (grau) Domänen;  $Ca_v\beta_2$ -Struktur mit den SH3- Domäne, GK-Domäne und HOOK

Die Bindung der  $Ca_v\beta$ -Untereinheit an die  $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit ist entscheidend für das Trafficking der HVA-Calciumkanäle. Es wird diskutiert, dass die Poren-bildende  $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit im Endoplasmatischen Retikulum (ER) einen unreifen Kanal bildet, der durch die intrazelluläre  $Ca_v\beta$ -Untereinheit an die Plasmamembran transportiert wird (Brice et al., 1997). Dies hat zur Folge, dass mehr Calciumkanäle in die Plasmamembran eingebaut werden und vermehrt Calcium in die Zelle einströmen kann. Die  $Ca_v\beta$ -Untereinheit bindet mit sehr hoher Affinität ( $K_D = 6 - 20$  nM (Van Petegem et al., 2004)) an den intrazellulären Linker zwischen Domäne I und II (Linker I-II) der HVA-Calciumkanäle. Für die Bindung ist ein 18 Aminosäuren langes Motiv auf dem Linker I-II der  $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit, die *alpha interaction domain* (AID), und ein hydrophober Spalt in der  $Ca_v\beta$ -Untereinheit, die *alpha binding pocket* (ABP), verantwortlich (AID (*alpha interaction domain*)-ABP (*alpha binding pocket*)-Komplex, Abbildung 1-5). Die ABP befindet sich in der zweiten konservierten Domäne (D4), die auch als Guanylatkinase (GK)-Domäne bezeichnet wird (Pragnell et al., 1994; Van Petegem et al., 2008; Van Petegem and Minor, 2006).

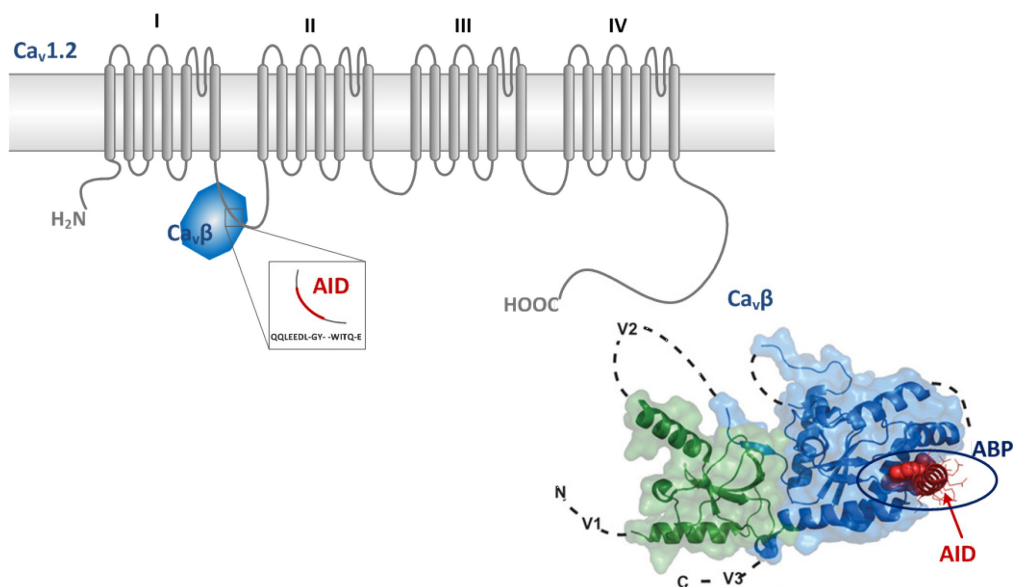


Abbildung 1-5 Interaktion von  $Ca_v1.2$  und  $Ca_v\beta$ : AID-ABP-Komplex;  $Ca_v\beta$ -Kristallstruktur aus Van Petegem and Minor, 2006

Es ist derzeit nicht geklärt, ob die Bindung von  $Ca_v\alpha_1$ - und  $Ca_v\beta$ -Untereinheit im Verhältnis 1:1 stattfindet oder ob mehrere  $Ca_v\beta$ -Untereinheiten von der  $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit gebunden werden

können (Canti et al., 2001). Außer Frage steht, wie bereits erwähnt, dass die richtige Verknüpfung von  $\text{Ca}_v\alpha_1$ - und  $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheit ein Kriterium für die korrekte Kanalreifung und Membranexpression darstellt (Bichet et al., 2000; Takahashi et al., 2005). Für den Einbau des Kanalkomplexes in die Plasmamembran ist die Coexpression der  $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheit mit der  $\text{Ca}_v\alpha_1$ -Untereinheit notwendig und ausreichend. Die  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -Untereinheit ist für das Trafficking nicht notwendig (Berrow, 1995; Brice et al., 1997; Castellano et al., 1993; Chien et al., 1995; Hullin et al., 1992).

Die  $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheit hat einen Einfluss auf die spannungsabhängige Aktivierung des Calciumkanalkomplexes: Durch die  $\text{Ca}_v\alpha_1$ - $\text{Ca}_v\beta$ -Interaktion erfolgt die Öffnung der LTCCs bei niedrigerem Zellmembranpotential, wodurch Calcium früher in die Zelle einströmen kann. Einhergehend mit diesem Effekt kann auch eine verlängerte Öffnungszeit, eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit und eine beschleunigte Kinetik des Kanals festgestellt werden, was ebenfalls zu einem erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt (Hullin et al., 2003; Perez-Reyes et al., 1992).

### 1.2.2 Die $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit

Das *CACNB2* Gen codiert die  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit, ein 72 kDa schweres Protein. Die  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit ist die alleinige (Maus) oder überwiegend (Mensch) exprimierte  $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheit in Herzmuskelzellen und steuert dort das Trafficking des Calciumkanalkomplexes. Das Gen der murinen  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit (*CACNB2*) besteht aus 14 Exonen. Der knock-out der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit in Mäusen führt zu einem letalen Phänotyp am embryonalen Tag 9,5 p.c., der durch ein mangelhaft ausgebildetes Blutgefäßsystem und einer daraus folgenden Sauerstoffunterversorgung des Embryos erklärt werden kann. Die fehlende Ausbildung der Gefäße liegt in einer starken Reduktion des LTCC-Stroms, einem verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle und daraus folgend einer fehlenden Kontraktion der Kardiomyozyten begründet. Die fehlende Kontraktion führt zu einer mangelhaften Pumpfunktion des Herzmuskels und zu reduziertem Blutaustoß in die entstehenden Blutgefäße, wodurch die Weiterbildung und das Reifen des Blutgefäßsystems behindert wird (Weissgerber et al., 2006).

Neben den bekannten Funktionen der  $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheit (Trafficking und Veränderung der Öffnungseigenschaften des Calciumkanalkomplexes), erfüllt die  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit Voraussetzungen, die sie zu einem möglichen Phosphorylierungsziel *in vivo* machen: Im letzten codierenden Abschnitt des *CACNB2* Gens, Exon 14, befinden sich Phosphorylierungsstellen für die cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A, PKA), die Proteinkinase B (Akt/PKB) und die Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) (Abbildung 1-6). Diese Phosphorylierungsstellen sind in der Literatur als Faktoren für die Regulation von spannungsabhängigen Ionenkanälen in unterschiedlichen Signalwegen bekannt (Dai et al., 2009). Im Folgenden werden die Phosphorylierungsstellen und Signalwege dargestellt und der mögliche Einfluss der  $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheit in diesen Signalwegen beschrieben.

		Exon 14		
1621	ACAGGGTTC	CAAGGTGATCAAAGCCTGATCGCTCTGCTCCCGGTCTGCTTCCCAAGC		
541	Q	G S Q G D Q R P D R S A P R S A S Q A		
1681	TGAAGAAGA	ACCTTGCCCTTGAACCCGTCAAAAAATCCCAACACCGTTC	TCCTCA	Serin479/480 PKA
561	E E E P C L E P V K K S Q H R S	S S A T		
1741	ACACCAAAAC	CCGAGCGGGACAGGTCGAGGCTCTCTAGGCAAGAC	ACGT	Threonin498 CaMKII
581	H Q N H R S G T G R G L S R Q E	T F D S		
1801	TGAAACCCA	AAGAGCCGAGACTCTGCCTACGTGGAGCCAAAGGAAGATTATTCACATGA		
601	E T Q E S R D S A Y V E P K E D Y S H E			
1861	ACATGTGG	ACCGGTATGTCCACACCGCGAGCATAACCACAGAGAGAGACCCACAGCAG		
621	H V D R Y V P H R E H N H R E E T H S S			
1921	CAATGGCC	CAGACACAGGGAGTCTCGCCACCGCTCTAGGGACATGGGTCGAGACCAGGA		
641	N G H R H R E S R H R S R D M G R D Q D			
1981	CCACAATG	AGTGCATCAAAACAAGCCGGCATAA	TCTA	Serin574 Akt/PKB
661	H N E C I K Q R S R H K	S K D R Y C D K		
2041	GGAGGGGA	AGTAATATCCAAGAGAAGGAATGAGGCTGGCGAGTGGAACAGGGATGTATA		
681	E G E V I S K R R N E A G E W N R D V Y			
2101	CATCCGCA	ATGACCGTGCCTGCCCTACCCCCAAGTCTTTGTGTATCATCCTTAAGCAA		
701	I R Q * P C V S L P P S L C V S S L S K			

Abbildung 1-6 Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Exon14: Phosphorylierungsstellen

## 1.3 Regulationsmechanismen des L-Typ Calciumkanalkomplexes

### 1.3.1 Die cAMP-abhängige Proteinkinase PKA

Während sogenannter *Fight-or-Flight*-Situationen (Kampf oder Flucht, Stressreaktion mit Anpassung der physischen und psychischen Leistung) erfolgt die Freisetzung von Adrenalin aus den Nebennieren und Noradrenalin aus den sympathischen Nervenenden. Die freigesetzten Neurotransmitter aktivieren β-adrenerge Rezeptoren (β-AR). Dadurch kommt es zu einer schnellen Zunahme des L-Typ Calciumstroms in Skelett- und Herzmuskelzellen, wodurch die Herzfrequenz, die Kontraktion (Inotropie) und Relaxation (Lusitropie) des Herzens erhöht werden. Diese schnelle Regulation des L-Typ Calciumstroms wird durch die β-adrenerg ausgelöste, Proteinkinase A (PKA)-vermittelte Phosphorylierung ermöglicht. Der genaue Mechanismus und die relevanten PKA-Phosphorylierungsstellen konnten bis dato nicht geklärt werden.

PKA liegt meist gekoppelt an *A kinase anchoring* Proteine (AKAP) in der Zellmembran vor (Übersicht in Beene and Scott, 2007). Durch β-adrenerge Stimulation werden G-Proteine (G<sub>s</sub>) rekrutiert, wodurch die Adenylatzyklase (AC) aktiviert und ATP in cAMP umgewandelt wird. cAMP bindet an die regulatorischen Untereinheiten der PKA (PKA<sub>r</sub>) und die katalytische Untereinheit (PKA<sub>c</sub>) wird freigesetzt. PKA<sub>c</sub> phosphoryliert nun die Zielproteine, z.B. den L-Typ Calciumkanalkomplex und den Ryanodinrezeptor. Zu dem lusitropen Effekt führt die PKA-Phosphorylierung von Phospholamban und damit zur Ca<sup>2+</sup>-Wiederaufnahme ins SR. Die β-adrenerge Stimulation von L-Typ Calciumkanälen ist schematisch in Abbildung 1-7 dargestellt. Pharmakologisch können die PKA-Effekte durch Gabe von Isoprenalin (β-AR-Agonist) und Forskolin (AC-Agonist) initiiert, durch Gabe von β-AR-Blockern gehemmt werden.

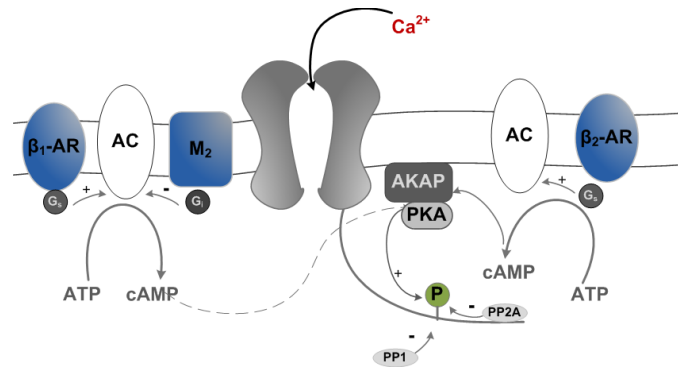


Abbildung 1-7 PKA-Phosphorylierung: Schematische Darstellung der Aktivierung des  $\beta$ -Adrenozeptors ( $\beta$ -AR) und der Phosphorylierung des LTCC-Carboxyterminus; AC (Adenylzyklase), AKAP (AKinase anchoring Protein)

Die Phosphorylierung von Ser1928 im Carboxyterminus der  $Ca_v1.2$ -Untereinheit des L-Typ Calciumkanalkomplexes wurde bis vor kurzem als Mechanismus für die Regulation des Calciumkanals durch die Proteinkinase A angesehen (Davare and Hell, 2003; De Jongh et al., 1996; Hall et al., 2006). Durch Mutation von Ser1928 zu Alanin (S1928A) in einer knock-in-Mauslinie konnte aber gezeigt werden, dass die  $\beta$ -adrenerge Stimulation des Kanalkomplexes nicht von der Mutation S1928A beeinflusst wird (Lemke et al., 2008). Als weitere mögliche PKA-Phosphorylierungsstelle wird derzeit Ser1700 auf dem proximalen Carboxy-Terminus der  $Ca_v1.2$ -Untereinheit diskutiert (Fuller et al., 2010).

Neben der  $Ca_v1.2$ -Untereinheit stellt die  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit ein weiteres Ziel der PKA im L-Typ Calciumkanalkomplex dar. Durch Phosphopeptid-Mapping und Micro-Sequenzierung der bakteriell exprimierten  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit wurden zwei starke PKA-Phosphorylierungsstellen (Thr164 und Ser591) nachgewiesen. Nach Mutation dieser Phosphorylierungsstellen in Alanine und anschließende elektrophysiologische Messung konnte der Einfluss dieser putativen PKA-Stellen widerlegt werden. Als weitere Phosphorylierungsstellen wurden im  $Ca_v\beta_2$ -Carboxy-Terminus drei Serine (460, 479 und 480) identifiziert. Mutation dieser möglichen PKA-Stellen zu Alaninen inhibiert hier die PKA-abhängige Phosphorylierung der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit (Gerhardstein et al., 1999). Dieses Ergebnis konnte mittels Elektrophysiologie bestätigt werden: Für die  $Ca_v\beta_2$ -Mutante S479/480A, coexprimiert mit  $Ca_v1.2\Delta1905$  ( $Ca_v1.2$ -Kanal, an dem C-terminal ca. 200 Aminosäuren und die Phosphorylierungsstelle Ser1928 fehlen), konnte durch Mikroinjektion von PKA kein Anstieg des LTCC-Stroms festgestellt werden. Der WT-Kontrollversuch und die Mutation S460A hingegen führen zur Erhöhung des LTCC-Stroms als Antwort auf PKA-Gabe zeigten (Bünemann et al., 1999). *In vitro* stellen Ser479 und Ser480 der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit somit potentielle Ziele für die PKA-Phosphorylierung dar, die unabhängig von Ser1928 im distalen Carboxyterminus sind. Ob diese Phosphorylierungsstellen tatsächlich eine Rolle bei der *Fight-or-Flight*-Situation *in vivo* spielen, ist bis dato noch ungeklärt. Die relevanten Phosphorylierungsstellen im LTCC-Komplex sind schematisch in Abbildung 1-8 dargestellt.

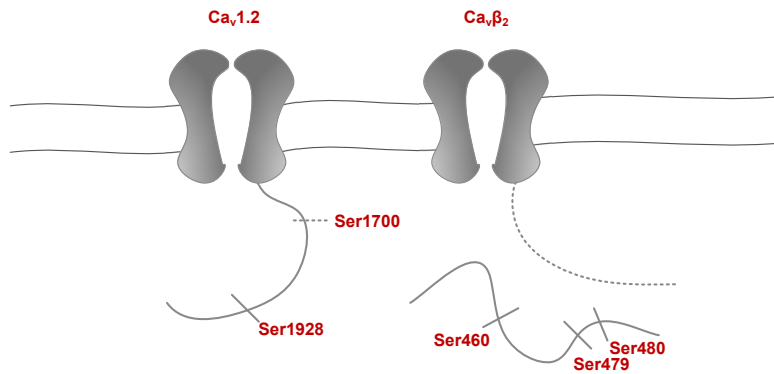


Abbildung 1-8 PKA-Phosphorylierungsstellen im LTCC-Komplex; links: Carboxyterminus der  $Ca_v1.2$ -Untereinheit mit PKA-Stellen Ser1928 und Ser1700; rechts:  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit mit Ser460 und Ser479/480

### 1.3.2 Phosphorylierung mittels Akt/PKB

Akt/PKB ist eine Serin/Threoninkinase, die in drei unterschiedlichen Isoformen (Akt-1, -2, -3) vorkommt und durch den IGF-1-PI3K-PDK-1-Signalweg aktiviert wird: Die Stimulation von Tyrosinkinaserzeptoren durch IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) führt zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), einer Lipidkinase, die die Phosphorylierung des Membranbestandteils Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) katalysiert. PIP<sub>3</sub> bindet an die Pleckstrin-Domäne von Akt/PKB, was zur Translokation von Akt/PKB an die Plasmamembran führt. Dort wird Akt/PKB durch die Phosphoinositol-abhängige Kinase 1 (PDK1) phosphoryliert und aktiviert. Die aktivierte Form der Akt/PKB kann diverse Zielproteine phosphorylieren. Der PI3K-Signalweg kann durch zwei Phosphatasen blockiert werden: die Lipidphosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10*) dephosphoryliert PIP<sub>3</sub> an der 3'Position und die Phosphatase SHIP2 (SH2-containing 5'-inositol phosphatase) an der 5'Position des Inositol-Rings. Effektoren des IGF1-PI3K-Akt/PKB-Signalwegs sind Apoptose-hemmende und Tumorwachstum-auslösende Proteine.

Es wird vermutet, dass der IGF-1-PI3K-Akt Signalweg die kardiale Inotropie erhöht und zu einer Zunahme der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration führt (Übersicht in Ceci et al., 2004; McMullen et al., 2004). Der zu Grunde liegende Mechanismus ist weitgehend unbekannt. Im Zusammenhang mit spannungsabhängigen Calciumkanälen konnte gezeigt werden, dass in Kardiomyozyten (Catalucci et al., 2009) und in Neuronen (Viard et al., 2004) die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Wegs den LTCC-Strom verstärkt; dieser Effekt wurde von Viard et al. (2004) durch die Akt/PKB-Phosphorylierung der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit begründet. Die dort beschriebene Phosphorylierungsstelle auf der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit war Ser574. Der postulierte Signalweg ist in Abbildung 1-9 dargestellt.

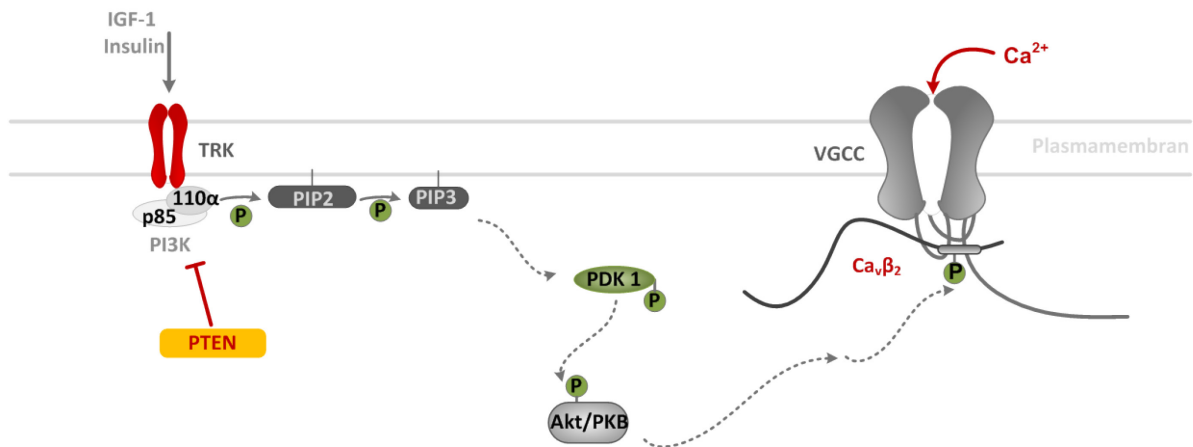


Abbildung 1-9 Akt/PKB-Signalweg und Phosphorylierung von Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>

### 1.3.3 Regulation von L-Typ Calciumkanälen durch CaMKII

Die multifunktionale Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) ist ein Schlüssel-Effektor bei der Regulation von LTCCs. Es gibt vier unterschiedliche Calmodulinkinase II-Enzyme (CamKIIα, β, γ und δ), die aus acht bis zwölf Untereinheiten zusammengesetzt sind, wobei im Herzen überwiegend die CamKIIδ exprimiert wird (Xu et al., 2010). In Muskelzellen und Neuronen wird CaMKII mit der Erregungs-Kontraktions-Kopplung und Erregungs-Transkriptions-Kopplung in Verbindung gebracht (Bers, 2008; Wheeler et al., 2008; Wu et al., 1999). Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration (im μmolaren Bereich), die durch die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus den intrazellulären Speichern des SR zustande kommt, führt zur Aktivierung der CaMKII durch Binden von Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin (Ca<sup>2+</sup>/CaM) an die Kinase und darauf folgend zur Autophosphorylierung an Thr286/7 in der regulatorischen Domäne des Enzyms. Dadurch entsteht eine Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Form der CaMKII mit erhöhter Affinität zu unterschiedlichen CaMKII-assoziierten Proteinen (Colbran, 2004; Hudmon et al., 2005).

Die CaMKII beeinflusst in Kardiomyozyten sowohl die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem SR über Ryanodinrezeptoren, als auch den Rücktransport von Ca<sup>2+</sup> ins SR durch Phosphorylierung von Phospholamban und SR Ca<sup>2+</sup> ATPasen (SERCA). Die Mechanismen dazu sind noch nicht näher geklärt (Ai et al., 2005; Ji et al., 2003; Ji et al., 2006). Desweiteren ist die CaMKII an verschiedenen Formen der LTCC Fazilitierung beteiligt. Als Fazilitierung wird der Prozess bezeichnet, durch welchen L-Typ Calciumkanäle in einen Öffnungsmodus (*Mode2*) gelangen, der durch lange Öffnungszeiten und eine hohe Öffnungswahrscheinlichkeit gekennzeichnet ist (Dzhura et al., 2000; Pietrobon and Hess, 1990; Yuan and Bers, 1994). Die erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit (P<sub>o</sub>) des Kanalkomplexes führt zu gesteigertem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und gesteigerter Calcium-abhängiger Signaltransduktion in der Zelle (Anderson et al., 1994; Lee et al., 2006; Xiao et al., 1994). Der molekulare Mechanismus für die Lokalisierung der CaMKII und der I<sub>Ca</sub>-Fazilitierung in Kardiomyozyten *in vivo* ist bisher nicht geklärt.

Untersuchungen in heterologen Expressionssystemen lassen vermuten, dass die CaMKII direkt an den Carboxy-Terminus der  $Ca_v1.2$ -Untereinheiten bindet bzw. diesen direkt phosphorylieren kann (Hudmon et al., 2005; Lee et al., 2006). Andere Untersuchungen zeigen, dass das erfolgreiche Targeting von CaMKII an den *full length*  $Ca_v1.2$ -Kanal in transfizierten HEK293-Zellen die Bindung von CaMKII an die  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit erfordert (Abiria and Colbran, 2010; Kamp et al., 2000). Als CaMKII-Phosphorylierungsstellen im L-Typ Calciumkanalkomplex wurden Ser1512 und Ser1570 auf der  $Ca_v1.2$ -Untereinheit und Thr498 auf der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit identifiziert. Die physiologische Bedeutung der CaMKII-Phosphorylierungsstellen Ser1512/1570 wurde in einem knock-in-Mausmodell untersucht, in welchem Ser1512/1570 zu Alaninen mutiert wurden (SF-Maus). Elektrophysiologische Messungen der SF-Kardiomyozyten zeigten, dass die spannungs- und frequenzabhängige Fazilitierung zwar stark reduziert war, diese Mutationen aber nicht zur vollständigen Inhibition der Fazilitierung führten (Blaich et al., 2010). Daher werden synergistische Effekte der  $Ca_v1.2$ - und der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit bei der CaMKII-abhängigen Regulation des Calciumkanals vermutet (Grueter et al., 2006; Hudmon et al., 2005; Lee et al., 2006). Die physiologische Bedeutung der CaMKII-Phosphorylierungsstelle auf der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit *in vivo* ist bis dato noch unklar. Es könnte sein, dass die CaMKII durch die  $Ca_v\beta$ -Untereinheit an ihre Bindungsstellen auf der  $Ca_v1.2$ -Untereinheit gebracht wird (Grueter et al., 2006). Eine schematische Darstellung dieser Theorie ist in Abbildung 1-10 gezeigt.

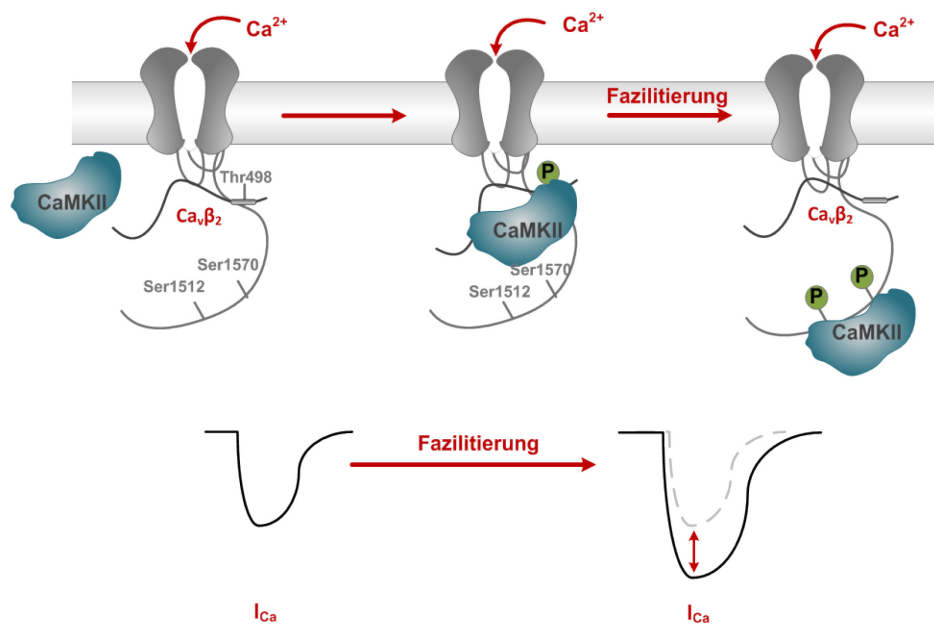


Abbildung 1-10 CaMKII-Phosphorylierung und Fazilitierung



## 1.4 Ca<sub>v</sub>β-Protein-Protein-Interaktionen

### 1.4.1 Strukturelle Eigenschaften der Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit

Die Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit wurde lange Zeit nur als integraler Bestandteil von Calciumkanalkomplexen betrachtet, der zwar wichtige Funktionen für das Kanal-Trafficking, die Membranexpression und die Beeinflussung der biophysikalischen Eigenschaften des Kanalkomplexes erfüllt, aber nicht mit anderen Proteinen interagiert. Durch molekulare Modellberechnungen (*molecular modelling*) wurde gezeigt, dass die Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit zwei konservierte Protein-Protein-Interaktionsstellen besitzt (Hanlon et al., 1999), die sich in der MAGUK-Proteinfamilie (Membrane Assoziierte GUanylat Kinase), einer Klasse von Scaffold-Proteinen, wiederfinden. MAGUK-Proteine besitzen in ihrer Kernstruktur eine PDZ- (Post-Synaptic Density protein 95 (PSD-95), Discs large protein (dlg) und Zona occludens-1 (ZO-1)), eine SH3- und eine Guanylatkinase (GK)-Domäne. Zwischen SH3- und GK-Domäne befindet sich ein flexibler Linker, der als HOOK bezeichnet wird, und für das Andocken an interagierende Proteine mitverantwortlich ist. Domäne 2 und 4 der Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit zeigen sehr große strukturelle Ähnlichkeiten mit der SH3- und der GK-Domäne. In Abbildung 1-11 sind die strukturellen Eigenschaften der Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit und der MAGUK-Proteine dargestellt. Diese Domänen können Proteininteraktionen bei verschiedenen zellulären Prozessen eingehen: Interaktionen der Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit bei Hormonsezernierung und Endozytose wurden bereits nachgewiesen (Beggren et al., 2004; Beguin et al., 2001; Hidalgo and Neely, 2007).

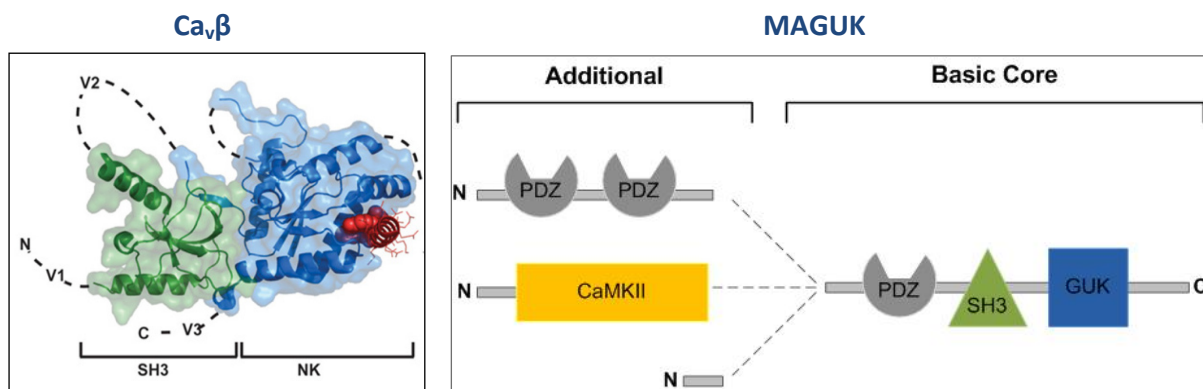


Abbildung 1-11 Ca<sub>v</sub>β-MAGUK: Vergleich der Struktur

Bisher wurde keine systematische Analyse der Interaktionspartner der Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit (Ca<sub>v</sub>β-Interaktom) durchgeführt, was durch den Mangel an geeigneten Methoden und Systemen erklärbar ist. Als integraler Bestandteil im Calciumkanalkomplex ist die Untersuchung der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit und des Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Interaktoms im intakten Ionenkanalkomplex notwendig. Für Interaktionsstudien von Ionenkanalkomplexen in nativem Gewebe muss der Ionenkanalkomplex mit dem Interaktom durch milde Detergenzien bei physiologischen Salzkonzentrationen und physiologischen pH-Werten aus der Zellmembran gelöst werden (Übersicht in Kalipatnapu and Chattopadhyay, 2005). Die milden und physiologischen Bedingungen sind notwendig, um die native Struktur und Konformation der Membranproteine und die Bindung der Interaktionspartner im Proteinkomplex zu erhalten. Mit Hilfe

von spezifischen Antikörpern wird eine Co-Immünpräzipitation (Co-IP) durchgeführt, d. h. das Zielprotein wird mit den interagierenden Proteinen durch Antikörper-Bindung aus der Membranprotein-Lösung isoliert und mit massenspektrometrischen Methoden analysiert. Diese Technik wurde in vielen Fällen (Übersicht in Vasilescu and Figeys, 2006) erfolgreich eingesetzt, wobei geeignete, sehr spezifische Antikörper die Grundvoraussetzung sind. Im Fall der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit ist kein ausreichend spezifischer Antikörper vorhanden bzw. herstellbar. Daher ist die Aufreinigung des  $Ca_v\beta_2$ -Interaktoms bisher nicht möglich.

#### 1.4.2 Tandem-Affinitätsaufreinigung: OneStrep-Tag

Das StrepTag-System ist ein Tandem-Affinitätsaufreinigungs-System, das für die Untersuchung von Protein-Interaktionen entwickelt wurde. Es beruht auf dem Prinzip der Streptavidin-Biotin-Bindung, d.h. einer sehr spezifischen Bindung von D-Biotin an das Protein Streptavidin. Diese Bindung weist eine hohe Stabilität und eine sehr hohe Spezifität auf. Für die analytische Verwendung wird D-Biotin auf ein Minimal-Sequenz von acht Aminosäuren (Thr-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys, WSHQPQFEK) modifiziert (StrepTag) und Streptavidin biochemisch verändert, so dass es nur noch in seiner Kernstruktur vorliegt (StrepTactin). Diese Veränderungen gewähren eine hochspezifische Interaktion von StrepTag mit StrepTactin bei einer geringen Größe des Tags und einer hohen Flexibilität des Tactins, das in Lösung, an Matrix fixiert oder mit Enzymen konjugiert verwendet werden kann. Als Weiterentwicklung des StrepTags besitzt der OneStrep-Tag eine höhere Affinität zu und Spezifität für StrepTactin, was auf zwei spezifische StrepTag-Sequenzen zurückzuführen ist. Die OneStrep-Tag-Sequenz beinhaltet N- bzw. C-terminal einen Linkerbereich (SA), der das Fusionieren des OneStrep-Tags an Zielproteine ermöglicht, und einen flexiblen Linker ((GGGS)<sub>3</sub>) zwischen den spezifischen StrepTag-Sequenzen (SA-WSHPQFEK-(GGGS)<sub>3</sub>-WSHPQFEK). Der OneStrep-Tag hat eine Größe von 3,3 kDa. Diese geringe Größe ist ideal für die Untersuchung von Protein-Interaktionen, da keine Störung der nativen Proteinfaltung und Konformation des getaggten Proteins, keine Behinderung der Protein-Protein-Interaktionen und keine physiologischen Auswirkungen durch den fusionierten OneStrep-Tag erwartet werden.

Für das OneStrep-Tag-System existieren geeignete, hochspezifische Antikörper und Affinitätsaufreinigungs-Methoden, die *in vitro* bereits etabliert sind und publiziert wurden (Schmidt and Skerra, 2007). Es besteht die Möglichkeit neben der Aufreinigung über die StrepTactin-Matrix, eine zweite Aufreinigung über eine Antikörpersäule durchzuführen, um eventuell falsch-positive Interaktionen von den spezifischen Interaktionen zu isolieren. Diese Möglichkeit der Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP, *tandem affinity purification*) ist ein Vorteil des OneStrep-Tag-Systems gegenüber anderen Affinitätschromatographie-Systemen, da mit einem Tag unterschiedliche Aufreinigungsschritte durchgeführt werden können. Eine weitere interessante Möglichkeit, die das OneStrep-Tag-System bietet, ist die kovalente, reversible Verknüpfung (*cross linking*) der Interaktionspartner *in vivo* durch Formaldehyd (SPINE, *Strep-Protein Interaction Experiment*, (Herzberg et al., 2007)). Dadurch können schwach gebundene Interaktionspartner, die sich durch

Protein-Solubilisierungsschritte von dem Zielprotein lösen könnten, stärker gebunden und anschließend detektiert werden. Das OneStrep-Tag-getaggte Interaktom wird über Säulenchromatographie bzw. im *Batch*-Verfahren von den unspezifischen Membranproteinen durch die StrepTag-StrepTactin-Interaktion getrennt. Anschließend wird das Interaktom von der StrepTactin-Matrix eluiert und die interagierenden Proteine über Gelchromatographie und Silberfärbung visualisiert. Es folgt die Analyse einzelner Proteinbanden über Massenspektrometrie bzw. Proteinsequenzierung. In Abbildung 1-12 ist das Vorhaben für das *in vivo* OneStrep-Tag-System und die Analyse am Beispiel des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteins dargestellt.

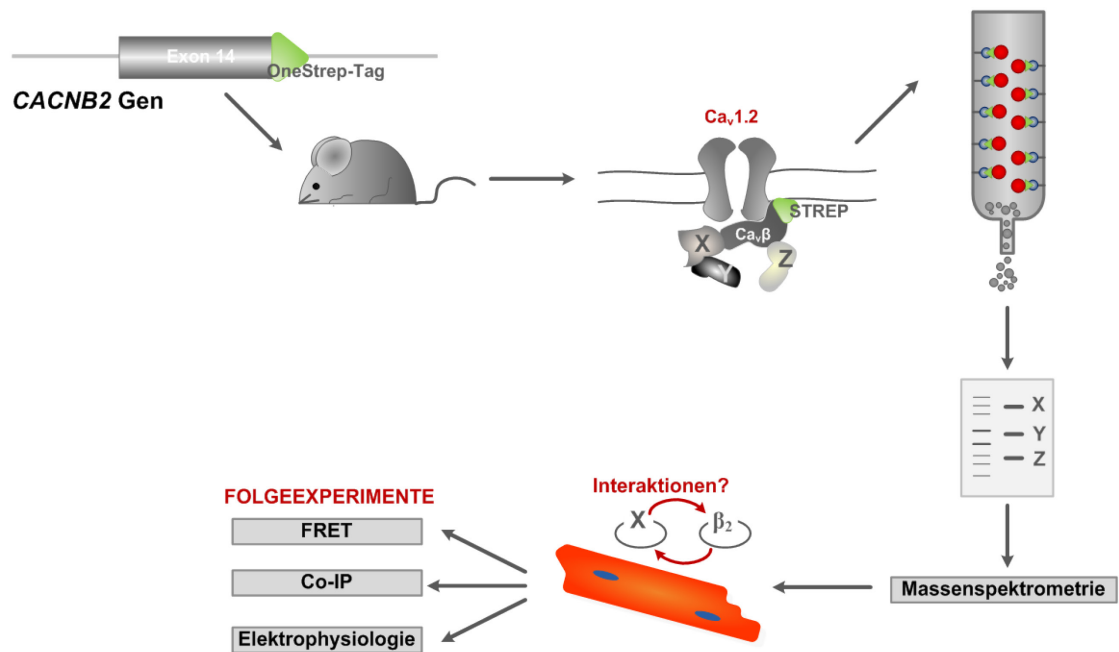


Abbildung 1-12 Untersuchung des Interaktoms mittels OneStrep-Tag-System *in vivo* am Beispiel der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit; dargestellt sind das getaggte **CACNB2** Gen zur Herstellung einer  $\text{Ca}_v\beta_2$ STREP-Mauslinie, die Aufreinigung des getaggten  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Interaktoms im intakten LTCC-Kanalkomplex über Affinitätsbindung, die Auftrennung und Darstellung der Interaktionspartner über ein SDS-Silbergel und die Analyse mittels Massenspektrometrie. Die Interaktionspartner sollen in Folgeexperimenten auf ihre physiologische Relevanz untersucht werden.

## 2 Fragestellung und Zielsetzung

Das  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Protein trägt vier putative Phosphorylierungsstellen, die in sehr kurzem Abstand auf dem Carboxy-terminalen Exon 14 des *CACNB2* Gens lokalisiert sind. Es handelt sich dabei um die PKA (Ser479/480)-, CaMKII (Thr498)- und Akt/PKB (Ser574)-Phosphorylierungsstellen. Die von unabhängigen Gruppen bisher publizierten *in vitro* Daten zeigten eine Beeinflussung der L-Typ-Calciumkanaleigenschaften durch PKA-, CaMKII- und Akt/PKB-vermittelte Phosphorylierung des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteins. Das  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Protein ist ein Bestandteil des LTCC-Komplexes ( $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit). Nach Entfernen der Phosphorylierungsstellen *in vitro* wurde eine Abnahme der LTCC-Ströme festgestellt. Da eine Dauerstimulation der PKA-, CaMKII- und Akt/PKB-Signalwegen kardiotoxische Effekte hat, etwa Herzhypertrophie auslösen kann, lassen diese Vorarbeiten einen kardioprotektiven Mechanismus nach Entfernen der genannten  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Phosphorylierungsstellen vermuten. Um diese Theorie zu prüfen, soll im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit eine knock-in-Mauslinie ( $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ ) durch homologe Rekombination generiert werden, die zur Untersuchung von Exon 14 des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteins im kardialen L-Typ Calciumkanalkomplex dient. In der  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Mauslinie soll das  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Protein Carboxy-terminal trunziert und dadurch Exon 14 und die relevanten Phosphorylierungsstellen entfernt werden. Mit dieser knock-in-Mauslinie werden kardiovaskuläre und elektrophysiologische Untersuchungen unter physiologischen sowie pathophysiologischen Bedingungen durchgeführt, um mögliche kardioprotektive Effekte durch die Trunkierung des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteins zu analysieren.

Die Rollen der Phosphorylierungsstellen des *CACNB2* Gens sind *in vivo* bis heute nicht geklärt; daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Welche Rolle spielen die PKA-Phosphorylierungsstellen Ser479 und Ser480 des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteins?

Ein Einfluss von Ser479/480 bei der  $\beta$ -AR-stimulierten, PKA-vermittelten Regulation des LTCC-Komplexes wird von verschiedenen Gruppen diskutiert und eine Erhöhung des LTCC-Stroms durch die PKA-abhängige Phosphorylierung der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit in Kardiomyozyten postuliert. Das Entfernen der PKA-Phosphorylierungsstellen Ser479/480 in der  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Maus und die anschließende Bestimmung von PKA-vermittelten Effekten, könnten dazu dienen, die Relevanz der PKA-Phosphorylierung des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteins *in vivo* zu untersuchen. Die Analyse des Fractional Shortening und die elektrophysiologische Messung der LTCC-Stöme, vor und nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation unter physiologischen sowie pathophysiologischen Konditionen sollen für die primäre Untersuchung des PKA-Signalwegs in den knock-in-Tieren herangezogen werden.

2. Welche physiologische Bedeutung hat die CaMKII-Phosphorylierungsstelle Thr498?

Durch die CaMKII-Phosphorylierung von Thr498 der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit wurde *in vitro* eine erhöhte LTCC-Fazilitierung und daraus resultierend ein erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in erregbare Zellen beobachtet. Die CaMKII wird als Mediator der pathologischen Herzhypertrophie im kardiovaskulären System angesehen. Durch Trunkierung des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Carboxyterminus in der  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Mauslinie soll

die CaMKII-Phosphorylierungsstelle Thr498 *in vivo* entfernt werden, was zur Abnahme der Fazilitierung führen sollte. Die Fazilitierung in Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STOP-Kardiomyozyten soll mit elektrophysiologischen Protokollen bestimmt werden. Ein kardioprotektiver Effekt durch das Entfernen der CaMKII-Phosphorylierungsstelle könnte durch die Abnahme des Herzgewichts und die histologische Untersuchung des ventrikulären Herzgewebes festgestellt werden.

### 3. Welche Bedeutung hat die Akt/PKB-Phosphorylierungsstelle Ser574 *in vivo*?

In erregbaren Zellen konnte durch die Akt/PKB-vermittelte Phosphorylierung von Ser574 die Erhöhung der LTCC-Stabilität und ein erhöhter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen festgestellt werden. Diese Befunde könnten bedeuten, dass die Akt/PKB-vermittelte Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms zu prohypertrophen Effekten *in vivo* führt. Der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STOP-Mauslinie fehlt Ser574, was zu einer verminderten LTCC-Dichte in der Zellmembran, zu einem verminderten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in Herzmuskelzellen und somit zu einem kardioprotektiven Effekt in den knock-in-Tieren führen sollte. Die LTCC-Dichte und der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom können in der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STOP-Mauslinie durch elektrophysiologische Messungen und durch die quantitative Bestimmung der Ca<sub>v</sub>1.2-Oberflächenexpression bestimmt werden. Die Bestimmung von Herzgewicht, Hypertrophiemarkern und hypertrophen Gewebe könnte Hinweise auf einen kardioprotektiven Effekt der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STOP-Mutation geben.

Das Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Protein ist ein mögliches Scaffold-Protein der MAGUK-Familie und es ist zu erwarten, dass das Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Protein wichtige physiologische Rollen als Teil anderer Makroproteinkomplexe wahrnimmt. Bisher war eine systematische Analyse der Interaktionspartner der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit (Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Interaktom) methodisch nicht durchführbar. Daraus ergibt sich die Fragestellung:

### 4. Wie kann das gesamte Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Interaktom systematisch analysiert werden?

Die Kombination eines neuartigen Tandemaffinitätsaufreinigungs-Systems (OneStrep-Tag-System) mit transgenen Maustechniken bietet hierfür die Möglichkeit spezifische Interaktionsstudien von Ionenkanalkomplexen und den interagierenden Proteinen durchzuführen. Dieser methodische Ansatz kann dazu dienen, das Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Interaktom – unter physiologischen sowie pathophysiologischen Konditionen - zu entschlüsseln. Dazu wird eine Mauslinie durch homologe Rekombination generiert, die den OneStrep-Tag Carboxy-terminal an das *CACNB2* Gen fusioniert enthält. Die zuvor im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Aufreinigungs- und Detektionsmethoden, sollen anschließend *in vivo* verwendet werden, um die interagierenden Proteine aufzutrennen und massenspektrometrisch zu analysieren.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Mauslinien

##### Embryonale Stammzelllinie

Für das Generieren der knock-in-Mauslinien werden murine, embryonale Stammzellen mit SV129-Hintergrund (Zelllinie R1, genetischer Hintergrund: 129X1/SvJx129S1/SV-+p+Tyr-cKit<sup>ISI-J/+</sup>, Andreas Nagy, Mount Sinai Hospital, Toronto, Kanada;) verwendet. Die Zellen werden in Passage 11 erworben.

##### Feeder-Zelllinie

Für die Präparation der Feederzellen (MEF, *mouse embryonic fibroblasts*) werden weibliche C57Bl/6N-Mäuse mit homozygoten C57Bl/6J-TgN(pGKneobpA)<sup>3Ems</sup>-Männchen (Charles River) verpaart. Diese Mauslinie besitzt ein Neomycin-Resistenzgen, wodurch Feederzellen die Selektion mit G418 während der Stammzellkultur überleben können.

##### CD1

Weibchen:

Für das Austragen von manipulierten Blastozysten werden scheinchwanger CD1-Weibchen (Mauslinie: CrI:CD1(ICR), Charles River) benötigt. Bei der CD1-Mauslinie handelt es sich um eine Inzuchtmauslinie mit weißem Fell (Albino-Mauslinie), die eine besondere Fürsorge gegenüber ihren Nachkommen zeigt.

Männchen:

CD1-Männchen (Mauslinie: HSD:ICR(CD1), Harlan) werden im Alter von 4-6 Wochen bei der Firma Harlan vasektomiert und können zwei Wochen nach dem Eingriff für das Verpaaren zur Erzeugung von scheinchwangeren CD1-Weibchen verwendet werden.

##### Bl6

Bl6-Mäuse (Mauslinie: C57Bl/6NCrI, Charles River) werden für das Gewinnen von Blastozysten und für die erste Verpaarung der knock-in-Chimäre verwendet. Bei Bl6-Mäusen handelt es sich um eine Inzuchtmauslinie, auf deren genetischen Hintergrund rückgekreuzt wird.

##### Cre-Deleter

Für das Entfernen der NeoTK-Selektionskassette *in vivo* werden heterozygote knock-in-Mäuse mit Cre-Deleter-Mäusen (genetischer Hintergrund B6.C-Tg(CMV-Cre)<sup>1Cgn/J</sup>, Charles River) verpaart. Diese Cre-Deleterlinie exprimiert das Cre-Rekombinase-Gen unter dem CMV (*Cytomegalie Virus*)-Promoter und entfernt DNA-Bereiche zwischen loxP-Erkennungssequenzen aus dem gesamten Genom.

## 3.2 Bakterienkultur

### 3.2.1 Verwendete Plasmide

Als Plasmide werden ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle bezeichnet, die in Bakterien neben dem eigentlichen Bakterienchromosom vorliegen und sich dort autonom vermehren können. Die in der Molekularbiologie verwendeten, gentechnisch veränderten Plasmide besitzen als Grundausstattung neben einer Multiple Cloning Site bestimmte Antibiotikaresistenz-Gene und einen eigenen Replikationsursprung.

#### pBluescript II KS + (Stratagene)

Das pBluescript-Plasmid wird in der Arbeit zur Herstellung von Subvektoren verwendet. Es besitzt eine Multiple Cloning Site mit einmalig vorkommenden Restriktionssequenzen und ein Resistenzgen für Ampicillin. Durch das pUC-ori Replikationsgen ist die Vermehrung in *E. coli*-Kulturen möglich. Das Plasmid hat eine Größe von 3 kb.

#### pBluescript-loxP-NeoTK-loxP (PD Dr. Sven Moosmang)

Bei diesem Plasmid handelt es sich um eine veränderte Version des pBluescript II KS +. Es enthält zusätzlich eine Selektionskassette bestehend aus dem Neomycin-Resistenzgen (Neo) und dem Thymidinkinase-Gen (TK). Der Ursprung des neo-Gens ist *E. coli*, das TK-Gen wurde aus dem *Herpes simplex Virus I* isoliert. Die Selektionskassette wird von zwei loxP-Sequenzen flankiert, die durch die Cre-Rekombinase aktiviert werden und zum Entfernen der Selektionskassette dienen. Das Plasmid hat eine Größe von 7,8 kb und ist das Rückgrat für die Gentergeting-Vektoren.

#### pGEX-6-P1 (Amersham)

Das pGEX-6-P1-Plasmid wird zur Überexpression von GST-Fusionsproteinen in BL21-Zellen verwendet. Die pGEX-Vektoren enthalten neben der Multiple Cloning Site den tac-Promoter, das *GST*-Gen und das *lacIq*-Gen. Die Expression des Fusionsproteins wird durch den tac-Promoter kontrolliert, welcher durch das *lacIq*-Genprodukt inhibiert ist. Diese Inhibition kann durch Zugabe des Laktose-Analogen Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid (IPTG) gestoppt werden. IPTG bindet an den Repressor was zur Aktivierung des tac-Promoters und zur kontrollierten Expression des GST-Fusionsproteins führt. pGEX-6-P1 hat eine Größe von 4,95 kb.

#### pcDNA3/ pcDNA3.1

Die Vektoren pcDNA3 und pcDNA3.1 werden für die Überexpression von cDNA in heterologen Expressionssystemen verwendet. Hier wird die Überexpression in HEK293T-Zellen durchgeführt. Für die Arbeit wichtige Funktionen von pcDNA3/pcDNA3.1 sind die Multiple Cloning Site, das Resistenzgene für Ampicillin, der pUC-ori-Replikationsursprung zur Vermehrung in *E. coli*-Kulturen und der SV40-Replikationsursprung für die heterologe Expression in HEK293T-Zellen. Die Plasmide

pcDNA3 und pcDNA3.1 sind jeweils 5,4 kb groß und unterscheiden sich lediglich in den Restriktionssequenzen der Multiple Cloning Site.

### 3.2.2 Verwendete Bakterienstämme

Im Rahmen der Arbeit wurden XL-1 Blue- (Stratagene), XL-10 Gold- (Stratagene) und BL21- (Merck, Novagen) Zellen für die Vervielfältigung der hergestellten Plasmide verwendet. Hierbei handelt es sich um *E. coli*-Stämme, die die Kompetenz besitzen Plasmide aufzunehmen und diese in ihrer Wachstumsphase zu vermehren. Die Bakterienstämme besitzen keine Pathogenitätsfaktoren. Um über die kompetenten Zellen in großen Mengen günstig verfügen zu können, werden sie vermehrt und gemäß Protokoll mit Elektrokompentenz oder chemischer Kompetenz versehen.

#### Herstellung elektrokompentener Zellen

Für die Herstellung elektrokompentener Zellen wird ein Verdünnungsausstrich von XL-1 Blue-Zellen (Stratagene) auf Tetrazyklin-LB-Platten gemacht und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. Am Folgetag wird ein Klon gepickt, in einer 7 ml Ampicillin-LB-Kultur für 12 h bei 37 °C inkubiert und zum Beimpfen einer 500 ml Ampicillin-LB-Kultur verwendet. Die Kultur wird bis zur OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7 bei 37 °C und 225 rpm inkubiert, pelletiert (4000xg, 10 min, 4 °C) und mit sterilem Wasser und Glycerin-Lösung gewaschen. Abschließend wird das gereinigte Zellpellet in 10 % Glycerinlösung gelöst und in 50 µl-Aliquots bei -80 °C gelagert.

#### Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Chemisch-kompetente Zellen (XL-10 Gold, Stratagene) werden ebenfalls auf Tetrazyklin-LB-Platten vereinzelt und bis zur OD<sub>600</sub> von 0,3 bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 3000xg (10 min, 4 °C) wird das Pellet in 15 ml Transformation-Storage-Solution (TSS) resuspendiert und in 400 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

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

### 3.2.3 Kultivierung der Bakterienstämme

*E. coli* werden in dem Vollmedium Luria-Bertani (LB) kultiviert. Abhängig von der Antibiotikaresistenz des eingebrachten Plasmids wird dem LB-Medium vor Gebrauch Antibiotikum (0,5 µg/ml) zugesetzt. Für Festmedien wird LB-Medium mit Agar autoklaviert, das geeignete Antibiotikum nach Abkühlen



auf 50°C zugegeben und in Petrischalen gegossen. Nach Transformationen werden die Zellen mit SOC(+)-Medium versetzt. Dieses wird frisch aus SOC(-)- Medium hergestellt. LB-Medium, LB-Agar und SOC(-)-Medium werden direkt nach der Herstellung autoklaviert.

Luria-Bertani (LB)		SOC(-)		SOC(+)	
Trypton	Trypton	Trypton	2 g	SOC(-)	4,8 ml
Hefeextrakt	Hefeextrakt	Hefeextrakt	0,5g	1 M MgCl <sub>2</sub> *	0,05 ml
NaCl	5 M NaCl	5 M NaCl	0,2 ml	1 M MgSO <sub>4</sub> *	0,05 ml
Glucose	1 M KCl	1 M KCl	0,25 ml	20 % Glucose*	0,1 ml
H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml		
Autoklavieren, Lagerung bei RT		Autoklavieren, Lagerung als 4,8 ml Aliquots bei -20 °C		Lösungen sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C	

Festmedium (LB-Agar)	
Agar	13,5 g
LB-Medium	ad 1000 ml
Lagerung in Petrischalen bei 4 °C	

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgt unter aeroben Bedingungen. LB-Flüssigkulturen (7 ml bzw. 100 ml) werden bei 37 °C und 225 rpm für 8 – 12 h inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt ist die logarithmische Wachstumsphase erreicht. Bakterienausstriche auf Agar-Platten werden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

LB-Flüssigkulturen sind für die Lagerung ungeeignet. Für die Kurzzeitlagerung wird aus der Flüssigkultur ein Verdünnungsausstrich auf einer Agarplatte gemacht, über Nacht bei 37 °C inkubiert und bei 4 °C gelagert. Für die Langzeitlagerung empfiehlt sich das Anfertigen eines Glycerol-Stocks. Dazu wird die LB-Flüssigkultur mit sterilem Glycerol 1:1 gemischt und kann bei -80 °C gelagert werden.

### 3.2.4 Transformation von Bakterien

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in einen Wirt. Bei dem Wirt handelt es sich in der Regel um einen *E.Coli*-Stamm, der durch eine geeignete Behandlung mit DMSO die Eigenschaft (Kompetenz) hat, Fremd-DNA (zirkuläre Plasmide) aufzunehmen. Man unterscheidet zwischen chemischer Transformation und Transformation durch einen elektrischen Puls. Nach der Transformation werden die Zellen mit der eingebrachten DNA in SOC(+)-Medium vermehrt und über Nacht auf Antibiotika-haltigen LB-Platten bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag können Einzelklone von der Platte in LB-Flüssigkulturen überführt werden und nach 6 – 8-stündigem Wachstum mittels alkalischer Lyse (3.3.1.1) und Restriktionsverdau (3.3.2) untersucht werden. Die Effizienz der Transformation ist von der Größe des Plasmids und der Art der Transformation abhängig.

### Chemische Transformation

Für die Transformation der Plasmid-DNA in chemisch-kompetente Zellen (XL-10 Gold, Stratagene) wird ein 50 µl Aliquot chemisch kompetenter Zellen mit 2 µl DMSO 10 min auf Eis inkubiert. Es werden 2 µl Ligationsansatz bzw. 10 – 50 ng Plasmid-DNA zu diesem Ansatz gegeben und weitere 30 min auf Eis gekühlt. Durch einen Hitzeschock für 30 sek in einem 42 °C warmen Wasserbad wird das Plasmid in die Zellen geschleust, anschließend mit warmen SOC+-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Anschließend werden 100 µl des Transformationsansatzes auf einer Antibiotikum-Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### Elektroporation

Bei der elektrischen Transformation wird mit einem Hochspannungspuls die Zellmembran der elektrokompenten Zellen (XL-1 Blue, Stratagene) perforiert und so die Aufnahme der Fremd-DNA ermöglicht. Die Fremd-DNA muss dafür vorher durch Fällung und Zentrifugation (3.3.5) entsalzt werden. Ein 50 µl-Zellaliquot elektrokompenter Zellen wird mit der vorbereiteten DNA gemischt, für 1 min auf Eis inkubiert und in einen Elektroporationsküvette (Pqqlab) überführt. Mit den Einstellungen 25 kV, 25 µF und 200 mV wird ein Hochspannungspuls mit dem Elektroporator (GenePulser™, Biorad) gesetzt und nach erfolgreicher Elektroporation die Zellen mit 1 ml SOC(+)-Medium versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 225 rpm und 37 °C wird der Transformationsansatz auf Antibiotikum-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## **3.3 Molekularbiologische Methoden**

### **3.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **3.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen**

Plasmid-DNA wird in Bakterien (*E.Coli*) vermehrt und anschließend mittels alkalischer Lyse freigesetzt. Die alkalische Lyse von Bakterienkulturen wird im Rahmen der Arbeit im Mini- und im Maxi-Maßstab verwendet. Die Isolierung der DNA erfolgt nach folgendem Prinzip: Das Bakterienpellet einer Flüssigkultur (3.2.3) wird in alkalischem NaOH/SDS-Puffer gelöst. Dabei wird die bakterielle Zellwand zerstört und kann durch Zentrifugation abgetrennt werden. Durch die Zentrifugation wird auch der Großteil der chromosomalen Bakterien-DNA aufgrund ihrer Größe und Struktur abgetrennt. Im Überstand befinden sich die denaturierte (Plasmid-)DNA, RNA und Proteine. Durch Zugabe von RNaseA-Puffer wird die RNA zerstört, in Kaliumacetat-haltigem Puffer erfolgt die Neutralisation. Die DNA wird anschließend mit Isopropanol präzipitiert, mit Ethanol gewaschen und in Wasser gelöst.

### Minipräparation

Für die schnelle Analyse von mehreren Bakterienklonen wird die Minipräparation durchgeführt. Dazu werden 7 ml LB-Medien mit 14 µl Ampicillin (50 mg/ml) versetzt und pro Medium ein Zellklon

angeimpft. Nach 8 - 16 h bei 37 °C und 225 rpm können 1,5 ml Bakteriensuspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Bakterienpellets bei niedriger Umdrehung für 5 min abzentrifugiert werden. Es wird die alkalische Lyse durchgeführt. Dazu resuspendiert man jedes Bakterienpellet mit 250 µl RNase-Puffer (MP1) und 250 µl NaOH/SDS-Puffer (MP2) und inkubiert für 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend setzt man 250 µl Neutralisations-Puffer (MP3) zu, inkubiert 15 min bei 4 °C und zentrifugiert mit 20000xg 5 min bei 4 °C ab. Durch Zugabe von Isopropanol wird die DNA gefällt, mit Ethanol (70 %) gewaschen, das Pellet vakuumgetrocknet und in Wasser (ca. 20 µl) gelöst.

RNase-Puffer (MP1)		NaOH/SDS-Puffer (MP2)		Neutralisations-Puffer (MP3)	
Tris	6,06 g	NaOH	8 g	Kaliumacetat	294,5 g
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	3,72 g	10 % SDS	100 ml	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
RNase A	0,1 g	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	mit Eisessig pH 5,5	
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml				

### Maxipräparation

Im präparativen Maßstab wird eine Maxipräparation gemacht; hierfür wird das QUIAGEN Plasmid Maxi Kit verwendet. Eine 100 ml LB-Kultur wird mit 200 µl Ampicillin (50 mg/ml) mit einer 2 ml Bakterienkultur einer Minipräparation für 8 – 12 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Das Bakterienpellet wird abzentrifugiert und die alkalische Lyse durchgeführt. Bei der Maxipräparation schließt sich an die alkalische Lyse die Reinigung an Anionentauscher-Säulen unter Niedrigsalzbedingung und im definierten pH-Bereich an. So können Proteine, RNA und Moleküle mit geringem Molekulargewicht entfernt werden. Unter Hochsalz-Bedingungen wird anschließend die DNA eluiert und in Isopropanol präzipitiert (3.3.5).

#### **3.3.1.2 Isolierung von genomischer DNA**

Genomische DNA wird im Rahmen der Arbeit aus Stammzellen und aus Mausgewebe isoliert. Aufgrund der extremen Länge der genomischen DNA besteht die Gefahr des Zerbrechens der DNA-Stränge. Daher wird auf Scherkräfte durch Pipettieren und Zentrifugieren verzichtet. Stattdessen wird ein Proteinase K-haltiger Puffer verwendet, in dem Zellen bzw. Gewebe über Nacht bei 55 - 60°C inkubiert werden. Am nächsten Tag erfolgt die Fällung der DNA mit Ethanol.

Lysepuffer	
NaCl	0,3 g
0,5 M TrisHCl pH 7,5	10 ml
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	1,86 g
N-Laurylsarcosin	2,5 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml
autoklavieren	
Proteinase K (20 mg/ml) vor Gebrauch zusetzen, Endkonzentration 0,25 mg/ml	

### Isolierung von genomischer DNA aus Stammzellklonen

Stammzellklone werden in 96-Well-Platten für das Screening zur Konfluenz herangezogen (3.5.3.2). Das Kulturmedium wird entfernt und die Zellen werden mit 1xPBS gewaschen. Pro Well werden 50 µl Lysepuffer mit Proteinase K zugegeben, die Platte mit Parafilm verschlossen und bei 55 °C über Nacht inkubiert. Die Fällung erfolgt durch Zugabe von 150 µl Ethanol-NaOAc-Lösung für 1 – 3 h bei Raumtemperatur. Nach Waschen mit 70 % Ethanol und Trocknung wird die genomische DNA in 30 µl Wasser gelöst.

### Isolierung von genomischer DNA aus Mausgewebe

Für die Analyse der knock-in-Mäuse mittels Southern-Blot werden 0,5 cm-Schwanzspitzen von Mäusen mit 500 µl Lysepuffer und Proteinase K über Nacht bei 55 °C verdaut. Nach Fällung mit Isopropanol, Zentrifugation (10 min, 14000xg) und Vakuumtrocknung wird das Pellet in 400 µl Wasser gelöst. Anschließend erfolgt eine Phenol-Chloroform-Extraktion (3.3.1.2) und die Fällung der DNA mit Ethanol. Das getrocknete DNA-Pellet wird in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst und für die Southern-Blot-Analyse (3.3.8) verwendet.

Für die Genotypisierung der Mäuse zur Zucht der knock-in-Linie wird DNA aus einer Gewebsbiopsie (Schwanzspitze) isoliert. Dazu wird das Gewebe über Nacht in einer Mischung aus Wasser, 10x Taq-Puffer und Proteinase K (89 µl + 10 µl + 1 µl) bei 55 °C verdaut. 1 µl des Verdaus wird für die Genotypisierungs-PCR (3.3.3.1) verwendet.

### **3.3.1.3 Isolierung von RNA aus Gewebe**

Im Rahmen der Arbeit wird RNA aus Mausgewebe isoliert, um die funktionale Transkription der genomischen DNA in RNA zu untersuchen. Dazu wird RNA isoliert und zum Zweck der Sequenzanalyse in cDNA transkribiert (3.3.3.3). Für das Gewinnen der RNA werden Herzen und Gehirne verwendet, die nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert werden. Schwierigkeit der RNA-Isolierung ist die geringe Stabilität der RNA aufgrund der ubiquitär vorkommenden RNasen. Bei der Arbeit mit RNA werden daher RNase-freien Arbeitsmaterialien verwendet, Wasser wird mit Hilfe von Diethylpyrocarbonat (DEPC, Roth) behandelt, wodurch die Aktivität der RNasen zerstört wird. Bei der Extraktion der Gesamt-RNA setzt man im ersten Schritt das chaotrope Salz Guanidinisothiocyanat ein, das stark denaturierend auf Proteine und auch auf RNasen wirkt. Anschließend wird die RNA durch phenolische Extraktion von DNA und Proteinen abgetrennt, in Isopropanol präzipitiert, gewaschen und gelöst. Zu 100 mg gemörsertem Gewebe werden 750 µl TRIzol (chaotrope Salz, Invitrogen) zugesetzt und auf Eis mit einem Potter homogenisiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur werden 200 µl Phenol-Chloroform-Lösung (Roth) zugegeben, kurz bei Raumtemperatur inkubiert und abzentrifugiert (10 min, 14000xg, 4 °C). Die oberste Phase wird abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß die darin befindliche RNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 14000xg, 4

°C) erhält man ein RNA-Pellet das zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen wird. Anschließend wird das Pellet bei 37 °C getrocknet und in 20 µl RNase-freiem DEPC-Wasser (1%) gelöst. Die RNA kann nun zur cDNA-Synthese eingesetzt werden.

### 3.3.2 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

#### Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau hat das Ziel, genomische DNA oder Plasmid-DNA an definierten Stellen zu schneiden, um Restriktionssequenzen und Fragmentgrößen zu überprüfen oder DNA für weitere Schritte wie die Ligation vorzubereiten. In der Molekularbiologie werden hierfür Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) meist bakteriellen Ursprungs verwendet, die definierte palindromische DNA-Sequenzen (Restriktionsstellen) erkennen und innerhalb bzw. unmittelbar in der Nähe der DNA-Sequenz spalten (Restriktionsenzyme Typ II). Fast alle Enzyme generieren Fragmente mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-OH-Überhang, wobei die Enden glatt (*blunt ends*) oder überstehend (*sticky ends*) sein können. Die Aktivität der Enzyme wird in Units (U) angegeben. 1 U entspricht der Menge Enzym, die nötig ist um 1 µg DNA in einer Stunde unter optimalen Bedingungen zu verdauen. Die Reaktion muss in dem für das Enzym optimierten Puffer durchgeführt werden, um den nötigen pH-Wert und den entsprechenden Salzgehalt für die Reaktion herzustellen. Die Kombination von zwei Enzymen im gleichen Puffer ist möglich und üblich. Im Rahmen der Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB) verwendet.

Ansatz für Standardverdau	
DNA-Lösung	x µl
10xBSA	5 µl
10xNEB-Puffer	5 µl
Enzym	2-5 U
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Für analytische Zwecke wurde DNA für 1 h, für präparative Zwecke 3 – 5 h bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionsverdau von genomischer DNA wurde über Nacht durchgeführt.

#### Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung ist ein notwendiger Schritt, um Vektor-DNA nach einem Restriktionsverdau für Ligationen vorzubereiten und somit die Effizienz der Ligation zu erhöhen. Beim Dephosphorylieren werden die 5'-Phosphat-Gruppen des verdauten Plasmids (Vektor) abgespalten und die Re-Ligation des Plasmids in eine zirkuläre Struktur verhindert. Die für die Ligation notwendigen 5'-Phosphat-Gruppen werden von dem zu klonierenden Fragment (Insert) geliefert. Hier wird die Vektor-DNA mit Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP, Firma NEB) für 1 h bei 37 °C

behandelt. Anschließend wird der Restriktionsansatz über Gelelektrophorese gereinigt, die Vektor-DNA isoliert und für die Ligation eingesetzt.

Ansatz zur Dephosphorylierung	
Restriktionsverdau	50 µl
CIP ( U/µl)	1 µl

### Ligation

Während der Ligation erfolgt das Verknüpfen des 5'-Phosphats und der 3'-OH-Gruppen der doppelsträngigen DNA zu Phosphodiesterbindungen. Als gängige Ligase wird die T4 DNA-Ligase (Firma NEB) verwendet, bei der es sich um eine ATP-abhängige Ligase handelt. Neben der Ligase und dem ATP-haltigen Reaktionspuffer werden die linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA und die zu ligierende Insert-DNA eingesetzt. Vektor- und Insert-DNA wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, durch Gelextraktion und Elektroelution (3.3.4) gereinigt und gefällt (3.3.5).

Die Reaktion erfolgt bei 16 °C über Nacht. Vektor und Insert-DNA werden in dem molaren Verhältnis 1:3 verwendet. Die einzusetzenden DNA-Mengen berechnen sich gemäß folgender Regel:

$$\text{Menge Insert-DNA [ng]} = 3 * \text{Menge Vektor-DNA [ng]} * \frac{\text{Länge Insert-DNA [bp]}}{\text{Länge Vektor-DNA [bp]}}$$

Ligationsansatz	
Insert-DNA	x µl
Vektor-DNA	x µl
10x T4-Puffer	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

### 3.3.3 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Ziel der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist das Vervielfältigen und Verändern von DNA-Fragmenten. Ausgangsmaterialien für eine PCR sind genomische DNA, zirkuläre Plasmid-DNA und cDNA. Die PCR ist in die drei Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation gegliedert. Bei 95 °C wird die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen (Denaturierung). An die entstandenen Einzelstränge lagern sich während dem Annealing Oligonukleotidprimer an, die, mit Hilfe von zugesetzten Desoxynucleosidtriphosphaten und einem thermostabilen Enzym (Polymerase), die Synthese neuer DNA-Stränge in 5' – 3'-Richtung während der Elongationsphase ermöglichen. Die Temperatur für den Annealing-Schritt hängt von der Zusammensetzung der Primer ab. Die Elongationstemperatur liegt in der Regel bei 72 °C.

Im Rahmen der Arbeit wird diese Methoden für die Einführung von Mutationen, für die Konstruktion von Plasmiden und für die Genotypisierung von Stammzellklonen und Mäusen verwendet. Abhängig vom Ziel der PCR werden unterschiedliche Polymerasen und Reaktionskits verwendet. Für das

Genotypisieren der Mäuse reicht eine einfache Polymerase mit hoher Effizienz (Taq-Polymerase, GenScript), wohingegen das Amplifizieren von DNA-Bereichen für Klonierungs- und Sequenzierungsreaktionen Polymerasen mit einer 3' – 5'-Exonukleaseaktivität (Korrekturfunktion) erfordert. Als Sonderform der Polymerase-Ketten-Reaktion ist die Reverse-Transkriptions-PCR zum Umschreiben von RNA in cDNA verwendet worden.

### 3.3.3.1 Verwendete DNA-Polymerasen

#### Taq-Polymerase (GenScript)

Die Taq-Polymerase wird für die Genotypisierung der Mäuse verwendet. Die DNA-Syntheserate liegt bei ca. 2800 Nukleotiden pro Minute. Diese hohe Effizienz hat durch Fehlen der 3' - 5'-Korrekturfunktion ein hohe Fehlerrate zum Nachteil.

Reaktionsansatz Taq-Polymerase		PCR-Protokoll Taq-Polymerase	
dNTPs (1,25 mM)	4 µl	95 °C	1 min
10xTaq-Puffer	2,5 µl	95 °C	30 sec
Primer 1(10 µM)	1,25 µl	56 °C	30 sec
Primer 2 (10 µM)	1,25 µl	72 °C	1 min
Taq-Polymerase (2 U/µl)	0,25 µl		
DNA	1 µl		
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl	72 °C	10 min

#### GoTaqDNA-Polymerase (Promega)

Für die Genotypisierung der Stammzellklone wurde die GoTaq-Polymerase verwendet. Im GoTaq-Puffer befindet sich bereits der Gelladepuffer mit zwei Lauffrontfarbstoffen. Auch bei dieser Polymerase fehlt eine Korrekturfunktion. Es werden ca. 500 ng genomische DNA pro Reaktionsansatz eingesetzt

Reaktionsansatz GoTaq-Polymerase		PCR-Protokoll GoTaq-Polymerase	
dNTPs (1,25 mM)	8 µl	95 °C	1 min
5xGoTaq-Puffer	10 µl	95 °C	30 sec
Primer 1(10 µM)	2 µl	58 °C	30 sec
Primer 2 (10 µM)	2 µl	72 °C	2 min
GoTaq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl		
DNA	x µl		
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	72 °C	5 min

### Phusion™ High-Fidelity Polymerase (Finnzymes)

Die Phusion™ High-Fidelity Polymerase ist eine Mischung aus einer thermostabilen Polymerase und einem Enzym, das eine 3' – 5'-Exonukleaseaktivität (Korrekturfunktion) besitzt. Aufgrund dieser Korrekturfunktion wird sie für das Herstellen von Produkten mit möglichst geringer Fehlerrate verwendet (PCR-Produkten für das Klonieren oder Sequenzieren). Es werden 50 -100 ng DNA pro Reaktionsansatz eingesetzt. Um eine hohe Bindung der Primer an die DNA zu ermöglichen, wird ein sogenanntes „Touch down“-Protokoll mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen für zehn Zyklendurchgeführt. Anschließend werden 25 Zyklen mit der errechneten Optimal-Temperatur gefahren.

Reaktionsansatz Phusion™HF-Polymerase	
dNTPs (1,25 mM)	8 µl
5xPhusion HF-Puffer	10 µl
Primer 1(10 µM)	2,5 µl
Primer 2 (10 µM)	2,5 µl
Phusion HF-Polymerase (2U/µl)	0,25 µl
DNA	x µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

PCR-Protokoll Phusion™HF-Polymerase		
98 °C	30 sec	
98 °C	10 sec	
65 °C	30 sec	dT -1 °C } 10 x
72 °C	30 sec/kb	
98 °C	10 sec	
65 °C	30 sec	} 25 x
72 °C	30 sec/kb	
72 °C	5 min	

### Expand High-Fidelity<sup>PLUS</sup> Polymerase (Roche)

Die Expand High-Fidelity<sup>PLUS</sup> Polymerase ist wie die Phusion™HF-Polymerase ein Enzymgemisch mit Amplifikations- und Korrekturfunktion und wird für die gleichen Zwecke eingesetzt. Auch hier wird ein „Touch down“-Protokoll durchgeführt.

Reaktionsansatz HighFidelity <sup>PLUS</sup> Polymerase	
dNTPs (1,25 mM)	8 µl
5x HighFidelity <sup>PLUS</sup> -Puffer	10 µl
Primer 1(10 µM)	2 µl
Primer 2 (10 µM)	2 µl
HighFidelity <sup>PLUS</sup> -Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
DNA	x µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

PCR-Protokoll HighFidelity <sup>PLUS</sup> Polymerase		
94 °C	2 min	
94 °C	30 sec	
65 °C	30 sec	dT -1 °C } 10 x
72 °C	30 sec/kb	
98 °C	10 sec	
65 °C	30 sec	} 25 x
72 °C	30 sec/kb	
72 °C	5 min	

#### 3.3.3.2 QuikChange II Site-Directed Mutagenese

Die QuikChange II Site-Directed Mutagenese (Stratagene) wird zum Einführen von Punktmutationen in genomische DNA verwendet. Grundlage des Kits ist die PfuUltra HF DNA Polymerase, die eine 3' – 5'-Exonukleaseaktivität besitzt. PfuUltra HF ist eine Polymerase mit sehr geringer Effizienz aber auch sehr geringen Fehlerraten. Das QuikChange II Site-Directed Mutagenese Kit wird in drei Schritten



durchgeführt: Im ersten Schritt werden die Ausgangs-DNA (50 – 100 ng) und die Oligonukleotid-Primer für die PCR-Reaktion eingesetzt. Wichtig hierbei ist, dass beide Oligonukleotid-Primer exakt komplementär zueinander sind und in ihrer Sequenz die Mutation enthalten ist. Die PfuUltra HF DNA Polymerase verlängert ausgehend von den Primern das komplette Ausgangsplasmid und fügt die gewünschte Mutation ein. Nach Beendigung der PCR-Reaktion liegen neu synthetisierte und Ausgangs-Plasmide nebeneinander vor. Im zweiten Schritt wird der komplette Reaktionsansatz für 1h bei 37 °C mit 1 µl DpnI (10 U/µl) verdaut. Die methylierte Template-DNA wird durch Zugabe des Restriktionsenzym DpnI zerschnitten, während die neu synthetisierte DNA im Reaktionsansatz intakt bleibt. Durch Transformation (3.Schritt) in chemisch-kompetente Zellen (3.2.4) kann das neu synthetisierte Plasmid mit der Veränderung vermehrt werden. Nach dem Ausplattieren auf Antibiotikum-Agarplatten und Inkubation bei 37 °C über Nacht können am Folgetag die gewachsenen Zellkolonien vereinzelt, in LB-Medium vermehrt, die DNA aufgereinigt und über Sequenzanalyse auf Richtigkeit der Mutation überprüft werden.

Reaktionsansatz QuikChange II		PCR-Protokoll QuikChange II	
dNTP-Mix	1 µl	95 °C	1 min
10x Reaction-Buffer	5 µl	95 °C	30 sec
Primer 1(125 ng/µl)	1 µl	55 °C	1 min
Primer 2(125 ng/µl)	1 µl	68°C	1min/kb
PfuUltra DNA Polymerase (2,5U/µl)	1 µl	68 °C	2 min
DNA	x µl		
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl		

### 3.3.3.3 Reverse-Transkription Polymerasekettenreaktion

Bei der Reverse-Transkription Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wird mit Hilfe des viralen Enzyms Reverse Transkriptase RNA in cDNA umgeschrieben. Die so hergestellte cDNA wird als *first strand* bezeichnet und in einem zweiten Schritt als Template für eine PCR-Reaktion zur Vervielfältigung verwendet. In dieser Arbeit wird das SuperScript II Reverse Transcriptase-PCR-Systems (Invitrogen) verwendet. Zunächst wird die aus Gewebe isolierte RNA (3.3.1.3) mit Oligo-dT-Primern (2,5 mM) bei 70 °C für 10 min inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen. Anschließend wird der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur gehalten. In dieser Zeit können die Oligo-dT-Primer an den Poly-A+-Schwanz der RNA binden. Durch Mischen mit 5x First Strand Buffer, Dithiothreitol (10 mM), dNTPs (10 mM) und Zugabe von SuperScript II wird bei 42 °C cDNA aus RNA synthetisiert (60 min Inkubation). Bei 95 °C wird das Enzym inhibiert und die entstandenen DNA-RNA-Hybride geschmolzen. Abschließend wird die RNA durch Zugabe von RNaseH (10 mg/ml) und Inkubation für 30 min bei 37 °C abgebaut. Die cDNA dient nun als Template für PCR-Reaktionen und Sequenzanalyse.

### 3.3.4 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten wird die Gelelektrophorese in Agarose- oder Polyacrylamid-Gelen angewandt. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen, die gemeinsam

mit den Desoxyribosen das Rückgrat der DNA bilden, hat DNA eine negative Nettoladung. Durch Anlegen von Spannung (10 V/cm Elektrodenabstand) wird DNA in Elektrophorespuffer von der Anode zur Kathode transportiert. Dabei ist die Geschwindigkeit abhängig von der Porengröße des Gels und der Größe der DNA-Fragmente. Als Gelmatrix dient Agarose oder Polyacrylamid, abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente. Zur Kontrolle des Elektrophoreseverlaufs wird die DNA mit einem Auftragspuffer versetzt. Dieser enthält die Farbstoffe Bromophenolblau und Xylencyanol. Bromophenolblau wandert mit DNA-Fragmenten der Größe 100 bp, Xylencyanol mit Fragmenten der Größe 10 kb. Zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht wird dem Gel der Fluoreszenzfarbstoff Ethidumbromid (0,1 – 0,8 µg/ml) beigelegt bzw. das Gel nachträglich mit Ethidumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) behandelt. Ethidumbromid interkaliert in die Doppelhelix der DNA, welche somit unter UV-Licht (254 nm) sichtbar wird. Als Elektrophoresepuffer wird 1x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer eingesetzt, der auch für die Herstellung der Gele verwendet wird. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wird ein Größenmarker (DNA Molecular Weight Marker X, Roche) verwendet.

Polyacrylamid-Gel, 5 %		6 x Auftragspuffer	
Rotiphorese®Gel 29:1	3,8 ml	Ficoll Typ 400	18 g
1x TBE		0,5 M EDTA pH 8,0	1 ml
TEMED		10x TBE	60 ml
APS	80 µl	Bromophenolblau (50 mg/ml)	3 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	Xylencyanol FF (50 mg/ml)	3 ml
		H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
10 x TBE			
Tris-HCl	540 g		
Borsäure	275 g		
0,5 M EDTA, pH 8,0	200 ml		
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml		

### Agarosegel

Mit Agarosegelen können Fragmente zwischen 0,5 und 15 kb aufgetrennt werden. Die Agarosegelelektrophorese verläuft horizontal. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente werden Gele mit unterschiedlicher Agarosekonzentration (0,5 - 2 %) verwendet. 0,5 – 2 g/v Agarose (Biozym) werden in der Mikrowelle mit 1x TBE-Puffer bei 1000 Watt aufgekocht, unter Wasser auf 50 °C abgekühlt und der klaren, flüssigen Agaroselösung Ethidumbromid (Sigma) zur Endkonzentration 0,8 µg/ml zugesetzt. Abschließend wird die Lösung in geeignete Gelschlitzen gegossen. Durch Einsetzen von Kämmen entstehen nach dem Aushärten des Gels Probenauftragstaschen. Zum Auftrennen der Proben wird das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 1x TBE gesetzt, Proben und Größenstandard aufgetragen und eine Spannung von 10 V/ cm Elektrodenabstand angelegt. Nach ausreichender Auftrennung wird das Gel am GelBiodoc2000 (Biorad) analysiert und für die Dokumentation fotografiert.

### Polyacrylamidgel

5%ige Polyacrylamidgele (PA-Gele, PAGE) dienen zur Auftrennung von Fragmenten zwischen 75 und 1000 bp. Die PAGE-Elektrophorese erfolgt vertikal. Dazu wird das Gel zwischen zwei Glasplatten gegossen und Taschen mit einem entsprechenden Kamm eingefügt. Es wird eine Einlaufspannung

von 110 V für 15 min und anschließend eine Spannung von 250 V für 30 min angelegt. Anschließend wird das Gel in Ethidiumbromid-Lösung nachträglich für 20 min gefärbt, die Lösung abgesaugt und das Gel mit Wasser zweimal gewaschen. Die Dokumentation am GelBiodoc 2000 (Biorad).

#### Elektroelution

Für die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten werden Agarose- oder PA-Gele mit größeren Probenauftragstaschen hergestellt. Nach der elektrophoretischen Trennung kann die entsprechende Bande aus dem Gel unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Das Gelstück wird in einen Dialyseschlauch (Roth), gefüllt mit 800 µl 1x TBE-Elektrophoresepuffer gegeben, der Schlauch verschlossen und für 1,5 h in einer mit 1x TBE-gefüllten Kammer bei 145 mA eluiert. Anschließend wird die 1x TBE-DNA-Lösung aus dem Dialyseschlauch in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit Ethanol (3.3.5) präzipitiert.

### **3.3.5 Reinigung von Nukleinsäuren**

Durch verschiedene molekularbiologische Verfahren erhält man Nukleinsäure-Lösungen, die unterschiedliche Puffer, pH-Werte und Salzkonzentrationen enthalten. Diese können in enzymatischen Reaktionen stören und die Effizienz der Reaktionen behindern. Auch können Proteine und RNA störend in DNA-Lösungen vorhanden sein. Um diese zu entfernen und eine reine wässrige Nukleinsäure-Lösung zu erhalten werden die Phenol-Chloroform-Extraktion und die Alkoholfällung durchgeführt.

#### Phenol-Chloroform-Extraktion

Die DNA-Lösung wird mit einer Phenol-Chloroform-Lösung extrahiert. Dadurch werden enthaltene Proteine und andere Makromoleküle denaturiert und sammeln sich in der organischen Phase der Extraktion. Die wässrige DNA-Lösung wird dazu im Verhältnis 1:1 mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:21:1, Roth) gut gemischt und in einer Mikrozentrifuge für 10 sek bei  $\text{rpm}_{\text{max}}$  zentrifugiert. Es entsteht eine Phasentrennung. In der wässrigen Phase bleibt die DNA in Lösung und kann in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Alkoholfällung wird die DNA präzipitiert.

#### Alkoholfällung

DNA und RNA bilden mit Wassermolekülen aufgrund von polaren Wechselwirkungen eine Hydrathülle und liegen im Wasser gelöst vor. Gibt man eine Mischung aus einwertigen Kationen und Alkohol zu der wässrigen DNA -Lösung, so werden diese Wechselwirkungen zerstört und die DNA bzw. RNA fällt aus. Im Rahmen der Arbeit wurden Isopropanol und Ethanol für die Alkoholfällung verwendet. Bei der Isopropanolfällung gibt man 0,6 – 0,8 Volumenanteile Isopropanol zu der DNA-Lösung und lässt die DNA bei Raumtemperatur präzipitieren. Bei der Fällung mit Ethanol wird die DNA-Lösung mit 2,5 Volumenteilen Ethanol (100 %) und 1/10 Volumenteil Natriumchlorid (5 M) oder Natriumacetat (3 M) gemischt und über Nacht bei -20 °C oder für 30 min bei -80 °C inkubiert. Sowohl

bei der Fällung mit Ethanol als auch mit Isopropanol wird der Ansatz für 15 min bei 14000xg zentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und schließlich in destilliertem und deionisiertem H<sub>2</sub>O gelöst.

Die Alkoholfällung wird in dieser Arbeit auch zur Vorbereitung der elektrischen Transformation von Ligationsansätzen in *E. Coli* eingesetzt (3.2.4). Für die elektrische Transformation muss möglichst viel Salz aus dem Ligationsansatz entfernt werden, um einen Kurzschluss durch den Hochspannungspuls zu vermeiden. Hierfür werden 10 µl Ligationsansatz mit 5 µg tRNA, 1 M Ammoniumacetat und 50 µl Ethanol (100 %) gemischt und 30 min bei 14000xg und Raumtemperatur gefällt. Nach Waschen mit 70 % Ethanol und Trocknen in der Vakuumzentrifuge wird die DNA in 5 µl Wasser gelöst und für die Transformation verwendet.

### 3.3.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäure-Lösungen wird photometrisch bei einer definierten Wellenlänge quantifiziert (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000, Peqlab). Durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) kann eine Aussage über Konzentration und Reinheit der Lösung getroffen werden. Die DNA-Konzentration wird bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit der Lösung kann durch den Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  ermittelt werden. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 ist von einer Lösung ohne Proteinverunreinigungen auszugehen. Die RNA-Konzentration einer Lösung wird ebenfalls bei 260 nm bestimmt. Hier gilt für eine reine RNA-Lösung der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  von 2,0.

### 3.3.7 Sequenzanalyse von DNA

Die Sequenzanalyse dient der Überprüfung der DNA auf Punktmutationen nach Durchführung von PCR-Reaktionen und der Überprüfung von genomischer DNA und cDNA aus dem Gewebe der knock-in-Tiere. Punktmutationen können durch fehlerhafte PCR-Reaktionen in die DNA eingebracht werden und die Aminosäuresequenz verändern. Daher ist es notwendig, Subvektoren, die Fragmente aus PCR-Reaktionen enthalten, zu sequenzieren. Die Sequenzanalysen werden von der Firma MWG Eurofins, Ebersberg durchgeführt.

### 3.3.8 Analyse mittels Southern-Blotting

Beim Southern-Blotting handelt es sich um ein Verfahren, dass für die Übertragung einzelsträngiger DNA und denaturierter doppelsträngiger DNA von einem Agarosegel auf eine Nylonmembran oder einen Nitrocellulosefilter entwickelt wurde. Die übertragene DNA ist fest an die Membran gebunden, kann aber mit einer markierten Sonde hybridisieren. Hier wird eine DNA-Sonde verwendet, die

mittels radioaktivem Cystein ( $\alpha^{32}$ Phospho-dCTP) markiert ist. Dadurch kann die Hybridisierung mit Hilfe eines Röntgenfilms oder Photoplatten sichtbar gemacht werden und ein definiertes DNA-Fragment aus der genomischen DNA identifiziert werden.

Zur Analyse der genomischen DNA mittels Southern-Blotting wird die DNA durch eine geeignet Restriktionsendonuklease in DNA-Fragmente zerschnitten. Die Fragmente werden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, depurinieren und denaturieren und anschließend auf einer Nylonmembran fixieren. Die fixierte DNA wird spezifisch von einer radioaktiv markierten Sonde erkannt und hybridisiert mit dem DNA-Fragment. Da die Sonde mit  $\alpha^{32}$ Phospho-dCTP markiert wurde, kann die Hybridisierung auf Phosphoimagerplatten sichtbar gemacht werden.

### Lösungen

Depurinierungslösung 0,25 M HCl		Denaturierungslösung 1,5 M NaCl/ 0,5 M NaOH		Neutralisierungslösung 1,5 M NaCl/ 1 M TrisHCl, pH7,4	
HCl	40 ml	NaCl	40 g	NaCl	351 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	NaOH	175,3 g	TrisHCl	121 g
		H <sub>2</sub> O	ad 2000 ml	H <sub>2</sub> O	ad 2000 ml

ssDNA 10 mg/ml		20x SSC 3 M NaCl/ 300 mM Na <sub>3</sub> Citrat, pH7,0		20 % SDS	
DNA from Hering sperm	0,5 g	NaCl	175 g	SDS	100 g
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml	Na <sub>3</sub> Citrat x2 H <sub>2</sub> O	88 g	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml
vor Gebrauch denaturieren		H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml		

1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		Hybridisierungspuffer Church-Buffer	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	178 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	156 g	ssDNA (10 mg/ml)	5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	BSA	40 g

1 M Tris (pH 8,0)		0,5 M EDTA (pH 8,0)			
Tris	60,5 g	Na <sub>2</sub> EDTA x2 H <sub>2</sub> O	93,95 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 M)	193,5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M)	56,5 ml
				20 % SDS	175 ml
				EDTA (0,5 M) pH 8,0	1 ml
				H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

### Restriktionsverdau und Gellauf

Für den Restriktionsverdau genomischer DNA werden 10 – 20 µg DNA mit 20 U des geeigneten Enzyms bei 37 °C für 16 h verdaut und anschließend in einem 0,8 %iges Agarosegel bei niedriger Spannung aufgetrennt (120 V für 2 – 3 h). Nach dem Belichten und Fotografieren des Agarosegels mit einem UV-Lineal unter UV-Licht erfolgt die Depurinierung des Gels mit 0,4 M HCl für 15 min. Anschließend wird das Gel für 30 min in einer denaturierenden Lösung geschwenkt. Die Depurinierung und Denaturierung führen zu Strangbrüchen, so dass auch Restriktionsfragmente mit einer Größe über 10 kb mittels Kapillarblotting auf die Nylonmembran übertragen werden können. Abschließend erfolgt die Neutralisation für 45 min.

### Kapillarblotting

Das Übertragen der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran (Hybond-N-Membran, Amersham) erfolgt mittels Kapillarblotting in 10 x SSC. Der in Abbildung 3-1 dargestellte Blottingaufbau ermöglicht das Transferieren von DNA durch Kapillarkräfte. Nach 12 – 16 h sind die

Fragmente auf die Nylonmembran übertragen. Anschließend erfolgt das Fixieren der DNA auf der Membran durch Quervernetzung (crosslinking) mit UV-Licht unterschiedlicher Wellenlänge (UV-Stratalinker 1800, Stratagene) und das Trocknen der Membran bei 80 °C für 1 – 2 h.

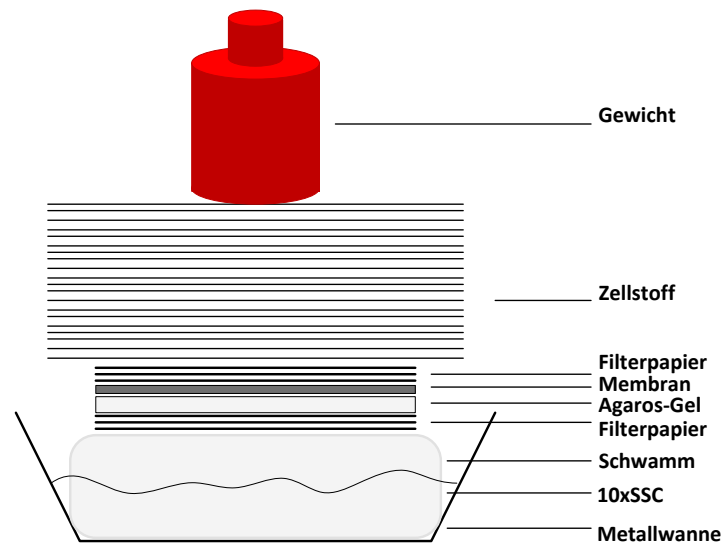


Abbildung 3-1 Aufbau Kapillarblotting

### Herstellung der $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten DNA-Sonde

Die Sonden für den Southernblot werden aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert und durch eingefügte Restriktionsstellen in den pBluescript-Vektor subkloniert. Für die Markierungsreaktion mit  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP wird die Sonde durch Restriktionsverdau aus dem Vektor geschnitten und elektrophoretisch gereinigt. Pro Markierungsreaktion werden 100 – 200 ng denaturierte DNA eingesetzt. Für die radioaktive Markierung wird das Random Primed Labeling Kit von Roche verwendet. Prinzip hierbei ist, dass das Klenow-Fragment mit Hilfe von Zufallshexameren (random primer) neue DNA-Stränge synthetisiert und radioaktiv markiertes  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP anstelle von Cystein einbaut. Die Markierungsreaktion wird für 90 min bei 37 °C durchgeführt.

Labeling Ansatz	
Sonden-DNA, denaturiert	8 $\mu\text{l}$
dXTP (dATP, dGTP, dTTP=1:1:1)	3 $\mu\text{l}$
10x Reaktionspuffer	2 $\mu\text{l}$
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	6 $\mu\text{l}$
Klenow-Fragment	1 $\mu\text{l}$

Nach Reinigung der markierten Sonde (illustra NICK Columns, GE) wird die Strahlung im Szintillationszähler gemessen, quantifiziert und mit einer entsprechenden Menge an Hybridisierungspuffer gemischt. Hierbei wird eine Strahlung von  $5 \times 10^6$  cpm/ml Puffer benötigt.

### DNA-Sonden-Hybridisierung und Detektion

Die Nylonmembran wird in der Hybridisierungspuffer-Sonden-Mischung über Nacht bei 60 °C im Wasserbad inkubiert, wodurch die Sonde mit der DNA hybridisieren kann. Wichtig ist, dass die Nylonmembran zuvor 3 – 4 h mit dem Hybridisierungspuffer bei 60 °C präinkubiert wurde, um die Membran mit ssDNA zu sättigen und ein unspezifisches Binden der Sonde an der Membran zu verhindern. Am Folgetag wird durch Waschschrte bei steigenden Temperaturen mit SDS-haltigen Waschlösungen die überschüssige Sonde von der Membran im Schüttelwasserbad gewaschen.

<b>2x SSC</b>		<b>2x SSC/ 0,1 % SDS</b>		<b>0,4x SSC/0,1 % SDS</b>	
20x SSC	100 ml	20x SSC	100 ml	20x SSC	20 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	20 % SDS	5 ml	20 % SDS	5 ml
		H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
Kurzes Schwenken bei 60 °C		15 min bei 60 °C		je 30 min bei 65 °C, 67 °C und 72 °C	

Die Membran wird zur Belichtung einer Phosphoimagerplatte für 1-5 Tage in einer Fotokassette gelagert und anschließend mit Hilfe des Cyclone®Plus Entwicklers (Perkin Elmer)ausgelesen.

### **3.4 Kultivierung und Veränderung von HEK293T-Zellen**

Die HEK293-Zelllinie ist eine einschichtig wachsende Zelllinie (*monolayer*), die aus embryonalen menschlichen Nierenzellen in den 1970ern gewonnen wurde. Durch Transfektion mit adenoviralem SV40 Large T-Antigen besitzen HEK293T-Zellen die Möglichkeit Plasmide, die einen SV40-Replikationsursprung besitzen, zu vervielfältigen und die Überexpression der im Plasmid enthaltene cDNA zu ermöglichen. HEK293T-Zellen werden bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C in Quantum286 (PAA) kultiviert. Quantum286 ist ein Bicarbonat-gepuffertes Kulturmedium für Endothelzellen, das Serum, Wachstumsverstärker, Spurenelemente und essentiellen Aminosäuren und Proteine enthält. Dem Kulturmedium wird zum Schutz vor bakteriellen Infektionen und Pilzwachstum das Antibiotikum/Antikmykotikum Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) zugesetzt.

#### Nährmedien und Zusätze

##### **Quantum286** (PAA, # U15-818)

Medium for epithelial cells

##### **10x Trypsin/EDTA** (Invitrogen, # 15400-54)

Verdünnung mit 1x PBS auf 1x bzw. 2x Trypsin/EDTA, sterilfiltrieren, 10 ml Aliquots, -20 °C

##### **Penicillin-Streptomycin** (Pen/Strep, Invitrogen, # 15070-063)

Sterilfiltrieren und Lagerung als 5 ml-Aliquots bei -20 °C

Quantum286		Einfriermedium (10 %)		1x PBS, pH 7,4	
Quantum286	500 ml	Quantum286	9 ml	NaCl	40 g
Pen/Strep	5 ml	DMSO	1 ml	KCl	1 g
				Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·x 2H <sub>2</sub> O	7,2 g
				KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 g
				H <sub>2</sub> O	ad 5000 ml
				autoklavieren, 300 ml-Aliquots	

### Kulturgefäße

Kulturgefäß	Mediumvolumen	Trypsin/EDTA (0,05 %)
75 cm <sup>2</sup> -Flasche	15 ml	3 ml
25 cm <sup>2</sup> -Flasche	5 ml	2 ml

### 3.4.1 Ausbringen und Expandieren von HEK293T-Zellen

#### Ausbringen der HEK293T-Zellen

Die HEK293T-Zellen werden aus dem flüssigen Stickstoff genommen, schnell im 37 °C Wasserbad aufgetaut und in 7 ml Quantum286 resuspendiert. Die Zellsuspension wird bei 1000xg für 5 min abzentrifugiert, in 1 ml frischen Quantum286 (+Pen/Strep) resuspendiert und in eine Kultur-Flasche mit vorgelegtem Quantum286 (+Pen/Strep) gegeben. Durch kreisende Bewegungen werden die Zellen in der Kulturflasche gleichmäßig verteilt. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### Passagieren der HEK293T-Zellen

Ist das Kulturgefäß zu 90-95 % mit HEK293T-Zellen bewachsen, werden die Zellen im Verhältnis 1:3 oder 1:6 passagiert. Dazu werden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, 5 min bei 37 °C mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert und vereinzelt. Durch Zugabe von 1 – 2 Volumenteilen Quantum 286 (+Pen/Strep) wird die Trypsinierung gestoppt, die Zellsuspension wird in ein 15 ml-Falkon überführt und 5 min bei 1000xg zentrifugiert. Das Zellpellet wird in einer geeigneter Menge Quantum286(+Pen/Strep) gelöst und auf neue Kulturgefäße ausgebracht.

#### Einfrieren der HEK293T-Zellen

Die Zellen werden mit 10 % DMSO-Quantum286 (Einfriermedium) gemischt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Dafür wird ein 95 % bewachsenes Kulturgefäß zweimal mit 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und vereinzelt. Durch Zugabe von Quantum286 (1 – 2 Volumenteile) wird die Reaktion gestoppt, die Zellsuspension in einem 15 ml-Falkon bei 1000xg für 5 min abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen werden in einem Cryovial (Nunc) 1 - 3 h bei -20 °C und 1 Tag bei -80 °C in einer Styropor-Box eingefroren. Danach können die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.



### 3.4.2 Transiente Transfektion und Ernte

Bei 80-90 % Konfluenz werden HEK293T-Zellen mit der cDNA des zu überexprimierenden Proteins transfiziert, d.h. die im Expressionsplasmid pcDNA3 enthaltene cDNA wird in den Zellapparat der HEK293T-Zellen eingeschleust. Hier wird die Lipofektion (Lipofectamin 2000, Invitrogen) verwendet, d.h. das Plasmid wird in Liposomen verpackt und kann somit die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran durchdringen. Für die Bildung des Liposomen-Plasmid-Komplexes wird in der Regel ein kationische Lipid verwendet, das mit dem anionischen Plasmid aggregiert.

#### Transfektion einer 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche

57 µL Lipofectamin 2000 (Invitrogen) werden mit 5,6 ml OptiMEM *reduced Serum Medium with GlutaMAX* (Invitrogen, HEPES- und Bicarbonat-gepuffertes Kulturmedium) in einem 15ml-Falkon gemischt und bei RT für 5 min inkubiert (Lipofektions-Lösung). Je 57 µg der Plasmid-cDNA werde mit 5,6 ml OptiMEM *reduced Serum Medium* (Invitrogen, HEPES- und Bicarbonat-gepuffertes Kulturmedium) gemischt, mit der Lipofektions-Lösung vereinigt und 20 min bei RT inkubiert (Transfektionsansatz). Nach der beendeten Inkubationzeit werden die HEK293T-Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 15 ml frischem Quantum286 (ohne Antibiotikum/Antimykotikum) versetzt und der Transfektionsansatz zugegeben. Nach 6 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> werden das Transfektions-Medium und tote Zellen abgesaugt, frisches Quantum286 (+Pen/Strep) zugegeben und die Zellen für 48 h im Brutschrank inkubiert.

#### Ernte der transfizierten Zellen

Nach Ablauf der 48-stündigen Inkubationszeit wird das Medium entfernt und die Zellen 2x mit kaltem 1xPBS vorsichtig gewaschen. Es werden 5 ml 1x PBS zu den Zellen gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und durch Resuspendieren vereinzelt. Die Zell-Suspension wird in ein 15 ml-Falkon überführt, bei 1000xg 5 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet zur Lagerung bzw. thermischen Aufschluss bei -80 °C eingefroren. Das Zellpellet wird für die Proteingewinnung verwendet (3.6.2).

## 3.5 Methoden zur Erzeugung genetisch veränderter Mäuse

### 3.5.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen

#### 3.5.1.1 Embryonale Stammzellen

Als embryonale Stammzellen werden Körperzellen bezeichnet, die die Fähigkeit besitzen, in die drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm zu differenzieren. Diese Fähigkeit wird als Pluripotenz bezeichnet. Für die Erzeugung genetisch veränderter Mäuse werden embryonale Stammzellen aus der inneren Zellmasse von Blastozysten am Tag 3,5 p.c. gewonnen und kultiviert

(Nagy et al., 2003). Hier wurde die ES-Zelllinie R1 (Andreas Nagy, Mount Sinai Hospital, Toronto, Kanada; genetischer Hintergrund: 129X1/SvJx129S1/SV-+p+Tyr-cKitISI-J/+) in Passage 11 verwendet.

Um die ES-Zellen in ihrem optimalen Entwicklungsstadium zu halten, ist es entscheidend die richtigen Wachstumsbedingungen zu wählen. Werden ES-Zellen unter schlechten Konditionen kultiviert, kann es zu Läsionen im Genom kommen, die die Keimbahngängigkeit der ES-Zellen verschlechtern. Embryonale Stammzellen müssen in optimaler Dichte kultiviert werden. Dies erfordert das Passagieren der Zellen alle 2 – 3 Tage in einem Verhältnis von 1:3 bzw. 1:6. Wachsen die ES-Zellen zu dicht, kann das zur Differenzierung der Zellen in Endoderm führen. Ausdifferenzierende ES-Zellklone können an der Veränderung der Oberfläche erkannt werden: optimale Zellen besitzen eine glatte Oberfläche und glatte äußere Begrenzungen, sind die Begrenzungen „rau“, deutet dies auf eine schlechte Zellqualität hin.

ES-Zellen werden in Bicarbonat-gepuffertem Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (HERAcell, Hereaus). Hier wird Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) verwendet, das neben essentiellen Aminosäuren, Mineralsalzen und Vitaminen Glukose und den pH-Indikator Phenolrot enthält. DMEM-Kulturmedium hält unter den genannten Kulturkonditionen den optimalen pH-Wert 7,2 – 7,4. Für die Kultur der ES-Zellen wird DMEM mit essentiellen Bestandteilen versetzt: 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME), 20 % fötales Kälberserum (FBS) und 500 – 1000 U/ml LIF (Leukämie inhibierender Faktor). Um das Ausdifferenzieren der ES-Zellen zu verhindern, werden die Stammzellen auf einer Feeder-Zellschicht kultiviert. Feederzellen sind eindimensional-wachsende Zellen, die neben Nährstoffen und Wachstumsfaktoren den Leukämie inhibierenden Faktor LIF sezernieren. Für die Kultivierung der Stammzellen werden die Feederzellen durch Bestrahlung in einer Cäsiumquelle teilungsunfähig gemacht.

Alle Arbeiten mit embryonalen Stammzellen und Feederzellen werden unter der Sterilbank (LaminAir HB2448, Hereaus) mit gereinigtem und autoklaviertem Arbeitsmaterial durchgeführt. Einmalware wird steril unter die Arbeitsbank gebracht, die Zellen werden in sterilen Kulturgefäßen (Sarstedt, Corning) kultiviert. Lösungen werden mit autoklaviertem PBS hergestellt und sterilfiltriert (0,2  $\mu$ m).

#### Nährmedien und Zusätze

##### **DMEM** (Invitrogen, # 31966)

Dulbecco's modified Eagle's medium with High Glucose, sodium pyrovate and L-Glutamin

##### **FBS** (Invitrogen, #10270098)

Fötales Kälberserum; 20 min bei 60 °C inaktivieren, 50 ml Aliquots, -20 °C, Endkonzentration in 500 ml Medium: 20 %

##### **LIF 10<sup>7</sup>U/ml** (Millipore, Esgro™ #ESG1107)

Leukämie inhibierender Faktor, Arbeitslösung 5x10<sup>5</sup>U/ml: Verdünnung 1:20 mit EF-Medium, sterilfiltrieren, 1 ml Aliquots bei 4 °C, Endkonzentration in 500 ml-Medium: 1000 U/ml

##### **$\beta$ -Mercaptoethanol** (Sigma, # M7522)

$\beta$ -ME, Arbeitslösung 50 mM: 73,5  $\mu$ l  $\beta$ -ME in 21 ml PBS lösen, sterilfiltrieren, 1 ml Aliquots bei -20°C, Endkonzentration in 500 ml Medium: 0,1 mM

**G418** (Invitrogen, # 11811031)

Geneticin, G418-Sulfat, Arbeitslösung 40 mg/ml: in PBS lösen, sterilfiltrieren, 5 ml Aliquots bei -20°C, Endkonzentration in 500 ml Medium:0,4 mg/ml

**10x Trypsin/EDTA** (Invitrogen, # 15400-54)

Verdünnung mit 1x PBS auf 1x bzw. 2x Trypsin/EDTA, sterilfiltrieren, 10 ml Aliquots, -20 °C

ES-G418-Medium		EF-Medium		ES-Medium	
ES-Medium	500 ml	DMEM	450 ml	DMEM	400 ml
G418	5 ml	FBS	50 ml	FBS	100 ml
				β-ME (50 mM)	1 ml
				LIF (5x10 <sup>5</sup> U/ml)	1 ml
Einfriermedium 10 %					
		ES-Medium	18ml		
		DMSO (Sigma)	2ml		

Kulturgefäße

Kulturgefäß	Mediumvolumen	Trypsin/EDTA (0,05 %)
175 cm <sup>2</sup> -Flasche	20 ml	5 ml
75 cm <sup>2</sup> -Flasche	15 ml	3 ml
25 cm <sup>2</sup> -Flasche	5 ml	2 ml
55 cm <sup>2</sup> -Petrischale	10 ml	2 ml
6-well-Platte	3 ml/well	1,5 ml/well
24-well-Platte	1 ml/well	0,5 ml/well
96-well-Platte	200µl/well	40 µl/well

**3.5.1.2 Ausbringen, Passagieren und Einfrieren der ES-Zellen**

Die ES-Zellen R1 wurden in Passage 11 gekauft und bis zur Verwendung in Einfriermedium im flüssigen Stickstoff gelagert. Embryonale Stammzellen werden auf einer Feederzellschicht kultiviert. Dazu werden die Feederzellen mit EF-Medium in den benötigten Kulturgefäßen ausgebracht und mindestens eine Stunde vor dem Ausbringen der ES-Zellen auf ES-Medium eingestellt.

Ausbringen der ES-Zellen

Die ES-Zellen werden aus dem flüssigen Stickstoff genommen, schnell im 37 °C Wasserbad aufgetaut und in 7 ml ES-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wird bei 1000xg für 5 min abzentrifugiert, in 1 ml frischen ES-Medium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup>-Flasche mit ES-Medium gegeben. Durch kreisende Bewegungen werden die ES-Zellen in der Kulturflasche gleichmäßig verteilt. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und täglich das Medium gewechselt.

Passagieren der ES-Zellen

Ist das Kulturgefäß etwa zu 70 % mit ES-Zellkolonien bewachsen, werden die Zellen im Verhältnis 1:3 oder 1:6 passagiert. Dazu werden die ES-Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, 5 min bei 37 °C mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert und vereinzelt. Durch Zugabe von 1 – 2 Volumenteilen ES-Medium wird die Trypsinierung gestoppt. Die Zell-Suspension wird in ein 15 ml-Falkon überführt und 5 min bei 1000xg

zentrifugiert. Das Zellpellet wird in einer geeigneter Menge ES-Medium gelöst und auf neue Feeder-Kulturgefäße ausgebracht.

#### Einfrieren der ES-Zellen

ES-Zellen werden in 10 % DMSO-ES-Medium (Einfriermedium) gemischt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Dafür wird ein 70 % bewachsenes Kulturgefäß zweimal mit 1x PBS gewaschen, trypsiniert und vereinzelt. Durch Zugabe von ES-Medium (1 – 2 Volumenteile) wird die Reaktion gestoppt, die Zellsuspension in einem 15 ml-Falkon bei 1000xg für 5 min abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen werden in einem Cryovial (Nunc) 1 – 3 h bei -20 °C und 1 Tag bei -80 °C in einer Styropor-Box eingefroren. Danach können die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

### **3.5.2 Feederzellen**

Bei Feederzellen handelt es sich um eine Fibroblasten-Zelllinie, die aus Embryonen an Tag 14,5 p.c. gewonnen wird. Feederzellen sezernieren in das Kulturmedium Nährstoffe und den Leukämie inhibierenden Faktor LIF und sind ein wichtiger Faktor um die ES-Zellen in einem optimalen Entwicklungsstadium zu halten. Feederzellen wachsen in einer eindimensionalen Zellschicht (*mono layer*) und werden durch Bestrahlung in ihrer Differenzierung gestoppt. Für die Präparation von Feederzellen wird die Mauslinie C57Bl/6J-TgN(pGKneobpA)3Ems (Charles River) verwendet. Diese Tiere besitzen das für die ES-Zellkultur notwendige Neomycinresistenz-Gen.

#### **3.5.2.1 Präparation und Kultivierung der Feederzellen**

Für die Präparation der Feederzellen werden weibliche C57Bl6-Mäuse mit homozygoten C57Bl/6J-TgN(pGKneobpA)3Ems-Männchen über Nacht verpaart. Am Folgetag wird auf Vorhandensein des Vaginalplugs (Plug+) bei den Weibchen geschaut und die Plug+-Weibchen von den anderen Tieren separiert. An Tag 14,5 p.c. werden die Uteri der Plug+-Weibchen steril entnommen und die Embryonen von den Plazenten isoliert. Alle Arbeiten erfolgen mit sterilem Besteck und sterilem 1x PBS unter der Sterilbank im Stammzell-Labor. Die Embryonen werden von Kopf, Extremitäten, Schwanz und inneren Organen befreit und mit 1 ml 1x Trysin/EDTA pro Embryo im 37 °C warmen Wasserbad verdaut. Durch Resuspendieren wird eine homogene Lösung erzeugt, die mit EF-Medium zu einem Gesamtvolumen von 40 ml ergänzt wird. Je 2 ml der Zellsuspension werden in einer 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche mit 19 ml EF-Medium durch kreisende Bewegungen gut durchmischt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur vollständigen Konfluenz wachsen gelassen.

### 3.5.2.2 Inaktivierung und Einfrieren der Feederzellen

Die Feederzellen werden bei vollständiger Konfluenz geerntet (1.Passage). Dafür werden sie zweimal mit 1x PBS gewaschen, mit 5 ml 1x Trypsin/EDTA 5 min bei 37 °C inkubiert und durch Resuspendieren vereinzelt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 ml EF-Medium abgestoppt und die Suspension in ein 50 ml-Falkon überführt. 1 ml der Lösung wird zurück in die 175 cm<sup>2</sup>-Flasche gegeben, mit 19 ml EF-Medium gemischt und bis zur Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (2.Passage). Auf diese Weise wird mit allen 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen verfahren. Die Zellsuspensionen werden in 50 ml-Falkons gesammelt und bei 1000xg für 5 min abzentrifugiert. Die Pellets werden in insgesamt 20 ml EF-Medium gelöst und in einem 50 ml-Falkon vereinigt. Die Inaktivierung erfolgt durch Bestrahlung der Zellen mit  $\gamma$ -Strahlung (5000 Rad) im Institut für Mikrobiologie am Klinikum rechts der Isar. Dadurch werden die Feeder-Zellen teilungsunfähig gemacht und können als *mono layer* für die ES-Zellkultur verwendet werden. Nach der Bestrahlung werden die teilungsunfähigen Feederzellen bei 1000xg abzentrifugiert, das Pellet in einer geeigneten Menge Einfriermedium (EF-Medium + 10 % DMSO) resuspendiert und in Cryovials als 1 ml Aliquots eingefroren. Das Einfrieren erfolgt langsam in einer Styroporbox bei -20 °C für 1 - 3 h und bei -80 °C für einen Tag. Anschließend können die Feeder-Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Die Feederzellen werden vor der Verwendung in der ES-Kultur auf ihre Teilungsunfähigkeit und auf die zu verwendende Konzentration geprüft. Dazu wird pro Passage ein Cryovial schnell bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und im Verhältnis 1:30, 1:60 und 1:100 in EF-Medium verdünnt. Je 15 ml werden in einer 75 cm<sup>2</sup>-Flasche ausgebracht und die Dichte bestimmt. Das Zellwachstum wird über 4 Wochen auf Veränderungen überprüft. Liegen keine Veränderungen vor, so können die Feederzellen für die ES-Kultur verwendet werden.

### 3.5.3 Gentargeting mittels homologer Rekombination

Als homologe Rekombination wird der Austausch homologer DNA-Abschnitte während der Meiose bezeichnet. Durch Strangbrüche und Neukombination der DNA-Stränge kann die genetische Information ausgetauscht und verändert werden (*Crossing over*-Strategie). Zum Verändern der DNA-Sequenz *in vitro* wird hier die *tag and exchange*-Strategie angewendet, die zwar eine sehr niedrige Effizienz (0,1 % stabil transfizierte Stammzellen), aber auch eine sehr hohe Reinheit (nur wenige eingefügte Fremd-Basenpaare verbleiben im Genom) besitzt. Der erste Schritt ist das Einführen des Gentargetingvektors (*tag*) in die Stammzell-DNA mittels Elektroporation und die positiv-Selektion der transfizierten Stammzellklone mit Hilfe einer eingefügten Selektionskassette. Es folgt das Entfernen der Selektionskassette (*exchange*) durch Cre-Rekombination und anschließender negativ-Selektion der Klone, bei denen der Austausch stattgefunden hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *exchange*-Schritt nicht *in vitro* mit Hilfe eines Cre-Rekombinase exprimierenden Vektors, sondern *in*

*in vivo* durch Einkreuzen einer, unter dem *CMV*-Promotor, Cre-Rekombinase exprimierenden Mauslinie durchgeführt.

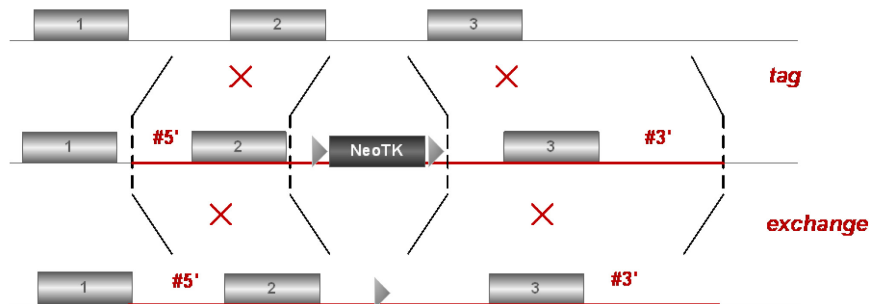


Abbildung 3-2 tag and exchange-Strategie

Für das Gentergating lässt man eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche mit ES-Zellen bis zu einer Dichte von 70 % bewachsen, erntet die Zellen und elektroporiert das Gentergatingkonstrukt in die ES-Zellen. Es folgt die homologe Rekombination des Konstrukts in das ES-Zellgenom und die Selektion mit G418-haltigem ES-Medium. Die Zellklone, die die Selektion überleben, werden in 96-well-Platten isoliert, trypsiniert und auf zwei identische 96-well-Platten (A- und B-Platte) geteilt. Die A-Platte (Masterplatte) wird bei ausreichender Zelldichte (ca. 70%) mit Einfriermedium versetzt und anschließend -80 °C eingefroren. Die B-Platte wird erneut geteilt, daraus entstehen B, C- und evtl. D-Platte, und bei absoluter Dichte für das Screening (4.3.3.3) geerntet. Das Vorgehen ist in Abbildung 3-3 dargestellt.

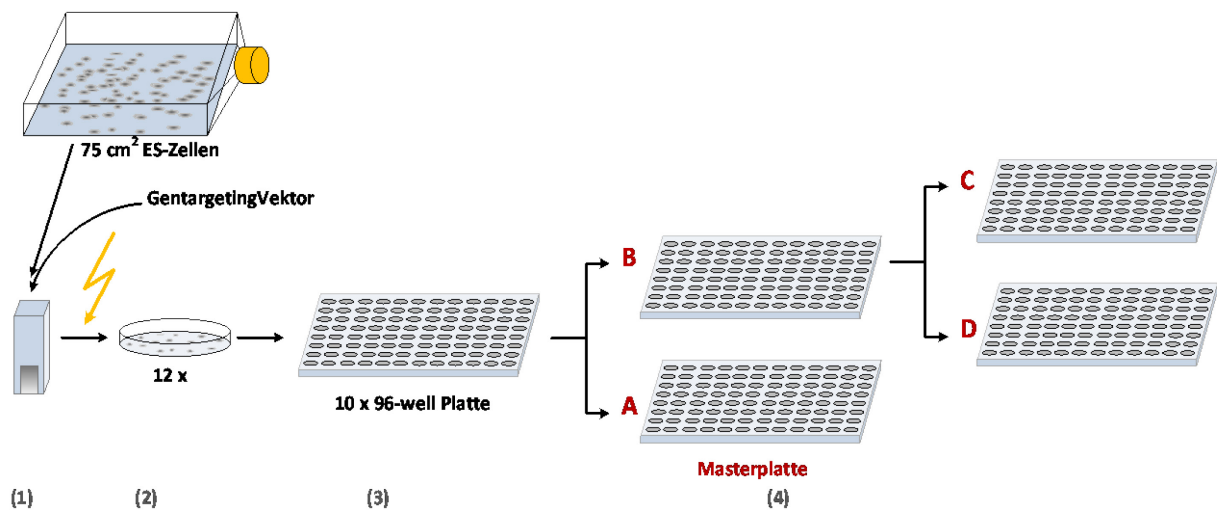


Abbildung 3-3 Vorgehen bei der ES-Zellkultur; Elektroporation (1), Selektion mit ES-G418 (2), Picken in 96-well Platte (3) und Vervielfältigen der 96-well-Platten (4)

### 3.5.3.1 Vorbereitung des Gentergatingkonstrukts, Elektroporation

Die Elektroporation ist die häufigste angewandte Methode um ein Gentergatingkonstrukt in die ES-Zellen einzubringen. Im Rahmen dieser Arbeit werden 100 µg des Gentergatingkonstrukts über Nacht

mit Acc65I linearisiert; dadurch wird das Konstrukt direkt nach dem 3'Arm geöffnet. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion (3.3.5) wird das linearisierte Konstrukt mit Ethanol und Natriumacetat präzipitiert (3.3.5), gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet. Die DNA wird in 20 µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst, ein Aliquot entnommen und die Konzentration bestimmt. Für die Elektroporation werden 10 – 50 µg DNA benötigt. Die entsprechende Menge DNA-Lösung des linearisierten Vektors wird entnommen und mit 1x PBS auf 100 µl ergänzt.

Für die Elektroporation wird eine 75 cm<sup>2</sup>-Flasche mit einer ES-Zelldichte von ca. 70 % mit 1x PBS gewaschen und 5 min bei 37 °C mit 3 ml 1x Trypsin/EDTA inkubiert. Man gibt 5 ml ES-Medium zu, vereinzelt die Zellen und zentrifugiert 5 min bei 1000xg ab. Das Zellpellet wird in 900 µl 1x PBS resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt (Pepylab). Die DNA-Lösung (100 µl) wird zu den ES-Zellen in die Elektroporationsküvette gegeben, vorsichtig durchmischt und die Küvette zwischen die Elektroporationselektroden gesetzt. Die Elektroporation erfolgt im GenePulser™ (Biorad) bei 0,23 kV und 500 µF; aus Erfahrung hat sich eine Zeitkonstante von 5 – 7 ms als ideal gezeigt. Nach der Elektroporation wird der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in ein 15 ml-Falkon überführt und mit 11 ml ES-Medium gemischt. Je 1 ml der Suspension wird auf eine 10 cm-Petrischale gegeben, die am Vortag mit Feederzellen beschichtet und am Tag der Elektroporation auf ES-Medium eingestellt wurde. Die Zellen werden 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.5.3.2 Positivselektion und Isolierung der Zellklone

Die Selektion der ES-Zellen wird in G418-haltigem Medium durchgeführt. G418 ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese inhibiert. Das *neo*-Gen, das in der Selektionskassette des elektroporierten Gtargetingkonstrukts enthalten ist, initiiert die Produktion der Aminoglykosid-3-Transferase, welche G418 durch Phosphorylierung inaktiviert. ES-Zellklone mit homolog integriertem Gtargetingkonstrukt überleben dadurch die Selektion, Zellklone ohne *neo*-Gen sterben ab. 24 h nach der Elektroporation wird das Kulturmedium auf ES-G418-Medium gewechselt. Nach weiteren 72 h sterben die ersten Kolonien ohne Selektionskassette und schwimmen im Kulturmedium. Während der Selektion muss täglich 1 – 2x das Medium gewechselt werden, um die optimalen Kulturbedingungen aufrechtzuerhalten. 8 – 10 Tage nach der Elektroporation können die überlebenden Zellkolonien makroskopisch erkannt und unter der Sterilbank in 96-well-Platten vereinzelt (Picken) werden.

Das Picken der Zellkolonien wird an vier Folgetagen unter der Sterilbank mit einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss), Mundschutz und OP-Haube durchgeführt. Es werden Zell-Kolonien mit geeigneter Größe und glatten äußeren Begrenzungen mit einer 20 µl-Pipette aufgenommen und in eine 96-well-Platte, die mit 30 µl 1x PBS pro well vorbereitet wurde, überführt. Pro Platte werden 80 Klone gepickt (Reihe A – H, Spalte 1 – 10). Die vollen Platten werden pro well mit 30 µl 2x Trypsin/EDTA für 3 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette

vereinzelt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 60 µl ES-G418 abgestoppt. Die so vereinzelteten Zellklone werden auf die A- und B-Platte verteilt. Diese wurden am Vortag mit Feederzellen beschichtet und auf ES-G418 eingestellt.

#### Master-Platte

Die A-Platte (Master-Platte) dient dazu, positive ES-Klone hochzuziehen und für die Injektion in Blastozysten vorzubereiten. Die A-Platte wird bei ausreichender Zelldichte mit 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und in 150 µl Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wird die Platte mit Klebeband verschlossen, 1-3 h bei -20 °C eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Die Lagerung der Master-Platte bei -80 °C empfiehlt sich für maximal 3 Monate. Eine längere Lagerung führt zur Verschlechterung der Zellqualität.

#### Screening-Platten

Um genügend DNA für das PCR- und Southern-Screening zu erhalten, werden Kopien von der B-Platte gemacht (Screening-Platten). Die B-Platte wird bei optimaler Dichte mit 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und die Reaktion mit 120 µl ES-G418 abgestoppt. Je 50 µl der Zellsuspension werden auf zwei leere 96-well-Platten (C- und D-Platte) mit der 8-Kanal-Pipette überführt. Anschließend werden B-, C- und D-Platten mit 150 µl frischem ES-G418-Medium versetzt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Folgetag wird bei allen Platten das Medium gewechselt. Sind die Platten vollständig bewachsen, werden sie mit 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und durch Lyse die DNA gewonnen (3.3.1.2). Die DNA wird je nach Screeningmethode einem Restriktionsverdau für den Southern-Blot (3.3.8) unterworfen oder direkt für die Genotypisierungs-PCR (3.3.3.1., GoTaq-PCR) eingesetzt.

### **3.5.4 Blastozysteninjektion**

Die positiven ES-Zellklone werden mit Hilfe eines Mikromanipulators in die Höhle der Eizellen im Blastozystenstadium (3,5 p.c.) eingebracht und in scheinchwangere CD1-Ammenmäuse operiert. Dazu werden die positiven ES-Zellklone aus den 96-well-Masterplatten isoliert, auf eine 75 cm<sup>2</sup>-Flasche expandiert und bis zur Injektion in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Stammzellen werden in Blastozysten von C57Bl6-Mäusen injiziert. Die reinen Nachkommen der C57Bl6-Mäuse sind schwarz, die Nachkommen, die die veränderten Stammzellen in das Genom integriert haben, tragen ein agouti-farbenes Fell. Nach Mikroinjektion und Operation ist der genetische Hintergrund der Nachkommen somit leicht anhand der Fellfarbe erkennbar. Hintergrund für das agouti-farbene Fell ist der Ursprung der ES-Zellen aus der agouti-farbenen Mauslinie 129X1/SvJx129S1/SV-+p+Tyr-cKit<sup>ISI</sup>-J/+.



### 3.5.4.1 Vorbereitung der ES-Zellen

ES-Zellklone, die im PCR- und im Southern-Screening als positiv identifiziert wurden, werden von den Masterplatten isoliert und in eine 24-well-Platte überführt. Dazu werden die entsprechenden Masterplatten bei 37 °C schnell aufgetaut, die ES-Zellen in 100 µl warmen ES-Medium resuspendiert und in ein, mit Feederzellen vorbereitetes 24-well gegeben. Bei geeigneter Zelldichte werden die Zellen auf ein 6-well, anschließend auf eine 25 cm<sup>2</sup>- und zwei 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen expandiert. Aus den 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen werden Cryostocks hergestellt (3.5.1.2) die im flüssigen Stickstoff gelagert werden.

Für die Blastozysteninjektion werden 6-well-Platten mit einer Feederzellschicht vorbereitet und 2 – 3 Tage vor der Injektion die positiven ES-Zellklone ausgebracht. Kurz vor der Injektion werden die ES-Zellen trypsinisiert, bei 1000xg in einem 15 ml-Falkon abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl ES-Medium aufgenommen. Die Zellen werden für 30 min auf Eis senkrecht inkubiert, tote ES-Zellen trennen sich ab und schwimmen auf. Direkt vor der Injektion werden 350 µl von der Zellsuspension (tote Zellen) abgenommen, die verbleibenden 150 µl resuspendiert und auf die Injektionsapparatur aufgebracht.

### 3.5.4.2 Gewinnung der Blastozysten

Für die Gewinnung der Eizellen im Blastozystenstadium werden C57Bl6-Mäuse über Nacht verpaart und am Folgetag auf Vorhandensein eines Vaginalplugs (Plug+) bei den Weibchen geprüft. Ein Vaginalplug bedeutet, dass die Kopulation erfolgt ist und somit auch die Befruchtung der Eizellen möglich war. Die Plug+-Weibchen werden separiert und an Tag 3,5 p.c. die Uteri entnommen. Durch Spülen der Uteri in M2-Medium (HEPES-gepuffert, Sigma) können die Blastozysten gewonnen, mit einer Mikropipette (Transferpipette, 115-124 µm, Biomedical Instruments) eingesammelt und in M16-Medium (Bicarbonat-gepuffert, Sigma) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Injektion aufbewahrt werden.

### 3.5.4.3 Injektion und Operation

Die Injektion der ES-Zellen in die Blastozysten wird an einem Mikromanipulator-Stand (Narishige, Modell MMN-1) mit inversem Mikroskop (Zeiss Axiovert 135) durchgeführt. Der Injektionsbereich und das darauf ausgebrachte M2-Medium werden auf 10 °C abgekühlt und eine frische Haltekapillare (Biomedical Instruments, 35° GC-100T-10) und eine frische Injektionskapillare (Biomedical Instruments, 20° 100, Gr.40) mit Hilfe eines Druckdosierers (Cell Tram Oil, Eppendorf) mit M2-Medium gefüllt. Für die Injektion wird die Blastozyste mit der Haltekapillare in einer Position fixiert, die das Eindringen der Injektionskapillare ohne das Verletzen der inneren Zellmasse ermöglicht. Es werden 10 -15 ES-Zellen Perlschnur-artig in die Injektionskapillare eingesammelt und in die Höhle der

Blastozyste injiziert. Anschließend werden die injizierten Blastozysten in M16-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mindestens 1 h bis zur Operation aufbewahrt. Durch die Injektion werden die Blastozysten auf Tag 0,5 rückprogrammiert.

Für die Operation werden weibliche CD1-Mäuse mit vasktomierten CD1-Männchen über Nacht verpaart. Es wird auf den Vaginalplug geprüft und die Plug+-Mäuse (Tag 0,5 p.c.) separiert. Die Operation wird von PD Dr. Sven Moosmang durchgeführt. Dazu werden die CD1-Mäuse (Tag 0,5 p.c.) intraperitoneal narkotisiert (pro Maus 100 µl der Narkoselösung aus 1,05 ml NaCl 0,9 %, 200 µl Ketavet 100 mg/ml, 200 µl Rompun 2% und 75 µl Ventraquil 1 %) und unter einem Stereomikroskop operiert: Die Bauchdecke der Maus wird geöffnet, Uterus und Ovar freigelegt und durch einen kleinen Schnitt das Infundibulum zugänglich gemacht. Die injizierten Blastozysten werden mit einer Mikropipette (Biomedical Instruments, 125-134 µm) in M2-Medium aufgenommen und vorsichtig in das Infundibulum gespült. Uterus und Ovar werden wieder in die ursprüngliche Position gebracht, die Wunde verschlossen und die Maus bis zum Erwachen warm gehalten.

### 3.5.5 Etablieren der Knock-in Mauslinie

Die Tragezeit einer Maus beträgt etwa 20 – 21 Tage; der Erfolg der Operation ist somit nach drei Wochen erkennbar. Durch den genetischen Hintergrund der Blastozysten (C57Bl6-Mäusen, Nachkommen schwarzes Fell) und der Stammzellen (129/SvJ-Mäuse, Nachkommen agouti-farbenes Fell), kann eine erfolgreiche Injektion und somit die Weitergabe des Knock-in Gens anhand der Fellfarbe erkannt werden: agouti-farbene Nachkommen tragen transgen die Veränderungen und werden als Chimären bezeichnet. Je nach Anteil des agouti-farbenen Fells wird der Anteil des knock-in-Gens in der Chimäre geschätzt: Eine hoher Anteil bedeutet eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass das knock-in-Gen keimbahngängig vererbbar ist. Der Test auf Keimbahngängigkeit geschieht durch das Verpaaren mit C57Bl6-Mäusen: agouti wird dominant gegenüber schwarz vererbt. Dadurch können nur agouti-farbene Nachkommen die Mutation auf einem Allel tragen (heterozygot); schwarze Nachkommen besitzen kein knock-in-Allel. Aus den agouti-farbenen Nachkommen der Chimären wird die homozygote Mauslinie gezüchtet.

Die männlichen Nachkommen werden mit B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J-Mäusen verpaart. Diese Mäuse tragen transgen das Cre-Rekombinase-Gen, das nur über weibliche Tiere (X-linked) weitergegeben werden kann. Durch die Expression der Cre-Rekombinase wird die Selektionskassette, die von zwei loxP-Stellen flankiert ist, aus den knock-in-Tieren entfernt: Das Cre-Protein katalysiert die Rekombination zwischen den 34 bp langen loxP-Sequenzen. Die loxP Sequenz besteht aus zwei, 13 Aminosäuren-langen, palindromischen Sequenzen, die eine die 8 bp-lange Kern-Sequenz flankieren. Die Spaltung der loxP-Sequenz durch die Cre-Rekombinase erfolgt in der Kern-Sequenz.

### 3.6 Biochemische Methoden zur Untersuchung der genetischen Veränderungen

#### 3.6.1 Proteingewinnung aus Gewebe

Es wird Protein aus Herz und Gehirn von knock-in- und Wildtyp-Mäuse gewonnen. Dazu werden die entnommenen Organe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Trockeneis in einem Mörser zu einem feinen Pulver gemahlen. Aus dem Pulver werden die Membranproteine durch den Aufschluss mit einem geeigneten Detergens und Zentrifugationsschritte gewonnen. Das Detergens verdrängt die Phospholipide der Zellmembran und interagiert mit den Membranproteinen. Es bilden sich Micellen die das Protein einschließen und in Lösung halten. Wichtig bei der Proteingewinnung sind das Arbeiten bei 4 °C und das Verwenden von Protease-Inhibitoren.

Membranpräp-Puffer pH 7,4		Solubilisierungspuffer		Inhibitor-Cocktail pro 1 ml Puffer	
EDTA	20 mM	EDTA	20 mM	Calpain-InhibitorI (Roche)	8 µg
EGTA	20 mM	EGTA	10 mM	Calpain-InhibitorII (Roche)	8 µg
Tris	10 mM	TrisHCl pH 7,4	10 mM	Protease Inhibitor Mixture (Sigma)	2 µl
NaCl	300 mM	Deoxycholat	1 %	PMSF 200 mM (Fluka)	1 µl

Pro 100 mg gemörsertem Gewebe wird 1 ml Membranpräp-Puffer (+ Inhibitoren) zugegeben und mit Hilfe des Ultraturax (Polytron PT 1200, Kinematica AG) 3x 10 sek auf Eis homogenisiert. Bei 4000xg und 4 °C werden die großen Zellfragmente für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der klare Überstand wird nun bei 100000xg 30 min in einer Ultrazentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Dabei werden Membranproteine von zytosolischen Proteinen abgetrennt. Der Überstand wird verworfen und das Membranprotein-Pellet in Solubilisierungspuffer gelöst und durch Pottern homogenisiert. Nach 20 min Durchmischen im Überkopfschüttler bei 4 °C kann durch erneute Ultrazentrifugation (100000xg, 30 min, 4 °C) eine reine Membranprotein-Fraktion im Überstand erhalten werden. Die Membranpräparation wird in Aliquots bei -80 °C gelagert.

#### 3.6.2 Proteingewinnung aus Zellen

##### Proteingewinnung für die Batch-Aufreinigung über StrepTactin Superflow

HEK293T-Zellpellets werden auf Eis aufgetaut und in 1 ml Puffer PET (mit zugesetzten Inhibitor-Lösungen) gelöst. Zusätzlich zum thermischen Aufschluss der Zellen erfolgt ein mechanischer Aufschluss durch Homogenisieren der Zellen im Potter (3x 10 sek). Die Zellsuspension wird in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die Proteine im Überkopfschüttler bei 4 °C für 30 min gelöst. Es erfolgt die Abtrennung der festen Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 3000xg für 5 min bei 4 °C. Im Überstand befinden sich die gelösten Proteine, die aliquotiert bei -80 °C gelagert werden.

Puffer PET PBS-EDTA-Triton X-100	
EDTA (0,5 M)	0,1 ml
Triton X-100	500 µl
1x PBS, pH 7,4	ad 50 ml

### SDS-Aufschluss

HEK293T-Zellpellets werden auf Eis aufgetaut und 1 ml 90 °C-warmer Tris-SDS-Puffer zu jedem Zellpellet gegeben, das gelöste Pellet in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 15 min bei 95°C gekocht. Dabei wird die Zellsuspension in regelmäßigen Abständen gevortext. Anschließend wird 10 min bei 4°C mit 15000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird in Aliquots à 20µl geteilt und bei -80°C gelagert.

Tris-SDS-Puffer	
Tris (pH 7,8)	500 µl
10% SDS	2 ml
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

### **3.6.3 Aufreinigung von OneStrep-Tag-Fusionsproteinen**

Die Aufreinigung von OneStrepTag-Fusionsproteinen aus HEK293T-Überexpressionsversuchen wird gemäß dem Protokoll der Firma IBA optimiert. Es wird ein Batch-Verfahren mit der StrepTactin Superflow-Matrix durchgeführt. Dazu werden die Zellen mit der cDNA der OneStrep-getaggten Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit transfiziert, geerntet (3.4.2) und die Zellen im Puffer PET mechanisch aufgeschlossen (3.6.2). Alle Arbeiten werden bei 4 °C auf Eis durchgeführt und sämtliche verwendete Puffer mit dem Inhibitor-Cocktail versetzt um den Proteinabbau durch Proteasen zu verhindern. Für die Aufreinigung im Batch-Verfahren werden 200 µl StrepTactin Superflow-Matrix (50 % Suspension) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 sek in der Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Matrix (ca. 100 µl) zweimal mit 200 µl Waschpuffer W gewaschen. Auf die gereinigte StrepTactin Superflow-Matrix wird die StrepTag-Proteinlösung gegeben (max. 300 µg bzw. 1 ml) und über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Dabei erfolgt die Bindung des OneStrepTag-Fusionsproteins an StrepTactin. Am Folgetag wird 5x mit 100 µl Puffer W für je 10 min im Überkopfschüttler bei 4 °C gewaschen, in der Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert und die Waschfraktionen gesammelt. Die Elution der am Säulenmaterial gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 100µl Puffer E. Puffer E enthält D-Desthiobiotin das mit einer höheren Affinität als der OneStrep-Tag an StrepTactin bindet und so das OneStrepTag-Fusionsprotein von den Bindungsstellen verdrängt. Dazu wird die Matrix mit dem gebunden Fusionsprotein für 20 min im Überkopfschüttler bei 4 °C mit Puffer E inkubiert und durch Abzentrifugieren in der Tischzentrifuge das Eluat gewonnen. Das Eluat wird mit 100µl 2xLaemmli ohne DTT für 5 min bei 95°C erhitzt und für die Westernblot-Analyse verwendet (3.6.6).

Puffer PET PBS-EDTA-Triton X-100		Puffer W		Puffer E	
EDTA (0,5 M)	0,1 ml	TrisHCl (1M)	5,0 ml	Puffer W	990 µl
Triton X-100	500 µl	NaCl (5 M)	1,5 ml	D-Desthiobiotin	10 µl
1x PBS, pH 7,4	ad 50 ml	EDTA (0,5 M)	0,1 ml		
		H <sub>2</sub> O	ad 50 ml		

Inhibitor-Cocktail pro 1 ml Puffer	
Calpain-InhibitorI (Roche)	8 µg
Calpain-InhibitorII (Roche)	8 µg
Protease Inhibitor Mixture (Sigma)	2 µl
PMSF 200 mM (Fluka)	1 µl

### 3.6.4 Überexpression von GST-Fusions-Proteinen

Das *Glutathion-S-Transferase (GST) Gene fusion System* (Amersham) ermöglicht die Expression, Aufreinigung und Detektion von N- und C-terminal fusionierten Proteinen. GST-Fusions-Proteine werden erzeugt, indem die cDNA des gewünschten Gens in die Multiple Cloning Site eines pGEX-Expressionsvektors kloniert wird. Die pGEX-Vektoren enthalten neben der Multiple Cloning Site den tac-Promoter, das *GST*-Gen und das *lacIq*-Gen. Im Rahmen der Arbeit wird der pGEX-6-P1-Vektor verwendet. Die Expression des Fusionsproteins wird durch den tac-Promoter kontrolliert, welcher durch das *lacIq*-Genprodukt inhibiert ist. Diese Inhibition wird durch Zugabe des Laktose-Analogen Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG) gestoppt. IPTG bindet an den Repressor was zur Aktivierung des tac-Promoters und zur kontrollierten Expression des GST-Fusionsproteins führt. Für die Expression des GST-Fusionsproteins wird der E.Coli Stamm BL21 (3.2.2) verwendet. In diesem Stamm findet keine Produktion der Proteasen *OmpT* und *Lon* statt, was eine hohe Proteinexpression für diesen Versuch ermöglicht. Die Aufreinigung des GST-Fusionsproteins erfolgt nach Lyse der Bakterien mittels Affinitätschromatographie an immobilisierter Glutathion-S-Transferase (GST). Das GST-Fusionsprotein bindet an GST und kann nach definierten Waschschritten von der Affinitätsmatrix eluiert werden.

Die Transformation der pGEX-Konstrukte in BL21-Zellen wird mit einer Hitzeschock-Transformation durchgeführt (3.2.4). Hierfür werden 10 ng Plasmid in 20 µl BL21-Aliquot transformiert und auf Agar-Ampicillin-Platten über Nacht inkubiert. Einzelklone werden in 2 ml LB-Ampicillin-Medium bei 225 rpm und 37 °C vermehrt. Sobald die logarithmische Wachstumsphase erreicht ist ( $OD_{600} = 0,6-0,8$ ), wird 2 µl IPTG (100 mM) zugegeben, wodurch die Überexpression gestartet wird. Nach 5 Stunden Inkubation bei 225 rpm und 37 °C werden 1,5 ml der IPTG-induzierten LB-Kultur in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, 60 sek bei  $rpm_{max}$  abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Zellpellet wird mit 200 µl eiskaltem STE-Puffer gewaschen, anschließend in 300 µl STE und 0,1 mg/ml Lysozym resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Einfrieren über Nacht bei -80°C werden die Zellen thermisch aufgeschlossen. Der weitere Aufschluss erfolgt durch Zugabe von 1,5 % Sarkosyl und vortexen. Durch Lyse im Ultraschallbad wird die Zellsuspension klar. Die Zugabe von 2 % TritonX-100 und 30 min Überkopfschütteln führt zum Herauslösen des

überexprimierten Proteins, die Zellbestandteile der BL21-Zellen können durch Zentrifugation von dem, im Überstand befindlichen pGEX-Fusionsproteinen getrennt werden. Der Überstand wird zu GST-Sepharose 4B (GE) gegeben und durch Inkubation bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler an die Sepharose-Matrix gebunden. Nach mehrmaligem Waschen mit eiskaltem PBS wird bei Raumtemperatur mit 10 µl-Glutathion-Elutionspuffer das gebundene GST-Fusionsprotein von der Matrix gelöst. Es befindet sich im klaren Überstand und kann für die Westernblot-Analyse (3.6.6) verwendet werden. Dafür wird ein gewünschtes Aliquot des Überstandes mit dem Auftragspuffer 4xLämmli gemischt und für 5 min bei 95°C erhitzt.

IPTG (100 mM)		TritonX-100 (10%)		Sarkosyl (10%)	
IPTG	238 mg	TritonX-100	1 ml	Sarkosyl	1 ml
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	STE	ad 10 ml	STE	ad 10 ml

Elutionspuffer		STE-Puffer, pH 8,0		Lysoszym (10 mg/ml)	
TrisHCl	50 mM	Tris	10 mM	Lysozym	50 mg
L-Glutathion reduced	10 mM	NaCl	150 mM	Tris (25 mM)	5 ml
		EDTA	1 mM EDTA		

### 3.6.5 Quantitative Proteinbestimmung

Für das Quantifizieren der Proteinkonzentration einer Membranpräparation wird der Pierce BCA Protein Assay (Pierce, Thermo Scientific) verwendet. Die Grundlage für die Proteinbestimmung ist die Biuret-Reaktion: Cu<sup>2+</sup> wird durch Protein-Lösungen im alkalischen Medium zu Cu<sup>+</sup> reduziert (Biuret-Reaktion). Die einwertigen Kupferionen bilden mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure einen Chelatkomplex, dessen Absorption detektiert und quantifiziert werden kann. Für die Quantifizierung wird eine BSA-Standardreihe (0,5 – 5 µg BSA) hergestellt mit deren Hilfe die Kalibriergleichung erstellt werden kann. Die Membranpräparation wird ebenfalls verdünnt (1:100 und 1:200). 50 µl der Verdünnungen werden mit je 200 µl BCA-Lösung (BCA Protein Assay Reagent I und II, 50:1) gemischt und für 60 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben in eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption der Proben bei 540 nm bestimmt (Titertek Multiskan MCC/340). Anhand der Absorption der Standardreihe kann die Proteinkonzentration der Membranpräparation errechnet werden.

### 3.6.6 Western-Blot

#### Trennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteinlösungen werden unter denaturierenden Bedingungen über Polyacrylamid-Gele aufgetrennt. Die Denaturierung erfolgt in der Regel durch Natriumdodecylsulfat (SDS) und ist notwendig, da Proteine die Fähigkeit besitzen, Primär-, Sekundär- und Tertiär-Strukturen einzugehen, die eine elektrophoretische Auftrennung stark beeinflussen. Durch Kochen der Proteinlösung in SDS-haltigem Auftragspuffer (Lämmli-Puffer) werden diese Strukturen aufgebrochen. SDS, ein stark anionisches

Detergens, überdeckt die Eigenladung der Proteine und das dem Auftragspuffer zugesetzte Dithiothreitol (DTT) spaltet Disulfidbrücken zwischen Cysteinen. Die Proteine liegen nun in einem SDS-Komplex mit einer negativen Gesamtladung vor. Diese Behandlung stellt sicher, dass die Trennung aufgrund der Masse und nicht aufgrund der Faltung der Proteine stattfindet.

4x TrisCl/SDS, pH 8,8		4x TrisCl/ SDS, pH 6,8		10x TBS	
Tris	18,2 g	Tris	6,04 g	TrisBase	12,1 g
SDS	0,4 g	SDS	0,4 g	NaCl	87,6 g
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
mit HCl <sub>conc.</sub> pH 8,8		mit HCl <sub>conc.</sub> pH 6,8		mit HCl <sub>conc.</sub> pH 8,2, autoklavieren	

Trenngel 10%		Sammelgel		10x SDS-Elektrophorese-Puffer	
Acrylamid 29:1	1,67 ml	Acrylamid 29:1	325 µl	TrisBase	30,2 g
4x TrisCl/SDS, pH 8,8	1,25 ml	4x TrisCl/SDS, pH 6,8	625 µl	Glycin	144 g
H <sub>2</sub> O	2,08 ml	H <sub>2</sub> O	1,525 ml	SDS	10 g
TEMED	5 µl	TEMED	3 µl	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
APS 20 %	12,5 µl	APS 20 %	6 µl		

4x Auftragspuffer (Lämmli)		1x TBST	
1M TrisHCl pH 6,7	10 ml	10x TBS	100 ml
DTT	2 mg	Tween 20	1 ml
20 % SDS	12,5 ml	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
Bromophenolblau	20 mg		
Glycerin	20 ml		
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml		

Für die Herstellung des SDS-Polyacrylamidgels (SDS-PAGE) wird zunächst das Trenngel zwischen zwei Glasscheiben (Gelgießapparatur, Biorad) gegossen und mit 100 % Ethanol überschichtet, um eine exakte Trennlinie zu erhalten. Durch Polymerisierung härten die Komponenten zu einem engmaschigen Gel aus. Der Ethanol wird entfernt und auf das ausgehärtete Trenngel wird nun das Sammelgel gegossen. Durch Einsetzen eines Kammes werden Probestaschen erzeugt. Ist das Sammelgel erstarrt, wird das Gel in die MiniProtean3Cell Gelkammer (Biorad) eingesetzt, die Gelkammer mit 1x SDS-Elektrophorese-Puffer befüllt und die Protein-Proben und 5 µl des Größenstandards (Precision Plus Protein Standard, Biorad) aufgetragen. Die Protein-Proben wurden zuvor mit 4xLämmli-Pufferversetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei 50 V für 30 min und 120 V für ca. 60 min. Die Lauffront der Proben ist durch den Farbstoff Bromophenolblau sichtbar.

### Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse werden im semi dry-Verfahren Proteine aus dem SDS-PAGE-Gel auf einer Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Immobilon-P, Millipore, Porengröße 0,45 µm) fixiert. Dazu werden Filterpapiere in geeigneten Puffern durchtränkt, die PVDF-Membran und das PAGE-Gel zwischen die Filterpapiere gelegt und durch Anlegen einer definierten Spannung der Transfer von Proteinen auf die Membran ermöglicht. Die Proteine werden anschließend durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern detektiert. Dazu verwendet man einen primären Antikörper, der spezifisch an einen Sequenzbereich des Proteins bindet. Anschließend wird die Membran mit einem sekundären Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers gerichtet ist, inkubiert.

Der sekundäre Antikörper ist an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, das durch Zugabe eines geeigneten Chemilumineszenz-Reagens unter oxidierenden Bedingungen ( $H_2O_2$ ) die Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert. Es kommt zur Lichtemission bei 428 nm. Die Reaktion wird durch das Belichten eines Photofilms sichtbar gemacht und das Protein detektiert.

Anodenpuffer I, pH 10,4		Anodenpuffer II, pH 10,4		Kathodenpuffer	
Tris	36,3 g	Tris	3,03 g	Tris	3,03 g
Methanol	100 ml	Methanol	100 ml	6-N-Hexansäure	5,2 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	Methanol	200 ml
NaCl	300 mM	Deoxycholat	1 %	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Für das Übertragen der Proteine werden auf die Anodenplatte drei Whatman 3 MM Papiere, die mit Anodenpuffer I durchtränkt sind, und zwei Whatman 3 MM Papiere, die mit Anodenpuffer II durchtränkt sind, übereinander gelegt. Mögliche Luftblasen werden aus dem Stapel entfernt und die in Methanol aktivierte PVDF-Membran auf den Stapel gelegt. Auf die Membran wird nun das SDS-PAGE-Gel platziert. Abschließend werden fünf Whatman 3 MM Papiere, die mit Kathodenpuffer durchtränkt sind, auf das Gel gegeben und mögliche Luftblasen entfernt. Die Kathodenplatte wird aufgesetzt und die Proteine für 1 h bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> vom Gel auf die Membran übertragen. Anschließend wird die Membran über Nacht in einer Blockinglösung aus 1x TBST + 3 % BSA inkubiert.

### Detektion

Am Folgetag wird die Membran mit dem spezifischen primären Antikörper 1,5 h bei Raumtemperatur in 1x TBST-Lösung + 5 % BSA auf dem Taumelmischer (Neolab) inkubiert und anschließend 3x 10 min mit 1x TBST-Lösung + 1 % BSA gewaschen. Anschließend wird die Membran 1 h im sekundären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert, 2x 5 min mit 1x TBST + 1 % BSA und 2x 10 min mit 1x TBST gewaschen. Die Detektion erfolgt mit dem Western Lightning Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer, Chemiluminescence Reagent und Oxidizing Reagent, 1:1). Dazu wird die Membran 1 min mit der Lösung inkubiert, in einer Photokassette in Klarsichtfolie eingeschlagen, ein Photofilm (Hyperfilm ECL, GE) 10 – 20 min aufgelegt und anschließend in der Entwicklermaschine Curix 60 (AGFA) entwickelt.

Für die Detektion des OneStrepTags mit StrepMAB-Classic HRP und Tactin HRP wird die Membran nach dem Blocken in 3 % BSA (über Nacht) 3x 5 min mit 1xTBST gewaschen und anschließend 1 h in der StrepMAB-Classic HRP- bzw. in der Tactin HRP-Lösung inkubiert. Anschließend wird 2x 5 min mit 1xTBST und 2x 1 min mit 1xTBS gewaschen und wie oben beschrieben mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent entwickelt. Für die Herstellung der OneStrep-Tag-Lösung wird StrepMAB-Classic HRP 1:10 in *enzyme dilution buffer* (EDB) verdünnt und davon 3 µl in 10 ml 1xTBST gelöst und verwendet. Tactin HRP wird 1:100 in EDB verdünnt und davon 10 µl in 10 ml in 1xTBST gelöst und verwendet.

Enzyme dilution buffer (EDB)	
BSA	100 µl
Tween 20	50 µl
1x PBS	ad 50 ml



### 3.6.7 Co-Immunpräzipitation

Durch die Co-Immunpräzipitation können interagierende Proteine aus einer Proteinlösung isoliert und anschließend über Westernblot-Analyse detektiert werden. Das Prinzip dabei ist, dass ein Antikörper gegen ein bestimmtes Protein mit der Proteinlösung inkubiert und anschließend auf Protein A-Sepharose gegeben wird. An den Antikörper bindet das spezifische Protein (Antigen) zusammen mit den gebundenen Interaktionspartnern; der Antikörper wiederum wird von der Protein A-Sepharose gebunden. Durch Waschen mit einem definierten Waschpuffer werden alle Proteine, die nicht in dem Antikörper-Antigen-Komplex an der Protein A-Sepharose, gebunden vorliegen, entfernt. Anschließend wird der spezifisch gebundene Antikörper-Antigen-Komplex von der Sepharose durch Kochen mit 4xLämmli-Puffer gelöst und mittels Westernblot-Analyse auf die Proteine von Interesse untersucht. Wie bereits bei der Membranpräparation beschrieben, werden allen Puffern Proteaseinhibitoren zugesetzt und sämtliche Arbeiten bei 4 °C durchgeführt. Vorbereitend wird die Protein A-Sepharose (Sigma) in 2 ml PBS pro 250 mg Sepharose aufgenommen, mit 0,1 % Natriumazid versetzt und durch Überkopfschütteln homogen gelöst. Vor Gebrauch wird ein 200 µl-Aliquot (entspricht 100 µl reine Protein A-Sepharose) abgenommen und dreimal mit 500 µl Solubilisierungspuffer gewaschen. Auf die vorbereitete Sepharose wird 200 µl Membranprotein-Lösung gegeben und 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler (Rotator, NeoLab) inkubiert. Dabei sollen unspezifische Protein A-Sepharose-Proteinbindungen aus der Lösung entfernt werden. Der Überstand wird abgenommen und 2,5 - 16 h bei 4 °C mit dem entsprechenden Antikörper im Überkopfschüttler inkubiert (10 µl Antikörper pro Probe). Dabei erfolgen die Bindung des Proteins und dessen Interaktionspartner an den Antikörper. Anschließend wird 100 µl gereinigte Protein A-Sepharose mit der Protein-Antikörper-Lösung für 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert, der Überstand entfernt und das Pellet dreimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Durch Kochen mit 20 µl 4x Lämmli-Puffer werden die Proteine von der Sepharose gelöst und denaturiert (5 min, 95 °C). Es folgt die in 3.6.6 beschriebene Westernblotanalyse.

Waschpuffer	
TrisHCl, pH 7,4	10 mM
NaCl	150 mM
Deoxycholat	1 %

### 3.7 Physiologische Untersuchungen der genetischen Veränderung

#### 3.7.1 Ultraschallmessung

Mit der Ultraschallmessung wird das *Fractional Shortening* (FS) bestimmt. Dabei handelt es sich um die Messung der links-ventrikulären Durchmesserverkürzung, die sich wie folgt berechnet:

$$FS = (D_{\text{Enddiastole}} - D_{\text{Endsystole}}) / D_{\text{Enddiastole}}$$

D: Durchmesser des linken Ventrikels

Während der Enddiastole sind die Ventrikel komplett entspannt und mit Blut gefüllt, während der Endsystole sind die Ventrikel kontrahiert und vollkommen von Blut entleert. Parallel zu dem FS wird die Herzfrequenz der adulten Mäuse bestimmt. Die Tiere werden dazu leicht anästhesiert (1,5 % Isoflurane), auf einer 37 °C-Wärmeplatte mit den Gliedmaßen auf Elektrodenplättchen fixiert und der Brustkorb mit einem Skalpel von Haaren befreit. Über die Elektrodenplättchen wird die Herzfrequenz bestimmt. Für die Ultraschallmessung wird der Brustkorb der Maus mit Ultraschallgel versehen und die Durchmesserverkürzung mit einem 30 MHz-Ultraschallkopf bestimmt. Daraus lässt sich nach obiger Formel das FS berechnen. Die Aufzeichnung erfolgt mit dem Vevo 770 Visual Sonic Scanner (Visual Sonics, Inc., Toronto, Canada). Herzfrequenz und FS werden vor und nach Isoprenalinstimulation (0,1 mg/kg KG) gemessen. Die Auswertung wird mit GraphPadPRISM 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) gemacht.

#### 3.7.2 Elektrokardiogramm

Die telemetrischen Elektrokardiogramm (EKG)-Aufzeichnungen werden von Dr. Anne Blaiich durchgeführt. Adulten Maus-Böcken werden bei Vollnarkose (Isoflurane/O<sub>2</sub>) radiotelemetrische EKG-Transmitter (ETA-F20, DSI, St. Paul, USA) unter das Bauchfell implantiert, die EKG-Zuführungen werden am Brustmuskel vernäht. Nach 14tägiger Erholung wird die EKG-Messung für 24 h aufgezeichnet. Es wird das EKG mit und ohne Isoprenalinstimulation (0,1 mg/kg KG) durchgeführt. Ebenfalls wird die Reaktion nach Gabe von Phenylepinephrin (0,3 mg/kg KG) getestet. Die Auswertung wird mit GraphPadPRISM 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) gemacht.

### 3.7.3 Präparation der Kardiomyozyten und Elektrophysiologie

#### Kardiomyozytenpräparation

Ventrikuläre Myozyten werden aus den Herzen adulter Mäuse isoliert. Dabei wird nach dem *AfCS Procedure Protocol PP00000125* gearbeitet. Die Myozyten werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### Elektrophysiologie

Die biophysikalischen Eigenschaften der Kardiomyozyten werden innerhalb 12 h nach Isolation mittels Elektrophysiologie im *whole-cell patch clamp* bestimmt (Hamill et al., 1981).

Alle Messungen werden von Montatip Poomvanicha und PD Dr. Jörg Wegener bei RT mit 40facher Vergrößerung unter dem Mikroskop durchgeführt. Dabei wird die gepatchte Zelle ständig mit Extrazellulärlösung umspült. Die Ableitung des Widerstandes erfolgt mit einer Patchelektrode (Borosilikat), die mit dem *Patch clamp*-Verstärker Multi Clamp 700 A (Axon Instruments, Foster City, USA) gekoppelt ist. Die Datenaufzeichnung wird mit pClamp 9.0 Software (Axon Instruments, Foster City, USA) und die Auswertung mit GraphPadPRISM 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Für die Messung des intrazellulären Widerstands der Zelle, und somit die Messung der Calciumströme, wird die Patchpipette an die Oberfläche der Zelle gebracht; in der Patchpipette herrscht ein geringer Unterdruck, wodurch die Zelle an die Pipette gesaugt und der Pipettenwiderstand erhöht wird (*seal*). Bei Erreichen eines Widerstands im Gigaohmbereich (*gigaseal*) wird die Zelloberfläche durch einen kurzen, starken Sog zerstört und die Patchpipette steht in direkter Verbindung mit dem Intrazellulärraum der Zelle. Die Daten werden mit 1,3 – 6,7 kHz gefiltert. Calciumströme werden durch wiederholte Depolarisierungsschritte (300 ms, -40 mV bis + 50 mV, 10 mV-Inkrement) stimuliert und daraus die Strom-Spannungs-Beziehung (I/V-Kurve) abgeleitet. Wichtig ist das Inaktivieren der Natriumkanäle vor Beginn der Ca<sub>v</sub>1.2-Messung. Dies erfolgt standardmäßig durch Depolarisierung der Zelle (50 ms) vom Haltepotential -80 mV auf -40 mV. Desweiteren werden die elektrische Kapazität und die Stromdichte bestimmt.

Die in den Versuchen verwendete Extrazellulärlösung (pH 7,4) enthält 137 mM NaCl, 5,4 mM CsCl, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Glucose und 10 mM HEPES, die Pipettenlösung (pH 7,3) 125 mM CsCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>ATP, 0,1 mM Na<sub>2</sub>GTP, 5mM EGTA und 10 mM HEPES. Der Widerstand der mit Pipettenlösung gefüllten Messelektrode beträgt 1 - 1,3 MΩ.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Generierung der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STOP-Mauslinie

#### 4.1.1 Gentergetingstrategie

Ziel der Arbeit war es, eine knock-in-Mauslinie mittels homologer Rekombination zu generieren, deren Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit defizient an PKA- (Ser479/480), CaMKII- (Thr498) und Akt/PKB- (Ser574) Phosphorylierungsstelle in Exon 14 ist. Dies sollte erreicht werden, indem ein Stop-Codon 5' vor die Phosphorylierungsstellen eingefügt wurde, wodurch die Translation und somit die Proteinexpression gestoppt werden sollen. Die DNA-Sequenz der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit bietet die Möglichkeit, durch Deletion von zwei Cysteinen eine Verschiebung der Basenpaare (*frameshift*) zu produzieren, was zu einem neuen Leserahmen führt, bei welchem das Stop-Codon TGA gebildet und abgelesen wird. Das Stop-Codon liegt *in frame* und terminiert die Proteinexpression (Abbildung 4-1).

**Trunkierung an AA 550**

1621 541	ACAGGGTTC	TCAAGGTGATCAAAGGC	TGA	TCGCTCTGCTCCCCGGTCTGCTTCCCAAGC	
	Q	G S Q G D Q R	A	D R S A P R S A S Q A	
1681 561	TGAAGAAGAACCTTGCCTTGAACCCCGTCAAAAAATCCCAACCCGTTCC	TCCTCA	GCCAC		Serin479/480 PKA
	E E E P C L E P V K K S Q H R S	S S	A T		
1741 581	ACACCAAAACCACCGCAGCGGGACAGGTCGAGGCCCTCTCTAGGCAAGAC	ACGTT	TGACTC		Threonin498 CaMKII
	H Q N H R S G T G R G L S R Q E	T	F D S		
1801 601	TGAAACCCAAGAGAGCCGAGACTCTGCCTACGTGGAGCCAAAGGAAGATTATTCACATGA				
	E T Q E S R D S A Y V E P K E D Y S H E				
1861 621	ACATGTGGACCGGTATGTCCCACACCGGAGCATAACCACAGAGAGGAGACCCACAGCAG				
	H V D R Y V P H R E H N H R E E T H S S				
1921 641	CAATGGCCACAGACACAGGGAGTCTCGCCACCGCTCTAGGGACATGGGTCGAGACCAGGA				
	N G H R H R E S R H R S R D M G R D Q D				
1981 661	CCACAATGAGTGCATCAAACAACGAAGCCGGCATAAA	TCTA	AGGATCGCTACTGTGACAA		Serin574 Akt/PKB
	H N E C I K Q R S R H K	S	K D R Y C D K		
2041 681	GGAGGGGAAGTAATATCCAAGAGAAGGAATGAGGCTGGCGAGTGAACAGGGATGTATA				
	E G E V I S K R R N E A G E W N R D V Y				
2101 701	CATCCGCCAATGACCGTGCCTGCCCTACCCCAAGTCTTTGTGTATCATCCTTAAGCAA				
	I R Q * P C V S L P P S L C V S S L S K				

Abbildung 4-1 Detaildarstellung von Exon14 und der Gentergetingstrategie; durch Deletion zweier Cysteine (rotes X) wurde ein *frame shift* produziert, wodurch das Stop-Codon TGA *in frame* abgelesen wird (grüner Kreis)

Für die genetische Veränderung einer Mauslinie mit Hilfe der homologen Rekombination wird ein Gentergetingvektor hergestellt, der neben einer Selektionskassette (flankiert von zwei loxP-Sequenzen) zwei Homologie-Arme enthält. Die Homologie-Arme werden als 5'-Arm und 3'-Arm bezeichnet, da sie 5' und 3' von der Selektionskassette liegen. Insgesamt sollte der Homologiebereich (5'- und 3'-Arm) zwischen 6000 und 8000 bp groß sein, um eine gute Rekombinationswahrscheinlichkeit des Konstrukts an der richtigen Stelle im Genom der ES-Zellen zu erreichen. Die Homologie-Arme können unterschiedliche Größen besitzen, sollten aber nicht kleiner als 1000 bp sein. Hier wurde ein kurzer 5'-Arm vor die Selektionskassette kloniert; der lange 3'-Arm enthielt das veränderte Exon 14. Desweiteren ist es wichtig, dass die DNA für die Konstruktion des Gentergeting-Vektors und die verwendeten ES-Zellen den gleichen genetischen Hintergrund haben.

Für die Generierung der  $Ca_v\beta_2$ STOP-Mauslinie wurde ein Bereich des *CACNB2* Gens aus 129/SvJ-Mäusen isoliert und subkloniert.

Der 5'-Arm bestand neben Exon 13 zusätzlich aus intronischen DNA-Sequenzen und war 1,6 kb groß. Der 3'-Arm besaß neben Exon 14 intronische DNA und nicht codierende 3'-UTR und hatte eine Größe von 5,7 kb. Entscheidend für die Konstruktion waren die auf der Multiple Cloning Site des pBI-loxP-NeoTK-loxP-Vektors vorhandenen Restriktionsstellen. Es war darauf zu achten, dass jede Restriktionsstelle nur einmal verwendet wurde, um das Konstrukt bei einem späteren Restriktionsverdau nicht zu zerschneiden. Für die Herstellung des Gentergetingkonstrukts wurden entsprechende DNA-Fragmente mittels PCR von der genomischen DNA amplifiziert, teilweise mit neuen Schnittstellen versehen und in Zwischenvektoren kloniert. Die Zwischenvektoren wurden durch Sequenzanalyse auf mögliche unerwünschte Mutationen, die durch PCR-Reaktion entstehen konnten, überprüft. Für den Sequenzabgleich diente das Ensembl Gene ID ENSMUST00000114723 als Vorlage. Über die Schnittstellen NotI, BamHI, ClaI und Acc65I wurden die Fragmente aus den Zwischenvektoren in den pBI-loxP-NeoTK-loxP-Vektor eingefügt. In Abbildung 4-2 ist die Gentergetingstrategie dargestellt.

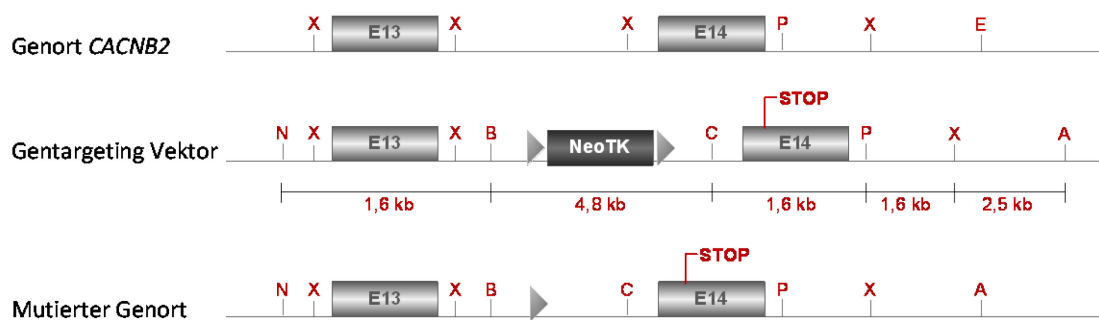


Abbildung 4-2 Gentergetingstrategie  $Ca_v\beta_2$ STOP-Maus: Genort *CACNB2* mit natürlichen Schnittstellen, Exon 13 und Exon 14; Gentergeting Vektor mit eingefügter Selektionskassette, Veränderung in Exon 14 und veränderten Restriktionssequenzen; Mutierter Genort nach homologer Rekombination und Entfernen der Selektionskassette - Exon 14 enthält das Stop-Codon TGA

#### 4.1.1.1 Herstellung des $Ca_v\beta_2$ STOP-Gentergetingkonstrukts

Für das Klonieren des Gentergetingkonstrukts wurden zunächst Zwischenvektoren mit neuen Schnittstellen bzw. mit erwünschten Mutationen hergestellt und anschließend in das Vektor-Rückgrat pBI-loxP-NeoTK-loxP schrittweise eingefügt. Das Vorgehen ist schematisch in Abbildung 4-4 dargestellt.

##### Zwischenvektor pBI(XbaI-XbaI) und 5'Arm-Fragment in pBI-loxP-NeoTK-loxP

Das 1,6 kb-lange DNA-Fragment wurde mit den Primern Mob2\_22\_for und Mob2\_23\_re amplifiziert und nach Verdau mit XbaI in die Multiple Cloning Site des pBluescriptvektors durch Ligation mit T4-DNA-Ligase eingebracht. Dadurch entstand der Zwischenvektor pBI(XbaI-XbaI). 5' vor dem eingefügten Fragment lag eine NotI-, 3' hinter dem eingefügten Fragment eine BamHI-Schnittstelle.

Für das Herstellen des 5' Arms in pBI-loxP-NeoTK-loxP wurde durch Restriktionsverdau mit NotI und BamHI das 5' Arm-Fragment aus pBI(XbaI-XbaI) geschnitten und 5' vor die loxP-NeoTK-loxP-Sequenz ligiert (Abbildung 4-4 -1).

#### Zwischenvektor pBI(ClaI-PstI)Mut

Aus der PCR-Reaktion mit XbaI\_for und PstI\_re wurde ein PCR-Produkt amplifiziert, das mit XbaI und PstI verdaut und in den pBluescript zwischenligiert wurde. Mit dem QuikChange Mutagenese Kit wurden durch Verwendung der Mutationsprimer quikMUT\_for und quikMUT\_re zwei Cysteine aus Exon 14 entfernt, wodurch das Stop-Codon TGA *in frame* rückte. Im nächsten Schritt wurde eine ClaI-Schnittstelle in das Fragment 3' hinter die natürliche XbaI-Schnittstelle eingefügt. Mit dieser ClaI-Schnittstelle wurde der 3'-Arm in das Gargetingkonstrukt eingefügt; die natürlich vorkommende Schnittstelle XbaI konnte dafür nicht verwendet werden, da im 5'-Arm bereits XbaI-Schnittstellen vorhanden waren und bei einem späteren Verdau mit XbaI das Konstrukt in mehrere Teile zerschnitten worden wäre. Für das Einführen der ClaI-Schnittstelle wurde erneut das QuikChange Mutagenese Kit verwendet, hier mit den Primern quikInsertCla\_for und quikInsertCla\_re (Abbildung 4-3, Abbildung 4-4 -2).

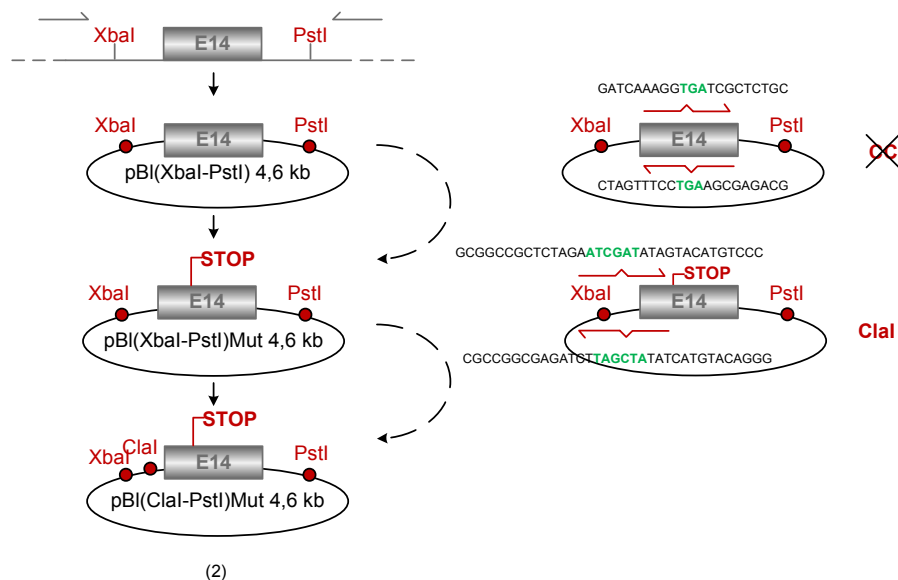


Abbildung 4-3 Veränderungen in pBI(ClaI-PstI); Schematische Darstellung der Einführung von zwei Mutationen in pBI(ClaI-PstI) mit dem QuikChange® Mutagenese Kit

#### Zwischenvektor pBI(PstI-XhoI)

Mit Hilfe der Primer PstI\_for und XhoI\_re wurde das Fragment amplifiziert, mit PstI und XhoI verdaut und in den ebenso verdauten pBluescript-Vektor ligiert (Abbildung 4-4-3).

### Zwischenvektor pBI(XhoI-Acc65I)

Das Fragment wurde mit den Primern XhoI\_for und EcoRI\_re amplifiziert, mit EcoRI und XhoI verdaut und in den pBluescript ligiert. Da die EcoRI-Schnittstelle 5' vor der XhoI-Schnittstelle in der Multiple Cloning Site des pBluescript (und auch des pBI-loxP-NeoTK-loxP) lag, wurde das Fragment in falscher Orientierung (3' - 5') eingebaut. Um das Fragment in richtiger Orientierung zu erhalten, wurde eine zweite PCR durchgeführt (pUC\_Kpn\_for und pUC\_re). Dabei wurde eine Acc65I-Schnittstelle (Isoschizomer zu KpnI) eingefügt, das PCR-Produkt mit Acc65I verdaut und anschließend in richtiger Orientierung in den pBluescript-Zwischenvektor eingefügt (Abbildung 4-4 -4).

### 3'Arm-Fragment

Für das Klonieren des 3'Arms wurde der Zwischenvektor pBI(PstI-XhoI) mit PstI und XhoI verdaut und 3' von dem veränderten Exon 14 in den Zwischenvektor pBI(ClaI-PstI)Mut ligiert. Es entstand das 6,2 kb große Fragment pBI(ClaI-XhoI). Durch Restriktionsverdau mit XhoI und Acc65I wurde das DNA-Fragment aus dem Zwischenvektor pBI(XhoI-Acc65I) geschnitten und in den Zwischenvektor pBI(ClaI-XhoI) eingefügt. Dadurch war das 3'Arm-Konstrukt mit einer Größe von 8,8 kb (5,8 kb + 3 kb pBluescript) komplett und konnte für die Endligation verwendet werden.

### Endligation des Gentergetingkonstrukts

Abschließend erfolgte das Verknüpfen des 3'Arms (5,8 kb) mit dem 5'Arm in pBlue-loxP-NeoTK-loxP (9,4 kb): Nach Restriktionsverdau mit ClaI und Acc65I wurde das 3'Arm-Konstrukt 3' hinter die loxP-NeoTK-loxP-Sequenz ligiert. Das Gentergetingkonstrukt hatte eine Größe von 15,2 kb (Abbildung 4-4).

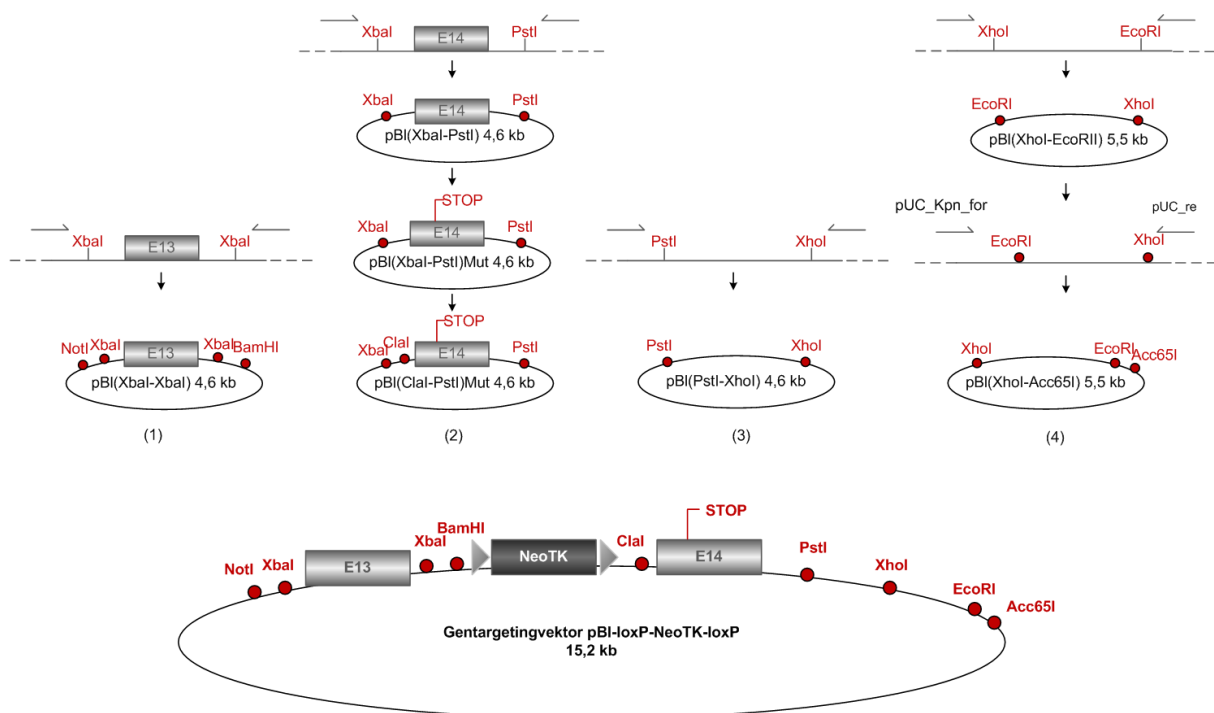


Abbildung 4-4 Schematische Darstellung der Klonierung des  $Ca_v2$ STOP-Gentergetingvektors; (1), (2), (3) und (4) bezeichnen die Zwischenvektoren

#### 4.1.1.2 Überprüfung des Gentergetingkonstrukts

##### Restriktionsanalyse

Durch die Restriktionsanalyse wurden die Größen der einzelnen Fragmente im Gentergetingkonstrukt überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass alle Subvektoren in der richtigen Größe und Reihenfolge enthalten waren.

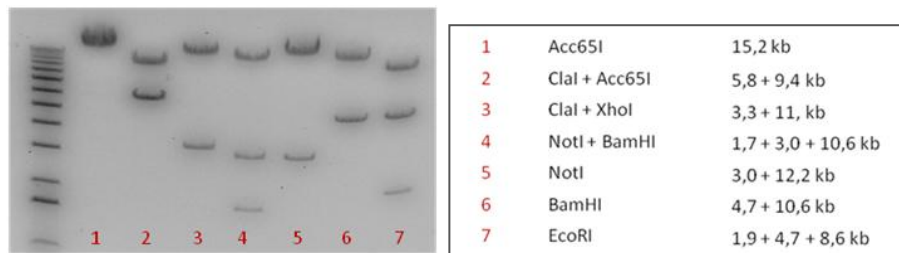


Abbildung 4-5 Restriktionsanalyse des  $Ca_v\beta_2$ STOP-Gentergetingvektors; die Nummern bezeichnen die verwendeten Restriktionsenzyme/-kombinationen, die Größen der Fragmente sind tabellarisch dargestellt

##### Test der loxP-Stellen auf Funktionalität

Die Selektionskassette ist von zwei loxP-Sequenzen flankiert, die dazu dienen, die Kassette aus dem Genom der knock-in-Mauslinie *in vivo* zu entfernen. Das Entfernen der Selektionskassette erfolgt durch Cre-vermittelte Rekombination. Um die Funktionalität der loxP-Stellen zu überprüfen, wurde der Gentergetingvektor mit Cre-Rekombinase (NEB) verdaut; nach dem Verdau wurde eine 3-Primer-PCR durchgeführt. Die Primer lagen dabei 5' vor der Selektionskassette (Genotyp\_for), auf der Neo-Kassette (Neo\_re) und 3' hinter der zweiten loxP-Sequenz (Genotyp\_re). Bei erfolgreicher Rekombination entstand so ein PCR-Produkt von 595 bp, war die Rekombination nicht erfolgreich, entstand ein Produkt von 330 bp. In Wildtyp-Mäusen oder Wildtypstammzellen, die weder Selektionskassette noch loxP-Stellen enthalten, erhielt man ein PCR-Produkt von 490 bp. Wie in Abbildung 4-6 erkennbar, erfüllten die loxP-Stellen ihre Funktion.

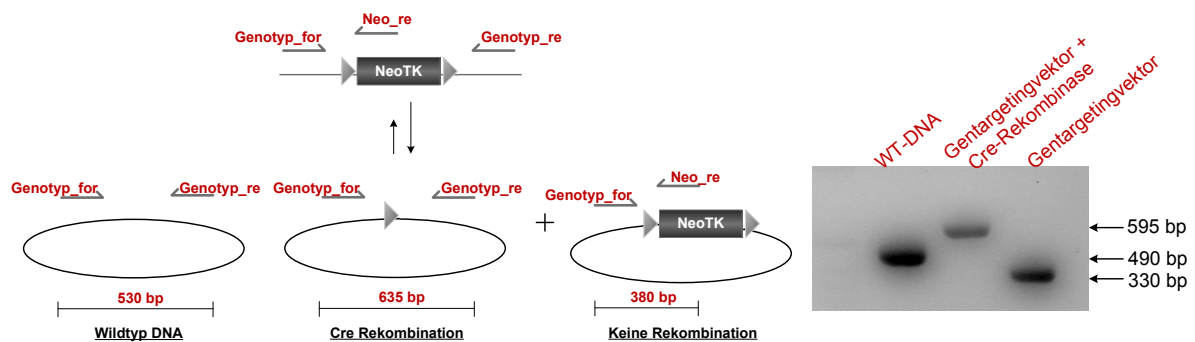


Abbildung 4-6 Cre-Rekombination; links: Strategie mit Primerkombinationen und erwarteten Größen, rechts: PCR-Produkte mit und ohne Cre-Verdau des Gentergetingkonstrukts, WT-DNA als Kontrolle



## Sequenzanalyse

Das Gtargetingkonstrukt wurde durch Sequenzanalyse auf Richtigkeit und unerwünschte Mutationen überprüft. Entscheidend war, dass keine Punktmutationen in Exon 13 und Exon 14 enthalten waren und dass in Exon 14 das Stop-Codon TGA *in frame* vorlag. Der Gtargetingvektor erfüllte diese Anforderungen.

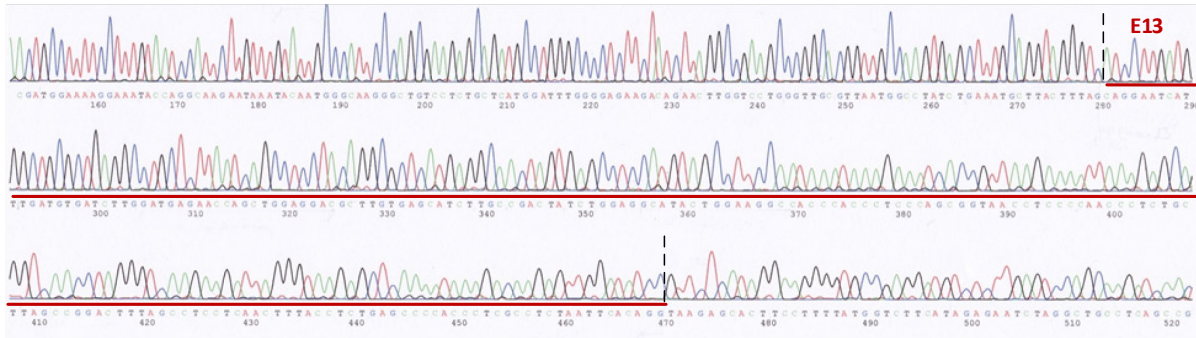


Abbildung 4-7 Sequenzanalyse Exon13; rote Linie: Exon 13

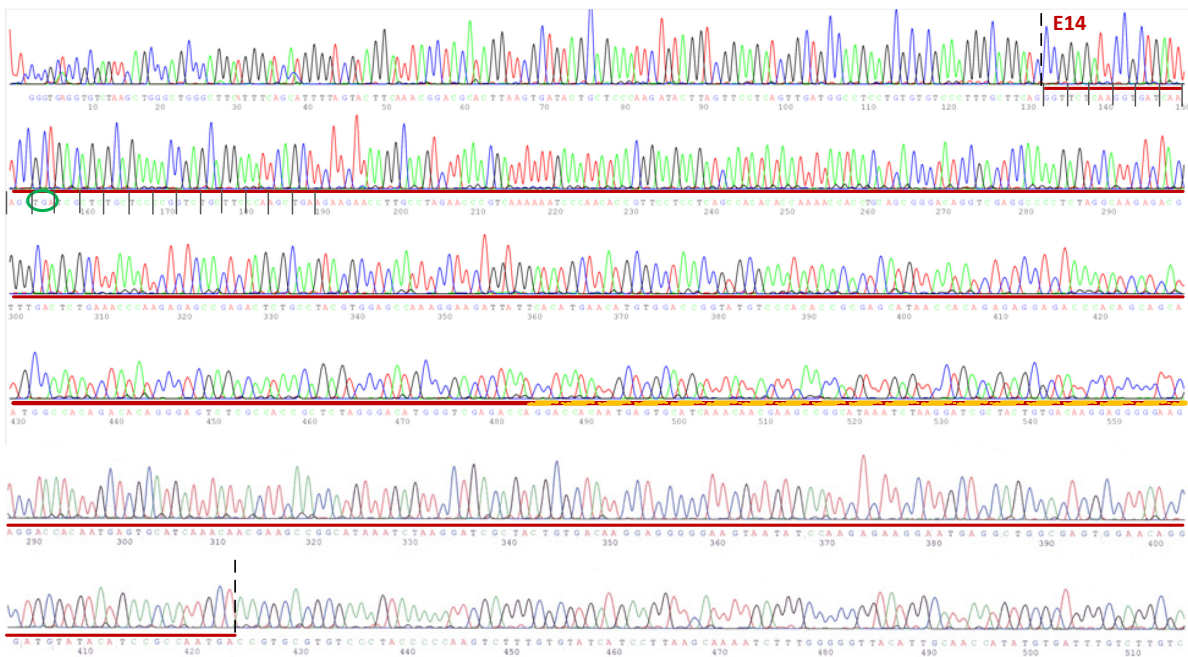


Abbildung 4-8 Sequenzanalyse Exon 14; Stop-Mutation (grüner Kreis) *in frame* in Exon 14 (rote Linie); Schwarze vertikale Striche markieren Basentriplets, rot-gelbe Linie: Überlappender Bereich aus zwei Sequenzierungen

### 4.1.2 Gtargeting mittels homologer Rekombination

Für das Targeting wurden 32 µg des mit Acc65I linearisierten Gtargetingvektors in embryonale Stammzellen (R1, Passage14) elektroporiert und auf 12 Feeder-Petrischalen verteilt. Nach 24 h wurde die Positiv-Selektion in G418-haltigem ES-Medium begonnen. Während der Selektionsphase mit erhöhtem Zellsterben wurde zweimal täglich das Kulturmedium gewechselt. An Tag 9 wurden die

ersten ES-Zellkolonien isoliert. Insgesamt wurden an vier Folgetagen 840 Klone vereinzelt und in 96-well-Platten vermehrt. Die Masterplatte wurde bei 70 %iger Konfluenz mit DMSO-haltigen Einfriermedium bei -80 °C gelagert, die Screening-Platten bei vollständiger Konfluenz geerntet und auf richtige Integration des Gentergetingkonstrukts ins ES-Zellgenom untersucht.

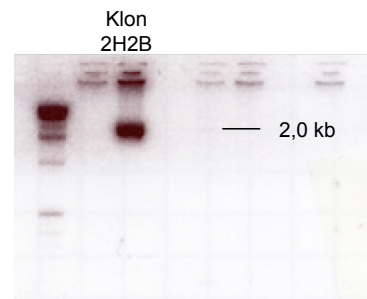
#### 4.1.2.1 Untersuchung der ES-Zellklone

Die ES-Zellklone, die die G418-Selektion überleben, tragen die Selektionskassette und somit das Gentergetingkonstrukt im Genom. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob das Konstrukt nur einmal und an der richtigen Stelle integriert wurde, wurden zunächst alle Klone mittel PCR-Screening überprüft. Positive Klone aus dem PCR-Screening wurden mittels Southern-Screening bestätigt.

##### PCR-Screening

Für das PCR-Screening wurde eine Strategie verwendet, bei der ein Primer 5' außerhalb des DNA-Bereichs liegt, welcher für die Herstellung des Gentergetingkonstrukt verwendet wurde (*forward*-Primer, PCRSreen3\_for), ein weiterer Primer liegt auf der Neo-Kassette (*reverse*-Primer, RE22\_re). So konnte nur dann ein PCR-Produkt entstehen, wenn die Rekombination an der richtigen Stelle im Genom erfolgt war. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 2,0 kb (Abbildung 4-9). Es konnte nur bei einem der 840 Klone das PCR-Produkt amplifiziert werden (Klon 2H2B). Dieser Klon wurde weiter mittels Sequenzanalyse und Southern-Blot überprüft.

Rekombination an richtiger Stelle: PCR-Produkt 2,0 kb



Wildtyp/Rekombination nicht an richtiger Stelle erfolgt: kein PCR-Produkt

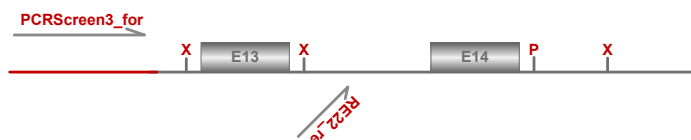


Abbildung 4-9 PCR-Strategie; bei richtiger Integration ins Genom ergibt sich ein PCR-Produkt mit der Größe 2,0 kb, (rote Linie: Bereich außerhalb des Gentergetingvektors); rechts: positiver ES-Zellklon 2H2B

##### Southern-Screening

Der PCR-positive ES-Zellklon 2H2B wurde mit Southern-Blotting überprüft. Um auszuschließen, dass eine mehrfache Integration stattgefunden hatte, wurde eine Sonde verwendet, die auf der Neo-Resistenzkassette bindet (Neo-Sonde). Durch einen geeigneten Restriktionsverdau mit BspHI wurde

die ES-Zell-DNA 5' vor dem rekombinierten Bereich und 3' hinter der Neo-Sonde geschnitten. Durch die Lage der Restriktionsschnittstelle 5' vor dem rekombinierten Bereich konnte die Integration an der richtigen Stelle im Genom nachgewiesen werden. Das von der Neo-Sonde erkannte Fragment hatte eine Größe von 3,9 kb und wurde bei einfacher Integration als einziges Signal auf dem Blot sichtbar. Als Positiv-Kontrolle wurde ein 5'-verlängerter Screening-Vektor verwendet. In Abbildung 4-10 ist die richtige und einfache Integration in Klon 2H2B dargestellt.

Neo-Southern: BspHI-Cut, 3,9 kb-Fragment

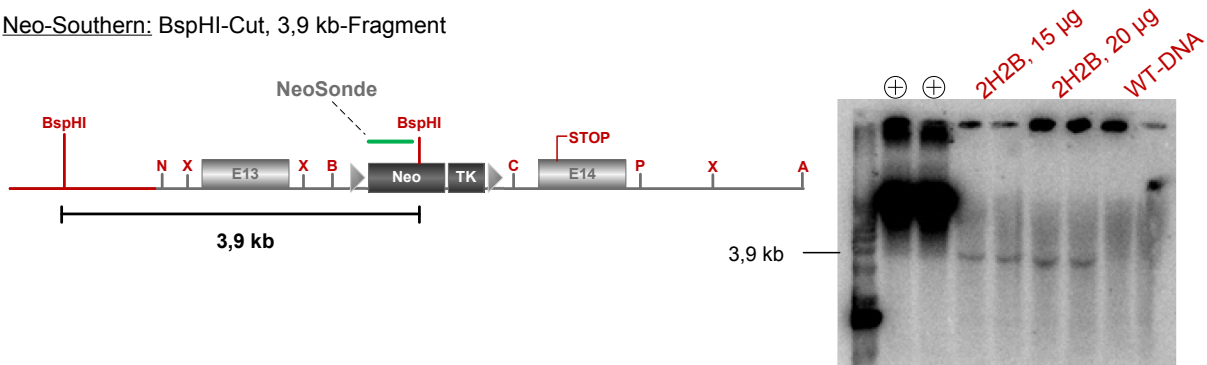


Abbildung 4-10 Southernblot-Strategie: BspHI-Verdau, die NeoSonde detektiert ein 3,9 kb-Fragment, rechts: positiv-Kontrolle, Klon 2H2B (15 µg/ 20 µg), WT-DNA verdaut mit BspHI

#### 4.1.2.2 Sequenzanalyse des positiven ES-Zellklons

Mit Southern- und PCR-Screening konnte die richtige und einfache Integration nachgewiesen werden. Durch die Sequenzanalyse wurde überprüft, ob die Mutation im Genom an der richtigen Stelle vorhanden war. Mit der Primerkombination Check1\_for (bindet auf der loxP-NeoTK-loxP-Sequenz) und 3'ArmScr12\_re (bindet 3' hinter der Mutation) wurde der 3'-Arm amplifiziert (Phusion™HF-Polymerase) und anschließend sequenziert. Es konnte die Stop-Mutation TGA *in frame* in Exon 14 nachgewiesen werden (Abbildung 4-11).

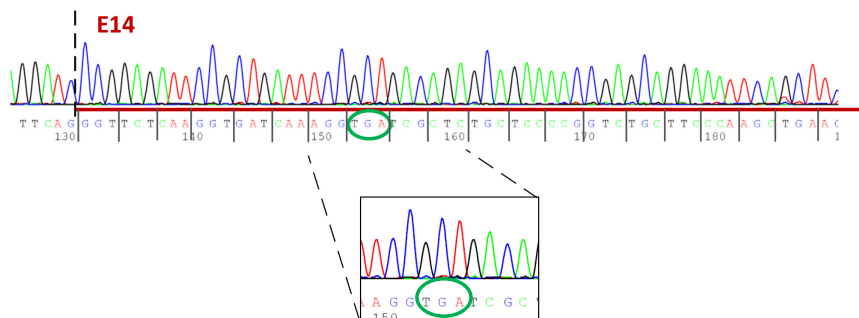


Abbildung 4-11 Sequenzanalyse 3'Arm Klon 2H2B; durch Deletion der beiden Cysteine ist das Stop-Codon TGA *in frame*

### 4.1.3 Blastozysteninjektion

Aus dem ES-Zelltargeting ging ein positiver ES-Zellklon (2H2B) hervor, welcher in C57Bl/6N-Blastozysten injiziert wurde. Insgesamt wurden an 16 Tagen 310 Blastozysten injiziert und in 25 CD1-Ammenmütter operiert. Unter dem Nachwuchs befanden sich 10 Chimären. Der Chimärismus betrug zwischen 40 - 95 %.

Die männlichen Nachkommen wurden im Alter von 7 - 8 Wochen mit C57Bl/6-Mäusen verpaart. Lediglich Chimäre A (Nachkomme mit höchstem Chimärismus, 95 %) war fertil und konnte keimbahngängig die Mutation vererben. Die keimbahngängige Vererbung konnte anhand des agouti-farbenen Fells der Nachkommen erkannt werden und wurde durch Genotypisierung und Sequenzanalyse bestätigt. Die Nachkommen trugen die Mutation nur auf einem Allel, d.h. sie waren heterozygot. Durch Verpaaren von heterozygoten Männchen mit heterozygoten Weibchen konnten Nachkommen erhalten werden, die homozygot für die  $Ca_v\beta_2$ STOP-Mutation waren, jedoch noch die Selektionskassette besaßen ( $Ca_v\beta_2$ STOPNeoTK). Mit diesen Ki-Tieren wurden erste Versuche durchgeführt.

Die Linie wurde im Laufe der Versuche durch eine  $Ca_v\beta_2$ STOP-Linie ersetzt, bei welcher durch Verpaaren von heterozygoten Männchen mit CreDeleter-Weibchen (Stamm: B6.C-Tg(CMV-Cre)1Cgn/J) ein Cre-Rekombinase exprimierendes Transgen eingekreuzt wurde. Dadurch konnte die Selektionskassette aus dem Genom entfernt werden; es verblieb nur eine loxP-Stelle im Genom. Diese Nachkommen wurden untereinander verpaart mit dem Ziel, homozygote Nachkommen mit der  $Ca_v\beta_2$ STOP-Mutation zu erhalten. Das Verpaarungsschema ist in Abbildung 4-12 dargestellt.

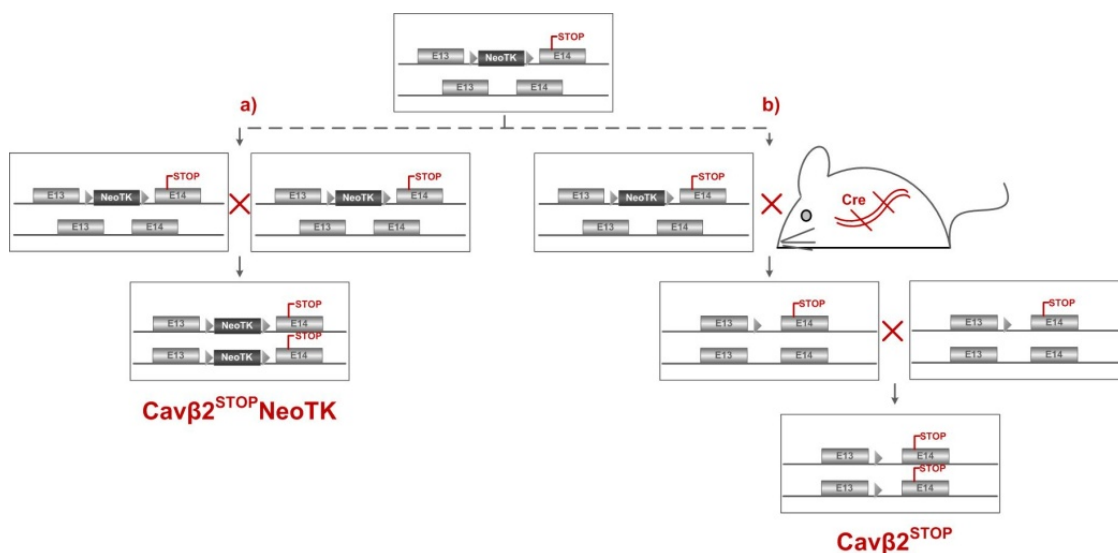


Abbildung 4-12 Verpaarungsschema  $Ca_v\beta_2$ STOP-Mauslinie; heterozygote  $Ca_v\beta_2$ STOPNeoTK-Nachkommen von Chimäre A werden a) mit heterozygoten  $Ca_v\beta_2$ STOPNeoTK-Mäusen verpaart bzw b) mit CreDeleter-Weibchen verpaart

#### 4.1.4 Untersuchung der $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Mauslinie

##### 4.1.4.1 Primäre Charakterisierung

Die homozygoten  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Mäuse sind lebensfähig und fertil. Sie zeigen äußerlich keine Unterschiede zu ihren Wildtyp-Geschwistern. Durch Verpaarung von heterozygoten knock-in-Tieren ( $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}^{(KI/+)} \times \text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}^{(KI/+)}$ ) wurde überprüft, ob die Vererbung gemäß dem Mendel'schen Gesetz erfolgt. Laut Mendel sollte sich bei dieser Verpaarung eine Vererbung der Mutation im Verhältnis Homozygot:Heterozygot:Wildtyp = 25:50:25 zeigen. Nach Anwendung des Chi-Quadrat-Testes konnte keine signifikante Abweichung von diesem Verhältnis festgestellt werden ( $\chi^2=0,329$ ). Die Vererbung folgt somit dem Prinzip der Mendel'schen Vererbung.

Für die Statistik wurden sowohl Nachkommen der Verpaarung  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}^{(KI/+)} \times \text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}^{(KI/+)}$  und  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOPNeoTK}^{(KI/+)} \times \text{Ca}_v\beta_2\text{STOPNeoTK}^{(KI/+)}$  berücksichtigt und sind in Tabelle 4-1 dargestellt.

$\text{Ca}_v\beta_2\text{STOPNeoTK}^{(KI/+)} \times \text{Ca}_v\beta_2\text{STOPNeoTK}^{(KI/+)}$			$\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}^{(KI/+)} \times \text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}^{(KI/+)}$		
Homozygot	25	24 %	Homozygot	86	23 %
Heterozygot	50	47 %	Heterozygot	188	50 %
Wildtyp	31	29 %	Wildtyp	103	27 %
Gesamt	106	100 %	Gesamt	377	100 %

Tabelle 4-1 Vererbung der  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Mutation

##### 4.1.4.2 Genotypisierung und Sequenzanalyse der genomischen DNA

Für die Genotypisierung wurden Gewebebiopsien (Schwanzspitze) entnommen, mit Proteinase K verdaut und eine PCR mit der Primerkombination Genotyp\_for, Neo\_re und Genotyp\_re durchgeführt. Die Strategie dazu ist in Abbildung 4-13 dargestellt. Die knock-in-DNA mit Selektionskassette ergab dabei ein PCR-Produkt von 330 bp, die knock-in-DNA nach Cre-Rekombination enthielt eine loxP-Seite und zeigte ein PCR-Produkt von 595 bp. Das PCR-Produkt aus Wildtyp-DNA wurde durch die gleiche Primerkombination wie bei der knock-in-DNA nach Cre-Rekombination gebildet, doch enthielt diese DNA keine loxP-Stellen und war somit 105 bp kleiner als die knock-in-DNA.

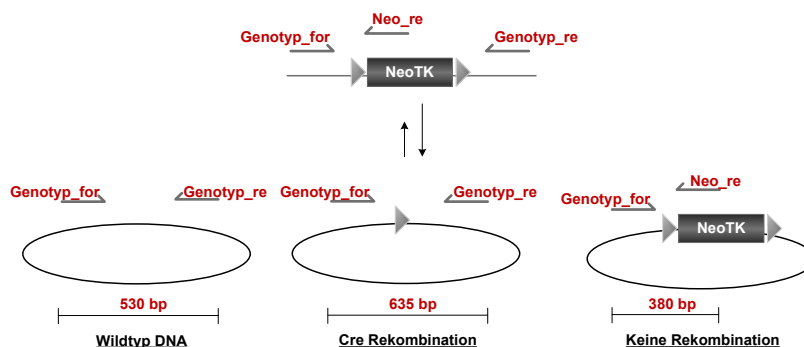


Abbildung 4-13 Genotypierungsstrategie der  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Mauslinie

Heterozygote Nachkommen mit Selektionskassette ( $Ca_v\beta_2STOPNeoTK$ ) zeigten eine Wildtyp- und einer knock-in-Bande (530 bp und 380 bp), homozygote Nachkommen dagegen nur die knock-in-Bande (380 bp). Bei heterozygoten Nachkommen ohne Selektionskassette ( $Ca_v\beta_2STOP$ ) konnte neben der knock-in-Bande (635 bp) das Wildtyp-Signal (530 bp) nachgewiesen werden; homozygote  $Ca_v\beta_2STOP$ -Mäuse zeigten nur die knock-in-Bande bei 635 bp. Abbildung 4-14 zeigt das typische Bandenmuster eines Wurfs mit und ohne Selektionskassette. Darunter ist die Sequenzanalyse der homozygoten Nachkommen dargestellt. Die Sequenzanalyse konnte die Stop-Mutation in der genomischen DNA in richtiger Position (*in frame*) nachweisen.

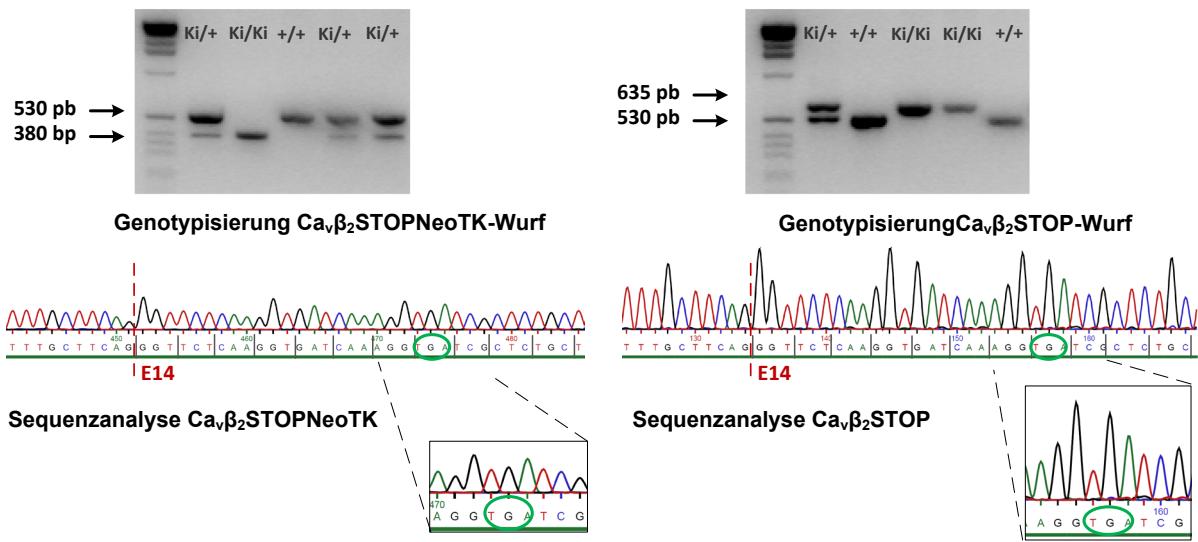


Abbildung 4-14 Genotypisierung und Sequenzanalyse der knock-in-Mäuse; links:  $Ca_v\beta_2STOPNeoTK$ -Nachkommen, rechts:  $Ca_v\beta_2STOP$ -Nachkommen; Sequenzierung von Exon 14 vom homozygoten Nachkommen zeigt in beiden Fällen die Stop-Mutation *in frame*

#### 4.1.4.3 Sequenzanalyse der cDNA

Für die Untersuchung der cDNA, das heißt DNA ohne intronische Bereiche, wurde Herz und Gehirn von Wildtyp- und Knock-in-Mäusen entnommen und daraus RNA gewonnen. Die fragile RNA wurde mit Hilfe der RT-PCR in stabile cDNA umgeschrieben. Mit der Primerkombination E11\_E12\_for und 3'ArmScr11\_re wurde ein Bereich der cDNA amplifiziert, der Exon 11, Exon 12, Exon 13 und Exon 14 umfasste. Durch die Sequenzanalyse (Sequenzierprimer SeqcDNA\_E11) konnte für Herz und Gehirn der  $Ca_v\beta_2STOP$ -Mäuse gezeigt werden, dass die Stop-Mutation vorhanden war und *in frame* in Exon 14 lag (Abbildung 4-15). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass durch den *frame shift* mehrere Stop-Codons in Folge in Exon 14 entstanden sind und *in frame* lagen. In den Exonen 11, 12 und 13 wurden keine unerwünschten Mutationen detektiert (Abbildung 4-16).

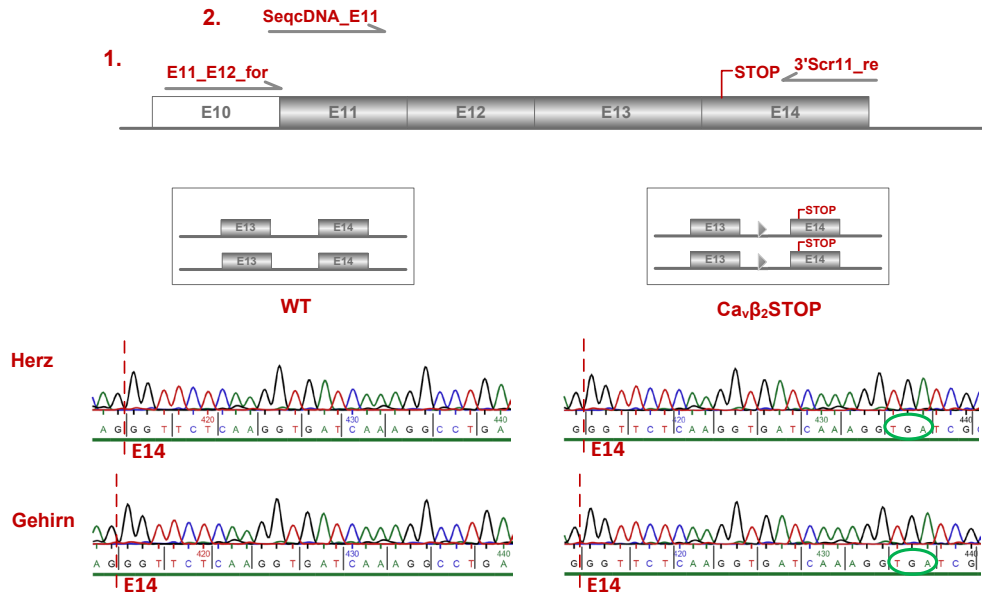


Abbildung 4-15 Sequenzanalyse der knock-in-cDNA: in  $Ca_v\beta_2$ STOP-Mäusen (Herz + Hirn) liegt die Stop-Mutation in Exon 14 in frame; bei WT-Tieren ist keine Mutation vorhanden

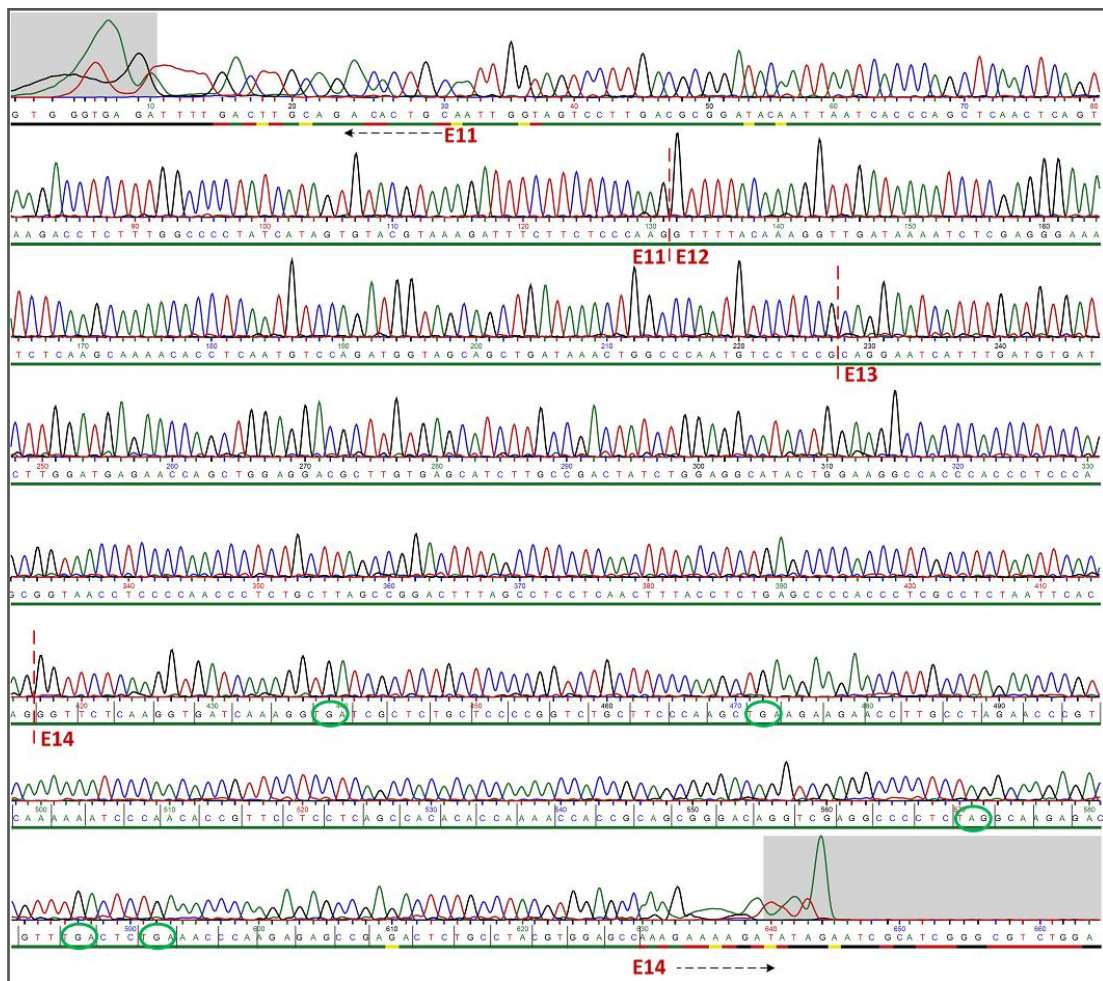


Abbildung 4-16 Sequenzanalyse der knock-in-cDNA; Dargestellt sind Exon 11, Exon 12, Exon 13 und Exon 14 von  $Ca_v\beta_2$ STOP-Mäusen; durch den entstandenen frameshift weist Exon 14 mehrere Stop-Codons in frame auf (grüne Kreise)

#### 4.1.5 Expressionsanalyse

Das Ziel der Expressionsanalyse war es zu zeigen, ob die Einführung der Mutation und das Vorhandensein der loxP-Stelle Auswirkungen auf die Proteinbiosynthese von  $\text{Ca}_v\beta_2$  und  $\text{Ca}_v1.2$  haben. Desweiteren wurde mittels Co-Immunpräzipitation untersucht, ob die  $\text{Ca}_v\beta_2$ - $\text{Ca}_v1.2$ -Interaktion intakt ist und das Trafficking nicht gestört wird.

##### Proteinebene

Aus Herz und Gehirn wurden die Membranproteine mit Hilfe einer Membranpräparation isoliert und über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Westernblotting wurden das  $\text{Ca}_v1.2$ -Protein, die  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit und die MAPK detektiert (Abbildung 4-17). Die MAPK diente als Ladekontrolle und wurde für die Quantifizierung ins Verhältnis zu den detektierten Proteinen gesetzt.

Die Expression des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteins in homozygoten Ki-Tieren konnte mit dem standardmäßig verwendeten  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Antikörper (Anti $\text{Ca}_v\beta_{2v2}$ ) zunächst nicht bestimmt werden, da das Epitop für die Antikörperbindung 3' hinter der Stop-Mutation lag und somit nicht mehr exprimiert wurde (Abbildung 4-17-a). Ein indirekter Beweis für die erfolgreiche Trunkierung war somit erbracht, wenn das  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Protein nicht detektiert werden konnte. Dies konnte für Herz- und Hirngewebe im Westernblot (Abbildung 4-17-b) gezeigt werden: Der Antikörper Anti $\text{Ca}_v\beta_{2v2}$  konnte nicht an der Ki- $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit binden; eine erfolgreiche Trunkierung ist bestätigt. Die Detektion der WT- $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit konnte mit dem Anti $\text{Ca}_v\beta_{2v2}$ -Antikörper gezeigt werden.

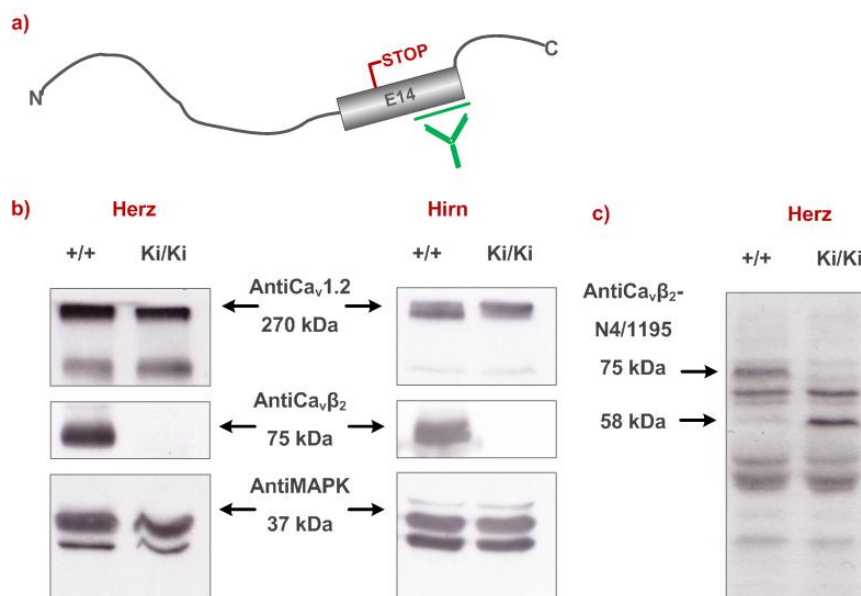


Abbildung 4-17 Westernblot-Analyse von Herz- und Hirn-Membranpräparation; (a) Bindungsstelle für spezifischen  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Antikörper; (b)  $\text{Ca}_v1.2$ - und  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteinexpression, trunkiertes Protein nicht mit herkömmlichen Anti $\text{Ca}_v\beta_{2v2}$ -Antikörper detektiert, MAPK als Ladekontrolle; (c) Detektion des trunkierten Ki-Protein mit Anti $\text{Ca}_v\beta_2$ -N4/1195; (+/+ : Wildtyp, Ki:  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ )

Ein direkter Nachweis für die Trunkierung der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit erfolgte mit Hilfe des N-terminal bindenden  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Antikörpers  $\text{Ca}_v\beta_2$ -N4/1195 (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. V. Flockerzi, Universität des Saarlandes). Mit diesem Antikörper konnte in den  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Mäusen das trunkierte,



58 kDa schwere  $Ca_v\beta_2$ STOP-Protein nachgewiesen werden (Abbildung 4-17-c). Der Antikörper konnte neben dem WT- und dem Ki- $Ca_v\beta_2$ -Protein mehrere prominente Nebenbanden detektieren. Das zeigte, dass der Antikörper unspezifische Bindungen eingehen kann, was die Verwendung des Antikörpers auf Westernblot-Detektion und Immunpräzitationen einschränkte. Für die Ki-Tiere konnte keine offensichtliche Veränderung der  $Ca_v1.2$ -Membranexpression im Vergleich zu WT-Tieren erkannt werden. Um genauere Aussagen zu treffen, sind die Quantifizierung und die Analyse der Oberflächenexpression des Kanalkomplexes notwendig.

### Co-Immunpräzitation

Der N-terminal bindende Antikörper  $Ca_v\beta_2$ -N4/1195 wurde für die Co-Immunpräzitation verwendet. Es wurde getestet, ob mit Hilfe des  $Ca_v\beta_2$ -N4/1195-Antikörpers das  $Ca_v1.2$ -Protein zusammen mit der  $Ca_v\beta_2$ STOP-Untereinheit co-immunpräzitiert werden kann. Eine erfolgreiche Co-Immunpräzitation mit  $Ca_v\beta_2$ -N4/1195 kann zeigen, dass die  $Ca_v\beta_2$ - $Ca_v1.2$ -Interaktion über den AID-ABP-Komplex nicht gestört ist. Vergleichend dazu wurde eine Co-Immunpräzitation mit dem  $Ca_v1.2$ -Antikörper durchgeführt. In Abbildung 4-18 ist die erfolgreiche Co-Immunpräzitation der  $Ca_v1.2$ -Untereinheit in der Herzmembranfraktion von WT- und Ki-Tieren dargestellt. Die Co-Immunpräzitation wurde mit 10  $\mu$ l  $Ca_v\beta_2$ -N4/1195 bzw. 10  $\mu$ l  $Ca_v1.2$ -Antikörper durchgeführt, nach Westernblotanalyse wurde die  $Ca_v1.2$ -Untereinheit mit dem  $Ca_v1.2$ -Antikörper detektiert.

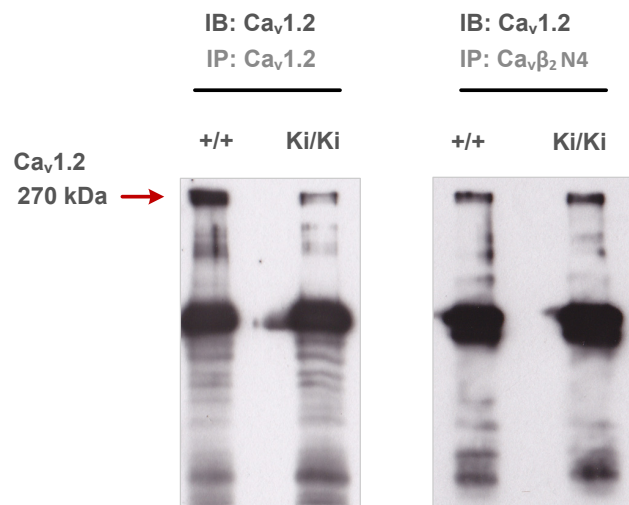


Abbildung 4-18 Co-Immunpräzitation von  $Ca_v1.2$  mit Anti $Ca_v\beta_2$ N4/1195; Kontroll-IP mit  $Ca_v1.2$ -Antikörper (links); Co-IP mit  $Ca_v\beta_2$ -N4/1195 (rechts): Co-Immunpräzitation von  $Ca_v1.2$  durchden  $Ca_v\beta_2$ -N4-Antikörper zeigt eine funktionierende  $Ca_v1.2$ - $Ca_v\beta_2$ -Interaktion; Detektion mit Anti $Ca_v1.2$

Die Interaktion von  $Ca_v\beta_2$ - und  $Ca_v1.2$ -Untereinheit war durch das Einführen der Stop-Mutation nicht behindert. Die Detektion der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit nach der Immunpräzitation mit dem  $Ca_v\beta_2$ -N4/1195-Antikörper war nicht möglich, da die Antikörper-Bande der IP ca. 60 kDa besitzt und somit die Bande der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit überdeckt. Um dies zu umgehen, ist ein N-terminaler  $Ca_v\beta_2$ -Antikörper notwendig, der aus einer anderen Spezies gewonnen wurde als der, für die Immunpräzitation verwendete Antikörper.

#### 4.1.6 Physiologische Grundcharakterisierung

##### 4.1.6.1 Makroskopische Betrachtung des Herzens

Es wurde das Herzgewicht (HW, *heart weight*) ermittelt, um eventuelle Veränderungen der Herzphysiologie makroskopisch festzustellen. Dazu wurde das Herzgewicht ins Verhältnis zur Tibiallänge (TL) gesetzt und WT- und Ki-Tiere miteinander verglichen; es wurde zwischen männlichen und weiblichen Nachkommen unterschieden. Beim Vergleich der männlichen WT- und Ki-Tieren konnte die Tendenz eines verkleinerten Herzgewichts bei den Ki-Tieren beobachtet werden. Dabei handelt es sich um keinen signifikanten Unterschied. Es ist zu berücksichtigen, dass die Untersuchung mit Mäusen im Alter von 12-16 Wochen durchgeführt wurde. Ob die Unterschiede im Alter größer und damit signifikant werden, muss an Tieren getestet werden, die älter als acht Monate sind. Bei den weiblichen Nachkommen war kein Unterschied zwischen WT- und Ki-Tieren zu sehen (Abbildung 4-19).

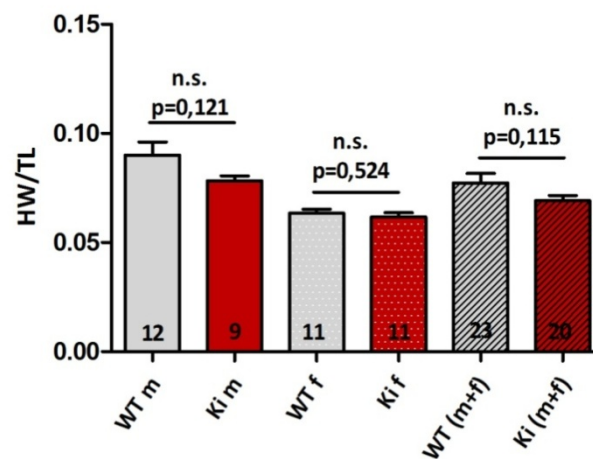


Abbildung 4-19 Verhältnis von Herzgewicht (HW) zu Tibiallänge (TL) ; männliche WT- und Ki-Tieren (Balken 1 + 2), weibliche WT- und Ki-Tieren (Balken 3 + 4) und weiblichen und männlichen WT- und Ki-Tieren (Balken 5 + 6); (grau: WT, Wildtyp, rot: Ki, Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STOP)

##### 4.1.6.2 Ultraschallmessungen

Die Ultraschallmessung und die Bestimmung der Herzfrequenz erfolgten vor und nach Isoprenalinstimulation. Bei der Ultraschallmessung wurde das *Fractional Shortening* (FS) bestimmt, das die links-ventrikuläre Durchmesserverkürzung darstellt. Durch Isoprenalinstimulation werden  $\beta$ -Adrenozeptor und dadurch die Proteinkinase A aktiviert. Es war kein Unterschied zwischen Wildtyp und Ki-Tieren beim FS erkennbar. Beide Genotypen reagierten im gleichen Maße auf die Stimulation des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs mit einem Anstieg im FS. Die Ergebnisse der EKG-Messungen sind in Abbildung 4-20 dargestellt.

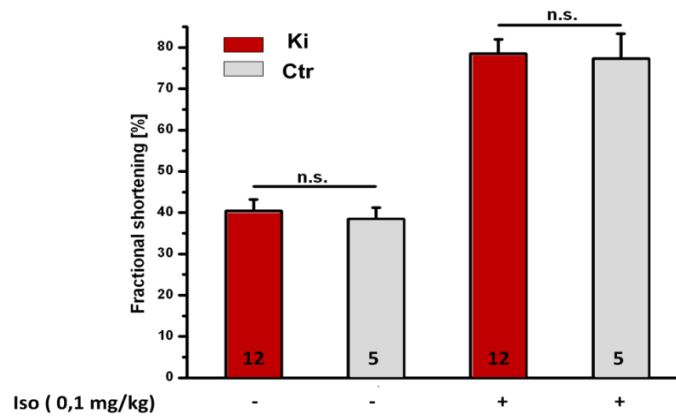


Abbildung 4-20 Fractional Shortening; links-ventrikuläre Durchmesserverkürzung vor (-) und nach (+) Isoprenalingabe, (rot: Ki,  $Ca_v\beta_2STOP$ , grau: Ctr, Wildtyp)

#### 4.1.6.3 Elektrokardiogramm

Im Elektrokardiogramm wurden die Ableitungen der einzelnen Phasen eines Herzschlags betrachtet, um mögliche Abweichungen von der normalen Herzfunktion festzustellen und einordnen zu können. Die Untersuchung der  $Ca_v\beta_2STOP$ -Mauslinie zeigte bei physiologischer Herzfrequenz von 630 bpm keine Auffälligkeiten. Die Erhöhung der Herzfrequenz auf 700 bpm durch Isoprenalin-Gabe führte zu einer Verlängerung der P-Welle in den Ki-Tieren. Einhergehend mit der P-Wellen-Verbreiterung trat eine Verkürzung der TP-Dauer auf. Weitere Auffälligkeiten konnten hier im EKG nicht festgestellt werden. Beide Genotypen reagierten auf Phenylepinephrin-Gabe mit einem Abfall der Herzfrequenz und auf Isoprenalin-Gabe mit einer Zunahme der Herzfrequenz. Die Regulationsmechanismen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Regulation) sind somit unverändert bei den Ki-Tieren. Der Parameter Aktivität, d.h. Bewegung der Tiere im Raum, wurde ebenfalls bei der EKG-Messung bestimmt. Bei den Ki-Tieren war eine nicht-signifikante Erhöhung der Aktivität feststellbar. Die Ergebnisse der EKG-Messungen sind in Abbildung 4-21 dargestellt.

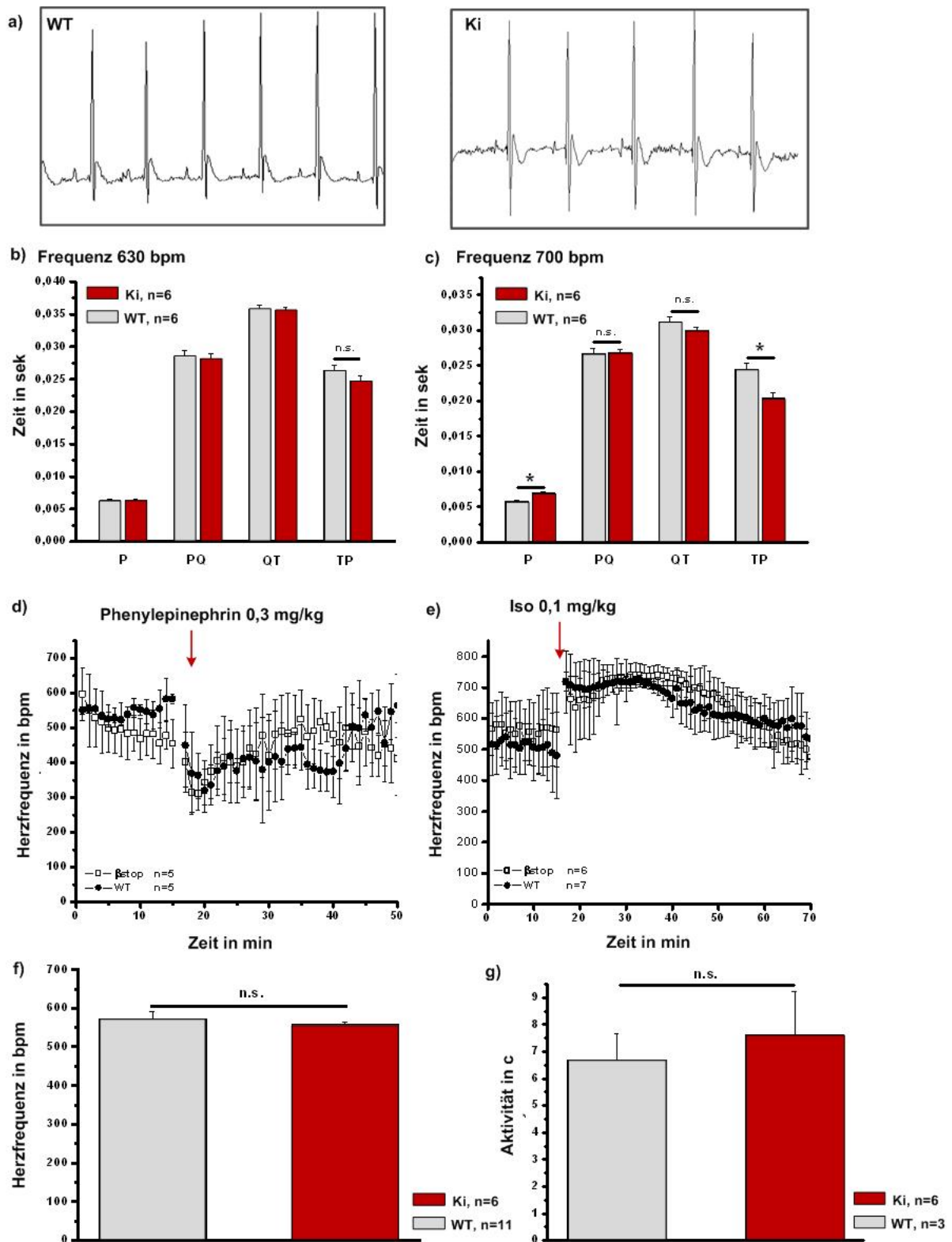


Abbildung 4-21 EKG-Messung; (a) EKG-Diagramm; (b), (c) P-, PQ-, QT- und TP-Zeiten bei 630 bpm und 700 bpm; (d) Gabe von Phenylepinephrin zur Aktivierung des  $\alpha$ -AR; (e) Gabe von Isoprenalin zur Aktivierung des  $\beta$ -AR; (f) Herzfrequenz nach Isoprenalingabe; (g) Basale Aktivität der Tiere (rot: Ki,  $\text{Ca}_v\beta_2$ STOP, grau: WT, Wildtyp)

#### 4.1.6.4 Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Untersuchungen an ventrikulären Kardiomyozyten (WT-Tiere und homozygote  $Ca_v\beta_2STOP$ -Mäuse im Alter von 12 Wochen) wurden von Montatip Poomvanicha und PD Dr. Jörg Wegener durchgeführt. Die ersten, vorläufigen Daten zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und Ki-Tieren bezüglich der Strom-Spannungs-Beziehung, der Stromdichte und der elektrischen Kapazität der Herzzellen. Bei den Ki-Tieren konnte eine Tendenz zur verminderten Stromdichte festgestellt werden (Abbildung 4-22). Um eine verlässliche Aussage diesbezüglich zu treffen, muss die Fallzahl der gemessenen Zellen erhöht werden.

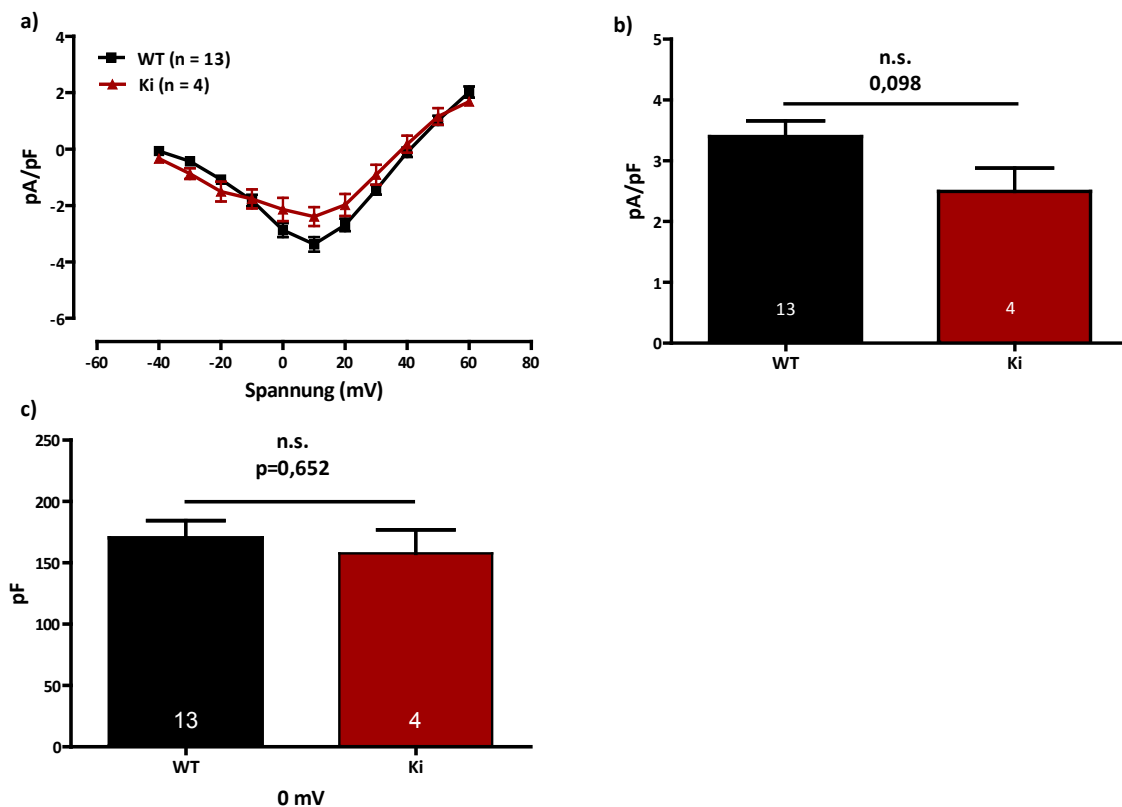


Abbildung 4-22 Messung von Calciumströmen in ventrikulären Myozyten von WT- und homozygoten  $Ca_v\beta_2STOP$ -Mäusen (Ki); (a) durchschnittliche ( $\pm$ SEM) Strom-Spannungs-Beziehung; (b) durchschnittliche Stromdichte und (c) durchschnittliche Kapazität der Kardiomyozyten

## 4.2 Analyse des Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Interaktoms

### 4.2.1 OneStrepTag

Der OneStrepTag wurde von der Firma IBA (Göttingen) für die Affinitätsaufreinigung von Fusionsproteinen entwickelt und besitzt eine Peptidsequenz, die zwei hochspezifische Bindungssequenzen für StrepTactin, eine Linker-Region vor und zwischen den Bindungssequenzen und zwei Stop-Codons am 5'Ende beinhaltet (Abbildung 4-23). Der OneStrepTag hat eine Größe von 3,3 kDa. Im Rahmen der Arbeit wurde die OneStrepTag-Sequenz mit zwei BamHI-Schnittstellen versehen, von der Firma MWG synthetisiert und in den Klonierungsvektor pcR2.1 ligiert. Für das Klonieren der verschiedenen Expressionsvektoren und des Gtargetingvektors konnte der OneStrepTag aus dem Klonierungsvektor geschnitten und C-Terminal an cDNA bzw. an genomische DNA fusioniert werden.

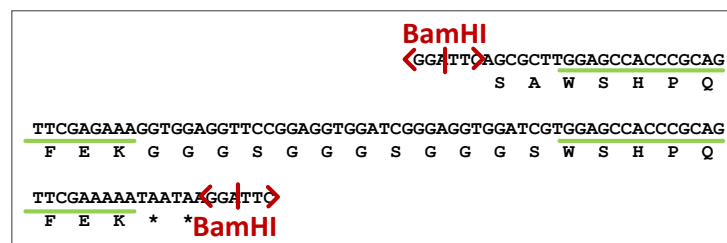


Abbildung 4-23 Sequenz OneStrep-Tag mit BamHI-Schnittstellen; spezifische OneStrepTag-Sequenzen (grün), linker Bereiche SA und (GGG)<sub>3</sub>

### 4.2.2 Überexpression von GST-Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Fusionsproteinen

Die Überexpression des Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-OneStrep-Tag-Konstrukts im pGEX-Plasmid mit anschließender Aufreinigung über GST-Sepharose hat zum Ziel, ein reines Fusions-Protein zu erhalten, an dem der Strep-Tag spezifische monoklonale Antikörper StrepMAB-Classic HRP und StrepTactin HRP getestet werden können. Desweiteren ist zu testen, ob mit den OneStrep-Tag spezifischen Detektionen das aufgereinigte Fusionsprotein in Herzmatrix ohne unspezifische Nebenbanden nachgewiesen werden kann.

#### 4.2.2.1 Klonieren des GST- Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Fusionsproteins

Die für die Versuche verwendete Kaninchen-cDNA (*Oryctolagus cuniculus*) der kardialen Calciumkanal-Untereinheit Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub> wurde über die Restriktionsstellen BamHI und NotI in das Expressionsplasmid pGEX-6P-1 (Amersham) kloniert und für die Folgeversuche verändert.

Das Ziel war das Einfügen der OneStrep-Tag-Sequenz, die am 5'- und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle enthält. Hierfür wurde zunächst mittels QuikChange II Site-directed Mutagenese die bereits vorhandene BamHI-Schnittstelle durch eine HindIII-Schnittstelle ersetzt. Mit demselben Protokoll wurde das Stop-Codon TGA am Ende von Exon 14 entfernt und durch eine neue BamHI-Schnittstelle ersetzt. Anschließend wurde der OneStrep-Tag über die neu eingefügte BamHI-Schnittstelle an die  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit ligiert (Abbildung 4-24). Die Ligation des OneStrep-Tags in das pGEX- $\text{Ca}_v\beta_2$ \_HindIII\_BamHI-Konstrukt mit T4-DNA-Ligase wurde durch den Restriktionsverdau mit BamHI-HF und mittels Sequenzanalyse überprüft. Die Sequenzanalyse ist notwendig, da mit Hilfe des Restriktionsverdaus nur eine Aussage über die Integration, nicht jedoch über die Orientierung des OneStrep-Tags oder eine mögliche Mehrfachintegration getroffen werden kann.

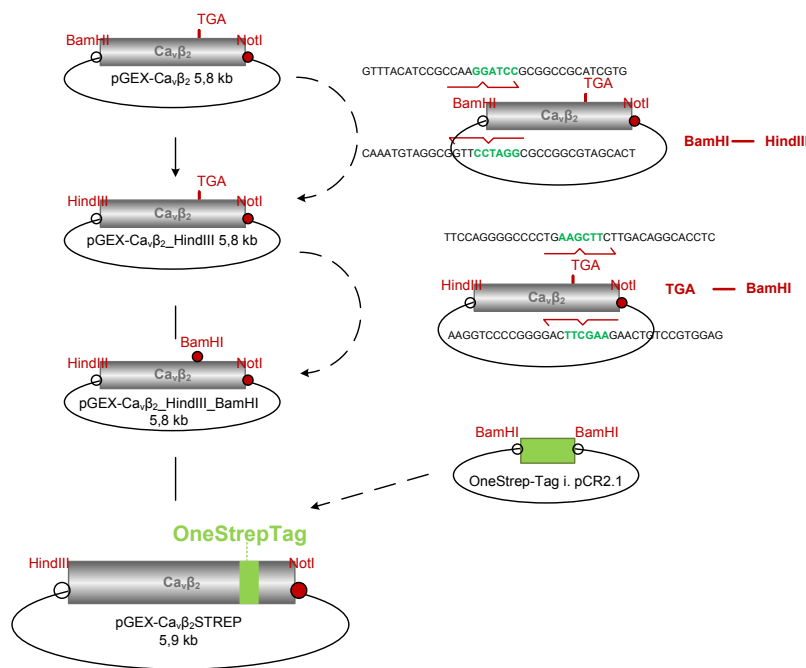


Abbildung 4-24 Klonierung des pGEX- $\text{Ca}_v\beta_2$ Strep-Konstruktes; nach Einführung von HindIII und BamHI-Schnittstelle in das pGEX-Konstrukt erfolgt die Verknüpfung mit dem OneStrep-Tag

Der Restriktionsverdau und die anschließende Visualisierung mittels PAGE-Gel bestätigten die Insertion des Tags in das pGEX-Konstrukt; die erwartete 100 bp große Bande konnte nachgewiesen werden. Die richtige Orientierung und die einfache Integration des Tags wurde mit dem Sequenzierprimer pGEX\_re überprüft und bestätigt (Abbildung 4-25). Nach vollständiger Überprüfung wurde das Plasmid für die IPTG-induzierte Überexpression in BL21-Zellen eingesetzt.

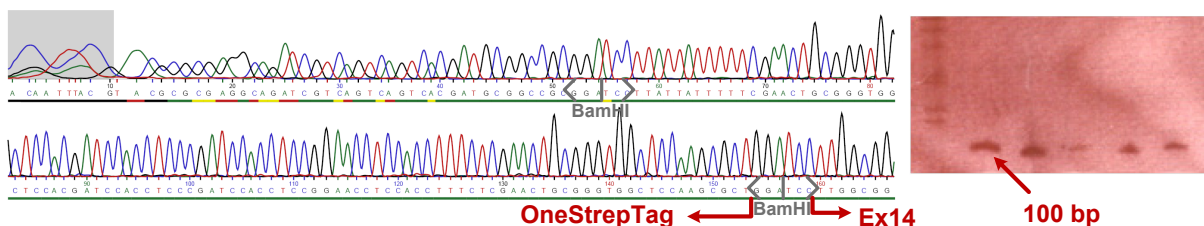


Abbildung 4-25 Restriktions- und Sequenzanalyse des pGEX- $\text{Ca}_v\beta_2$ Strep-Konstruktes; Bestätigung der einfachen Integration mit richtiger Orientierung; der Restriktionsverdau mit BamHI-HF zeigt die erwartete 100 bp-Bande

#### 4.2.2.2 Detektion des Fusionsproteins im Herzlysat

Für die Detektion des Fusionsproteins im Herzlysat wurde das überexprimierte und aufgereinigte GST-Fusionsprotein mit 40 µg Herzprotein in verschiedenen Verdünnungen gemischt. Das Herzprotein stammte aus einer Membranpräparation von Wildtyp Bl/6N-Mäusen. Im Kontrollversuch wurde WT-Herzprotein mit dem gereinigten, nicht getaggen Wildtyp pGEX-Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Konstrukt gemischt. Es wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt und das geblottete Protein über Nacht bei 4°C geblockt. Die Detektion erfolgt am nächsten Tag mittels StrepTactin HRP und StrepMAB-Classic HRP. Die zu erwartende Größe war 115 kDa (75 kDa Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Protein + 40 kDa GST-Protein).

Es konnte gezeigt werden, dass StrepTactin HRP bis in sehr hohe Verdünnungen das pGEX-Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-OneStrepTag-Fusionsprotein detektieren kann. Die Detektion mit StrepTactin HRP zeigte jedoch sowohl in Kontroll- als auch unter Versuchsbedingungen unspezifische Proteindetektionen in der Herz-Membranpräparation. Der Antikörper StrepMAB-Classic HRP hingegen detektierte spezifisch das OneStrepTag-Fusionsprotein; es wurde nur die Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit ohne unerwünschte Nebenbanden detektiert (Abbildung 4-26).

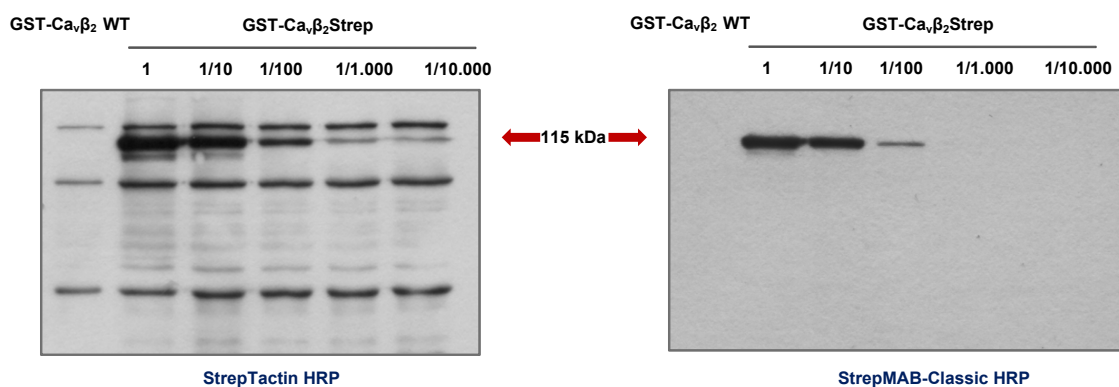


Abbildung 4-26 Detektion von GST-Fusionsproteinen Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>WT und GST-Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>Strep-Tag in der Herzmembranfraktion mit StrepTactin HRP und StrepMAB-Classic HRP bei steigender Verdünnung des induziert-überexprimierten, aufgereinigten OneStrep-Tag-Fusionsproteins

#### 4.2.3 OneStrep-Tag Fusionsexperimente: *in vitro* Vorversuche in HEK293T-Zellen

##### 4.2.3.1 Herstellung des Expressionsplasmids Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP in pcDNA3

Die für die Versuche verwendete Kaninchen-cDNA (*Oryctolagus cuniculus*) der kardialen Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit wurde über die Restriktionsstellen HindIII und EcoRI in das Expressionsplasmid pcDNA3 kloniert und für die Folgeversuche verändert. Desweiteren wurde Kaninchen-cDNA des Glattmuskelspezifischen Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals verwendet, die über die Restriktionsstelle HindIII in das Expressionsplasmid pcDNA3 kloniert wurde.

Für das Einführen der OneStrep-Tag-Sequenz wurde das Stop-Codon TGA am Ende von Exon 14 entfernt und durch eine BamHI-Schnittstelle ersetzt. Das Einführen der BamHI-Schnittstelle erfolgte



über das QuikChange II Site-directed Mutagenese Protokoll. Anschließend wurde der OneStrep-Tag, der am 5'-Ende sowie am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle besitzt, an die Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit fusioniert (Abbildung 4-27).

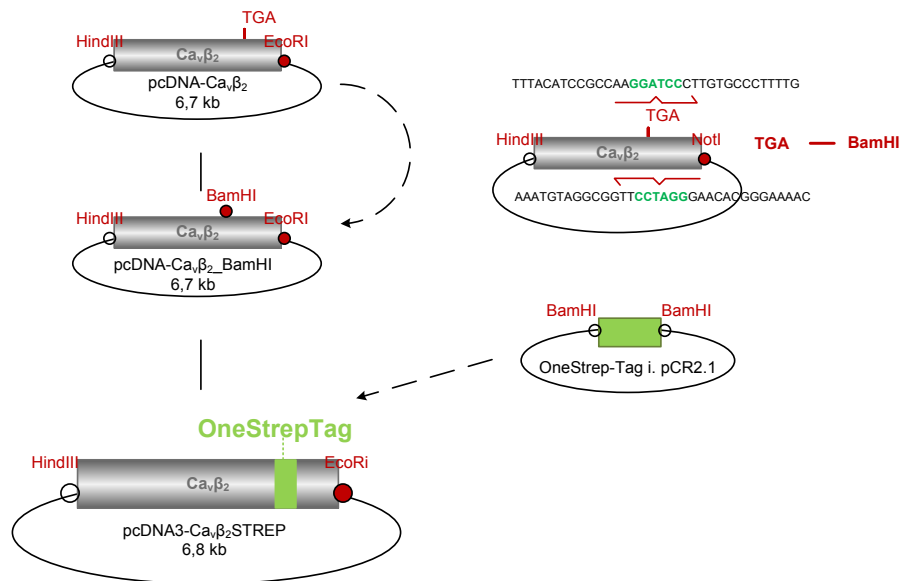


Abbildung 4-27 Klonierung des pcDNA3-Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>Strep-Konstruktes; nach Einführung der BamHI-Schnittstelle in das pcDNA3-Konstrukt erfolgt die Verknüpfung mit dem OneStrep-Tag

Die Insertion und richtige Orientierung des eingefügten Tags wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzanalyse überprüft. Durch den Restriktionsverdau mit BamHI-HF konnte die Insertion des 100bp-großen OneStrep-Tags nachgewiesen werden. OneStrep-Tag positive Klone wurden auf richtige Orientierung und einfache Integration des Tags überprüft. Dazu wurde eine Sequenzanalyse mit dem Sequenzierprimer pcDNA3\_re durchgeführt. Die erfolgreiche einfache Integration und die richtige Orientierung sind in Abbildung 4-28 dargestellt.

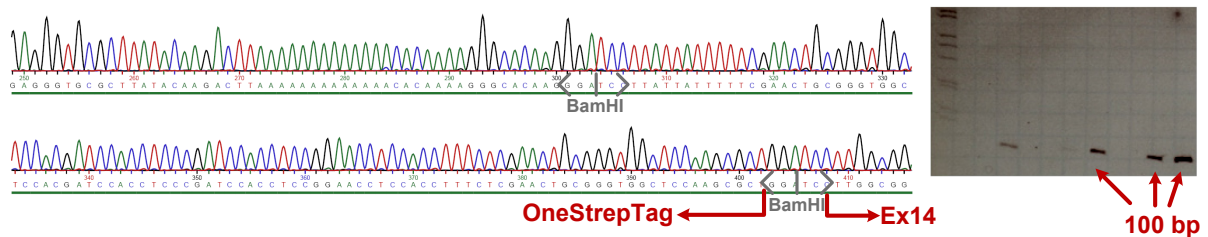


Abbildung 4-28 Restriktions- und Sequenzanalyse der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>Strep-Sequenz i.pcDNA3; Bestätigung der einfachen Integration mit richtiger Orientierung; der Restriktionsverdau mit BamHI-HF zeigt die erwartete 100 bp-Bande

#### 4.2.3.2 Etablieren der Aufreinigung und Detektion des OneStrepTag-Konstrukts

Für die spätere Analyse des Interaktoms der  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STREP}$ -Maus wurden die Batchaufreinigung und die Detektionsmethoden etabliert. Dazu wurde das HEK293T-Überexpressionssystem genutzt. Das  $\text{Ca}_v\beta_2\text{Strep}$ -Expressionsplasmid wurde zusammen mit dem  $\text{Ca}_v1.2$ -Expressionsplasmid in HEK293T-Zellen co-transfiziert um die Funktionalität der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit anhand der Membranexpression der  $\text{Ca}_v1.2$ -Untereinheit abzusichern. Die transfizierten HEK293T-Zellen wurden mit TrisSDS-Puffer aufgeschlossen, die Proteinkonzentration bestimmt und die Proteine mittels Westernblot auf einer Membran fixiert. Die Detektion der getaggten  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit erfolgte mit dem  $\text{Ca}_v\beta_2$ -spezifischen Antikörper  $\text{AntiCa}_v\beta_{2v2}$ , mit dem OneStrepTag-spezifischen Antikörper StrepMAB-Classic HRP und mit StrepTactin HRP. Der  $\text{Ca}_v1.2$ -Calciumkanal wurde mit einem Antikörper gegen  $\text{Ca}_v1.2$  detektiert.

##### Detektion

Die Detektion mit StrepMAB-Classic HRP und StrepTactin HRP zeigte eindeutig die 75 kDa-große  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit, wobei mit StrepTactin HRP auch unspezifische Banden detektiert wurden. Diese Nebenbanden konnten mit StrepMAB-Classic HRP nicht festgestellt werden, was für die hohe Spezifität des Antikörpers spricht. Die Detektion mit  $\text{AntiCa}_v\beta_{2v2}$  zeigte das  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Protein mit den Antikörper-spezifischen Nebenbanden. Die Detektion der  $\text{Ca}_v1.2$ -Untereinheit erfolgt bei 270 kDa mit dem Antikörper  $\text{AntiCa}_v1.2$ . Um die Spezifität der Detektionsmöglichkeiten zu testen und von HEK293T-spezifische Nebenbanden zu unterscheiden, sind untransfizierte HEK293T-Zellen im direkten Vergleich zu transfizierten HEK293T-Zellen ( $\text{Ca}_v\beta_2 + \text{Ca}_v1.2$ ) in Abbildung 4-29 dargestellt.

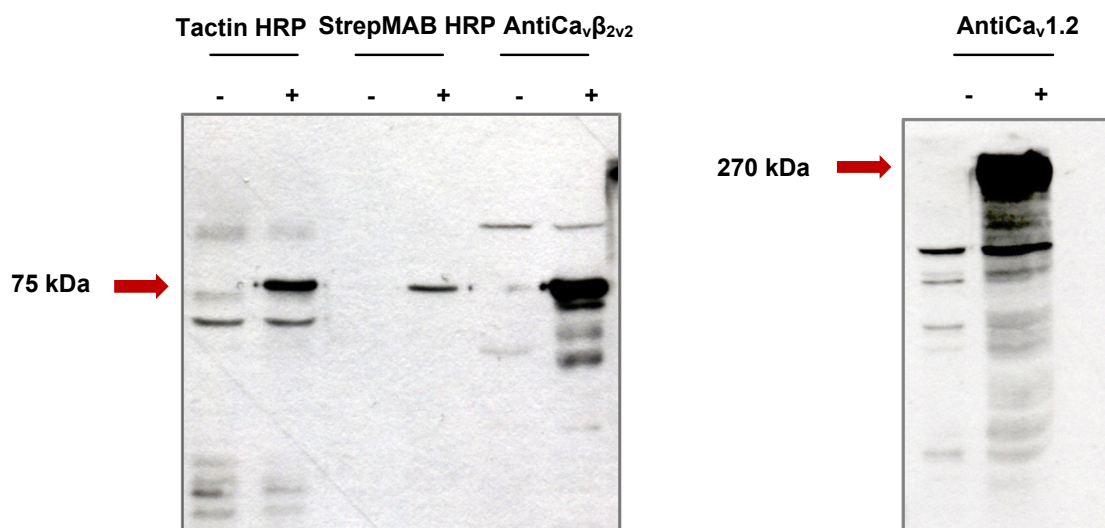


Abbildung 4-29 Expression und Detektion von  $\text{Ca}_v\beta_2\text{Strep}$ - und  $\text{Ca}_v1.2$ -Protein in HEK293T-Zellen; Detektion mit StrepTactin HRP, StrepMAB-Classic HRP,  $\text{AntiCa}_v\beta_{2v2}$  und  $\text{AntiCa}_v1.2$ , -: untransfizierte HEK293T-Zellen, +: HEK293T-Zellen transfiziert mit  $\text{Ca}_v\beta_2\text{Strep}$  und  $\text{Ca}_v1.2$

### Aufreinigung

Die Aufreinigung des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Interaktoms in HEK293T-Zellen mittels StrepTactinSuperflow-Matrix wurde im Batchverfahren getestet. HEK293T-Zellen, transfiziert mit  $\text{Ca}_v1.2$  und  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Strep bzw.  $\text{Ca}_v\beta_2$ , wurden mit PET-Puffer aufgeschlossen, die Proteinkonzentration bestimmt und das Interaktom der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Strep-Untereinheit von nicht interagierenden Proteinen über StrepTactinSuperflow-Matrix getrennt. Das Protokoll zur Batch-Aufreinigung wurde am Protokoll der Firma IBA angelehnt und auf die Bedingungen für Membranproteine angepasst. In Abbildung 4-30 ist die Detektion mit Anti $\text{Ca}_v\beta_{2v2}$  nach Batchaufreinigung dargestellt. Durch die Batchaufreinigung konnten nur in den Versuchsansätzen mit getagtem  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Strep-Expressionsvektor das  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Protein mit dem Antikörper Anti $\text{Ca}_v\beta_{2v2}$  nachgewiesen werden. Somit konnte der OneStrep-Tag und das daran gebundene Interaktom spezifisch aus der Proteinlösung isoliert werden. Es waren kaum unspezifische Banden detektierbar, was zusätzlich für eine hohe Spezifität spricht.

Im gleichen Versuchsaufbau wurde getestet, ob bei der Aufreinigung der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Strep-Untereinheit die Interaktion mit der  $\text{Ca}_v1.2$ -Untereinheit gestört ist bzw., ob die  $\text{Ca}_v1.2$ -Untereinheit mit der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -OneStrep-Untereinheit co-präzipitiert werden kann. Die  $\text{Ca}_v1.2$ -Untereinheit konnte nur nach Co-Expression mit  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Strep nachgewiesen werden; die Co-Expression mit der ungetaggen  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit und StrepTactinSuperflow-Aufreinigung führte zu keiner Detektion. Damit konnte gezeigt werden, dass die OneStrep-Tag-Aufreinigung spezifisch für getaggte Proteine ( $\text{Ca}_v\beta_2$ -Strep) und deren gebunden Interaktionspartner ( $\text{Ca}_v1.2$ ) ist. Die Aufreinigung ist geeignet für Isolation und Aufreinigung von Proteinen aus HEK293T-Überexpressionsversuche. Für die *in vivo*-Isolation ( $\text{Ca}_v\beta_2$ STREP-Mauslinie) müssen die Isolation des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Strep-Proteins und das Aufreinigungsprotokoll an die komplexeren Bedingungen im Mausmodell adaptiert werden.

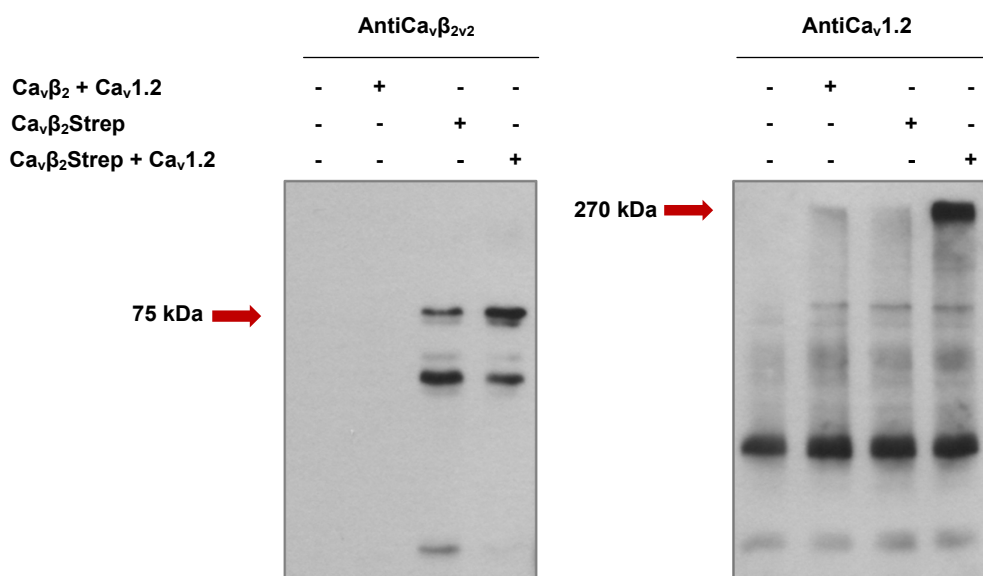


Abbildung 4-30 Aufreinigung von  $\text{Ca}_v\beta_2$ Strep über StrepTactinSuperflow nach Überexpression in HEK293T-Zellen; Überexpression von WT- $\text{Ca}_v\beta_2$  und  $\text{Ca}_v\beta_2$ Strep zusammen mit  $\text{Ca}_v1.2$ ; Detektion mit Anti $\text{Ca}_v\beta_{2v2}$ ; Co-Immunpräzipitation von  $\text{Ca}_v1.2$ , Detektion mit Anti $\text{Ca}_v1.2$

## 4.3 Generierung der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Mauslinie

### 4.3.1 Gentargetingstrategie

Ziel war das Generieren einer Mauslinie, die ein getaggttes *CACNB2* Gen besitzt. Die Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Mauslinie soll das Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Strep-Protein im ganzen Körper exprimieren, um so die *in vivo* Analyse des Interaktoms der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit in verschiedenen Geweben zu ermöglichen. Dazu wurde der Affinitätsaufreinigungs-Tag OneStrep-Tag carboxy-terminal an das *CACNB2* Gen fusioniert, d.h. der OneStrep-Tag wurde an das letzte Exon des *CACNB2* Gens (Exon 14) *in frame* ligiert. Um die Expression des Tags *in vivo* zu ermöglichen, musste dazu das ursprüngliche Stop-Codon der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit entfernt und durch eine Schnittstelle ersetzt werden, die für Ligation des OneStrep-Tags an die Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Untereinheit dient. Die Expression des Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Proteins wird durch die beiden Stop-Codons am Ende der OneStrepTag-Sequenz terminiert. Für das Klonieren des STREP-Gentargetingvektors konnten die Zwischenvektoren, die zum Generieren der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STOP-Mauslinie hergestellt wurden (teilweise modifiziert) verwendet werden. Wie bereits für das STOP-Gentargetingkonstrukt beschrieben, wurde ein Vektor geplant, der im 5'-Arm Exon 13 und im 3'-Arm Exon 14 (inklusive der erwünschten Mutationen) enthält. Der 5'-Arm bestand neben Exon 13 zusätzlich aus intronischen DNA-Sequenzen und war 1,6 kb groß, der 3'-Arm besaß neben Exon 14 und dem OneStrep-Tag nicht codierende 3'-UTR und hatte eine Größe von 5,8 kb. Für die Konstruktion wurden Zwischenvektoren und Restriktionsschnittstellen verwendet, die bereits für das Klonieren des STOP-Gentargetingvektors hergestellt wurden. Lediglich der Exon 14 enthaltende Zwischenvektor wurde modifiziert und der OneStrep-Tag anstelle des Stop-Codons eingefügt. Das Ensembl Gen ENSMUST00000114723 wurde für das Überprüfen der Sequenzen von Zwischenvektoren und Endvektor verwendet. Über die Schnittstellen NotI, BamHI, ClaI und Acc65I wurden die Fragmente aus den Zwischenvektoren in das Vektorrückgrat des Gentargetingvektors (pBlue-loxP-NeoTK-loxP-Vektor) eingefügt. In Abbildung 4-31 ist die hier verwendete Gentargetingstrategie dargestellt.

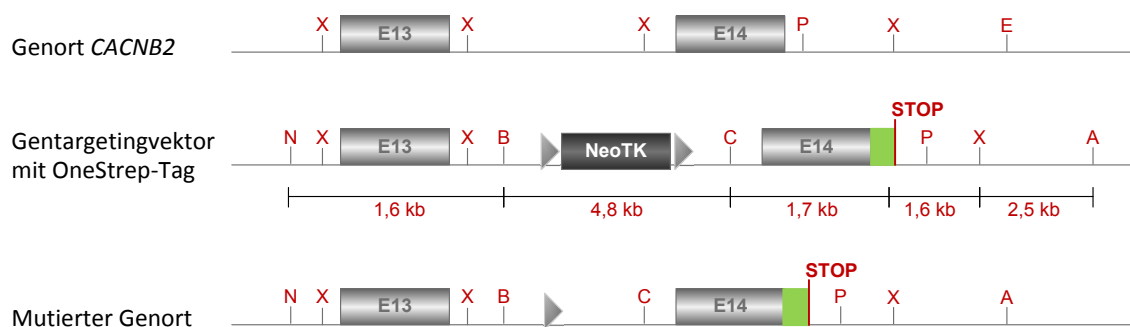


Abbildung 4-31 Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Gentargetingstrategie: Genort *CACNB2* mit natürlichen Schnittstellen, Exon 13 und Exon 14; Gentargeting Vektor mit eingefügter Selektionskassette, Veränderungen in Exon 14 und veränderten Restriktionsstellen; Mutierter Genort nach homologer Rekombination und Entfernen der Selektionskassette - Exon 14 enthält *in frame* die OneStrep-Tag-Sequenz und wird durch zwei Stop-Codons terminiert

#### 4.3.1.1 Herstellung des Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Gentargetingkonstrukts

Für die Herstellung des Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Gentargetingkonstrukts wurden das 5'Arm-Fragment in pBI-loxP-NeoTK-loxP und die Zwischenvektoren pBI(PstI-XhoI) und pBI(XhoI-Acc65I) (Abbildung 4-33 -3, -4), die für die Klonierung des Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-STOP-Konstrukts bereits hergestellt wurden, verwendet. Lediglich der Zwischenvektor, der Exon 14 enthält, pBI(ClaI-PstI), wurde verändert. Anschließend wurden die Zwischenvektoren in das Vektor-Rückgrat pBI-loxP-NeoTK-loxP eingefügt. Das Vorgehen ist schematisch in Abbildung 4-33 dargestellt.

##### Zwischenvektor pBI(ClaI-PstI)OneStrep

Der Exon 14 enthaltende Zwischenvektor pBI(XbaI-PstI) wurde aus der PCR-Reaktion mit XbaI\_for und PstI\_re und der anschließenden Ligation in den pBluescript-Vektor hergestellt. Mit dem QuikChange II Mutagenese Kit wurde durch Verwendung der Mutationsprimer quikInsertCla\_for und quikInsertCla\_re eine ClaI-Schnittstelle in das Fragment 3' hinter die natürlich vorkommende XbaI-Schnittstelle eingefügt. Über diese ClaI-Schnittstelle wurde der 3'-Arm später in das Gentargetingkonstrukt eingefügt. Mit Hilfe einer weiteren QuikChange-Mutation und den Primern quikInsertBamHI\_for und quikInsertBamHI\_re wurde das Stop-Codon TGA am 3'-Ende von Exon 14 durch eine BamHI-Schnittstelle ersetzt (Zwischenvektor pBI(ClaI-PstI)\_BamHI). Diese BamHI-Schnittstelle ist für das Anfügen des OneStrep-Tags an Exon 14 notwendig: durch Restriktionsverdau von pBI(ClaI-PstI)\_BamHI und OneStrep-Tag in pCR2.1 mit dem Enzym BamHI-HF und Verknüpfen der Fragmente mit T4 DNA-Ligase entstand der Vektor pBI(ClaI-PstI)OneStrep, der das getaggte Exon 14 enthält (Abbildung 4-32).

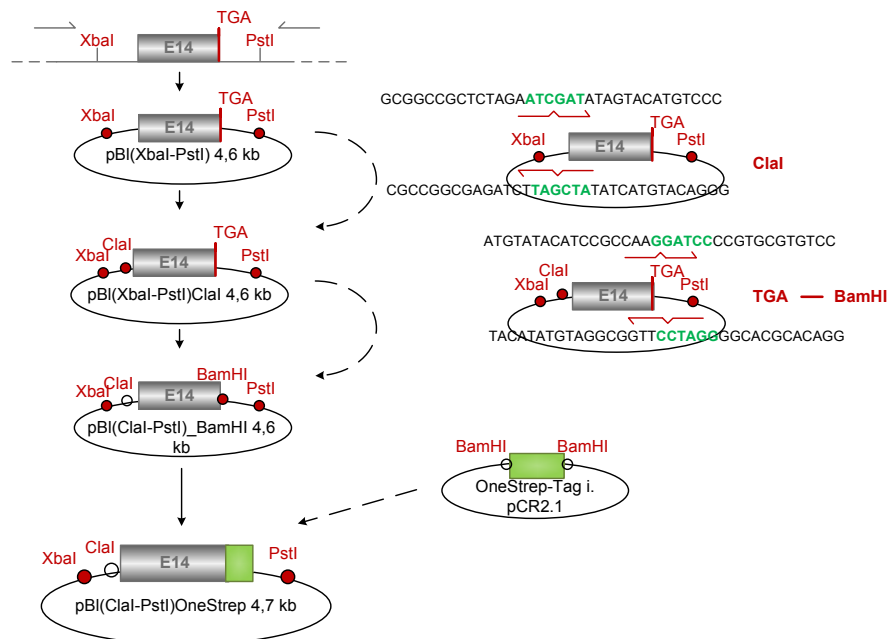


Abbildung 4-32 Einfügen der OneStrep-Sequenz an Exon 14 der genomischen Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-DNA-Sequenz

### 3'Arm-Fragment

Für das Klonieren des 3'Arms wurde der Zwischenvektor pBI(PstI-XhoI) mit PstI und XhoI verdaut und 3' von dem veränderten Exon 14 in den Zwischenvektor wird pBI(ClaI-PstI)OneStrep ligiert. Es entstand das 6,3 kb große Fragment pBI(ClaI-XhoI)OneStrep. Durch Restriktionsverdau mit XhoI und Acc65I wurde das DNA-Fragment aus dem Zwischenvektor pBI(XhoI-Acc65I) geschnitten und in den Zwischenvektor pBI(ClaI-XhoI)OneStrep eingefügt. Dadurch war das 3'Arm-Konstrukt mit einer Größe von 8,8 kb (5,8 kb + 3 kb pBluescript) komplett und wurde für die Endligation verwendet.

### Endligation des Gentergetingkonstrukts

Abschließend erfolgte das Verknüpfen des 3'Arms (5,8 kb) mit dem 5'Arm in pBlue-loxP-NeoTK-loxP (9,4 kb): Nach Restriktionsverdau mit ClaI und Acc65I wurde das 3'Arm-Konstrukt 3' hinter die loxP-NeoTK-loxP-Sequenz ligiert. Das Gentergetingkonstrukt hatte eine Größe von 15,3 kb (Abbildung 4-33).

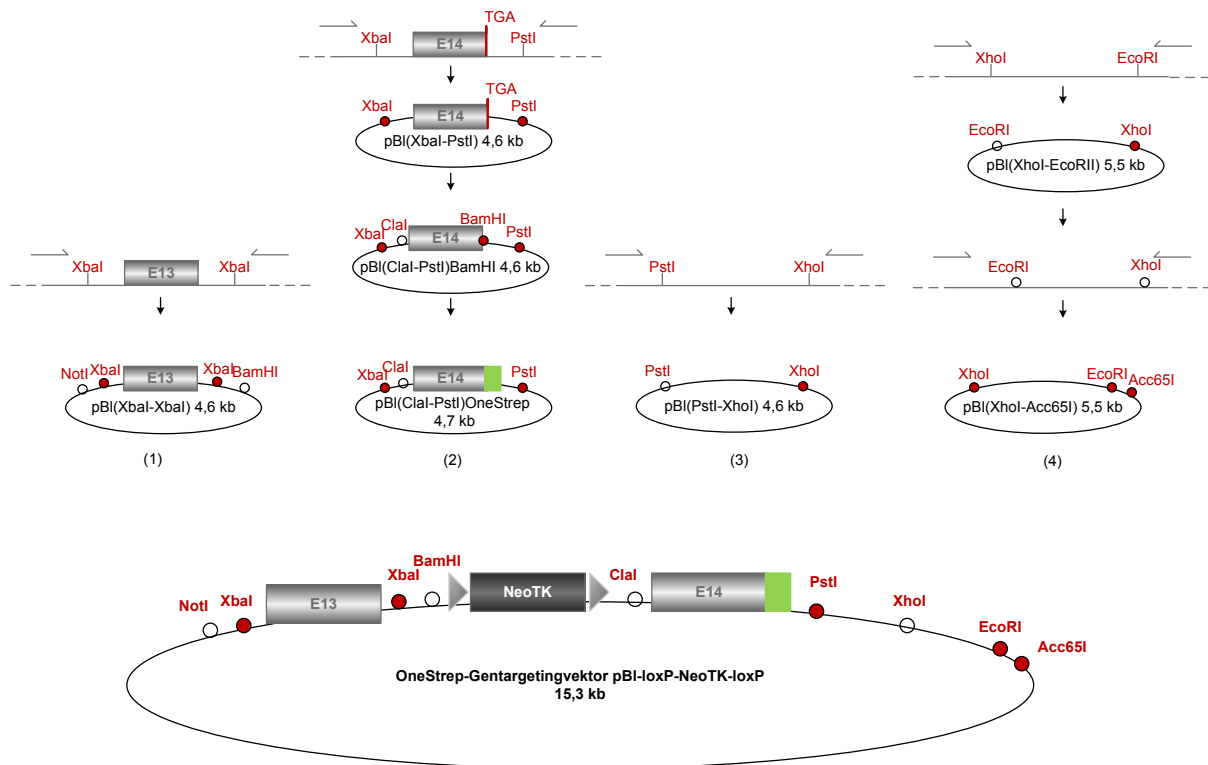


Abbildung 4-33 Klonierung des  $Ca_v\beta_2$ STREP-Gentergetingkonstrukts

#### 4.3.1.2 Überprüfung des Gentergetingkonstrukts

Mit Hilfe von Restriktionsanalyse und der Sequenzierung wurde das  $Ca_v\beta_2$ STREP-Gentergetingkonstrukt auf Vorhandensein der Schnittstellen und auf unerwünschte Mutationen untersucht. Mit der Sequenzanalyse wurden zusätzlich die Position und die Sequenz des OneStrep-Tags überprüft: Die OneStrep-Tag-Sequenz muss *in frame* mit Exon 14 der  $Ca_v\beta_2$ -Sequenz liegen, es

dürfen keine Mutationen im OneStrep-Tag enthalten sein und die terminierenden Stop-Codons TAA/TAA müssen vorhanden sein.

### Sequenzanalyse

Das Gentergetingkonstrukt wurde durch Sequenzanalyse auf Richtigkeit und unerwünschte Mutationen überprüft. Entscheidend ist, dass keine Punktmutationen in Exon 14 enthalten sind und dass die OneStrep-Tag-Sequenz *in frame* vorliegt. Der Gentergetingvektor erfüllte diese Anforderungen und konnte für die Veränderung von murinen ES-Zellen durch homologe Rekombination verwendet werden (Abbildung 4-34).

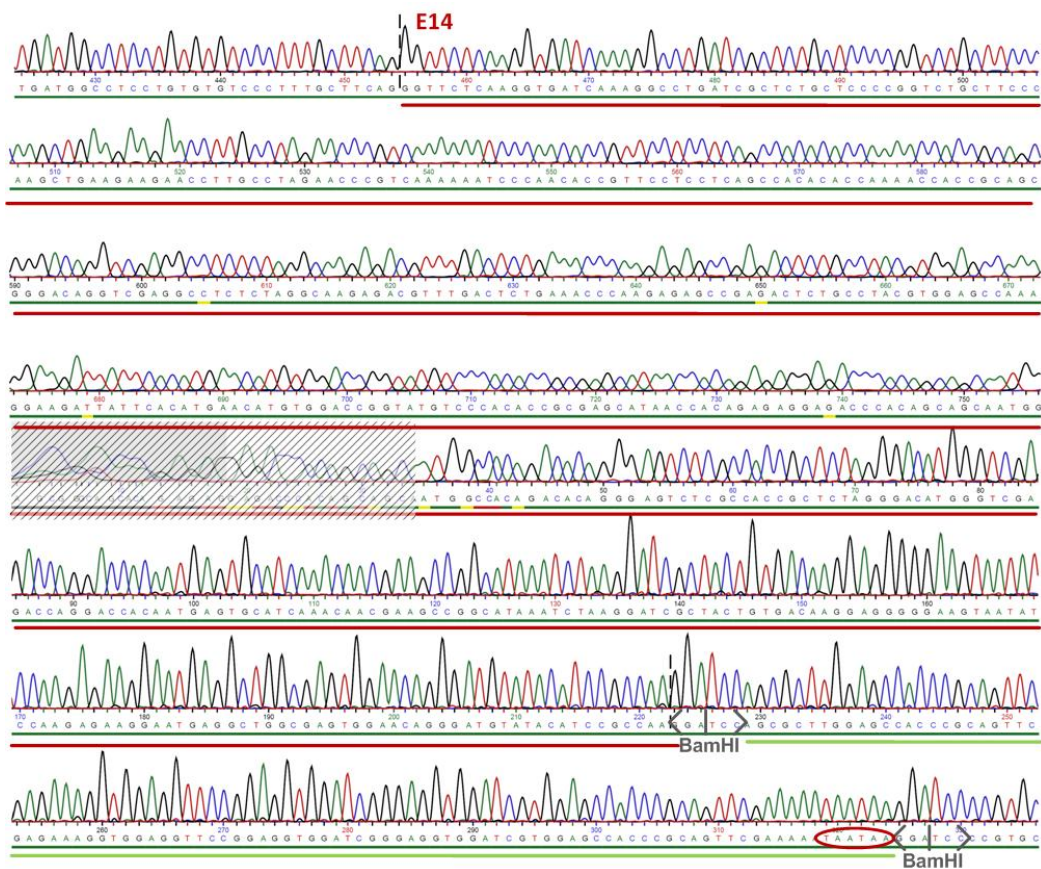


Abbildung 4-34 Sequenzanalyse des  $Ca_v\beta_2$ -STREP Gentergetingkonstruks: Exon 14 (rote Linie), OneStrepTag (grüne Linie) über BamHI-Schnittstellen *in frame* an Exon 14 fusioniert; zwei Stop-Codons (roter Kreis) beenden das  $Ca_v\beta_2$ -OneStrepTag-Konstrukt

### Restriktionsanalyse

Durch die Restriktionsanalyse wurde die Größe der einzelnen Fragmente im Gentergetingkonstrukt überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass alle Fragmente in richtiger Größe enthalten waren (Abbildung 4-35).

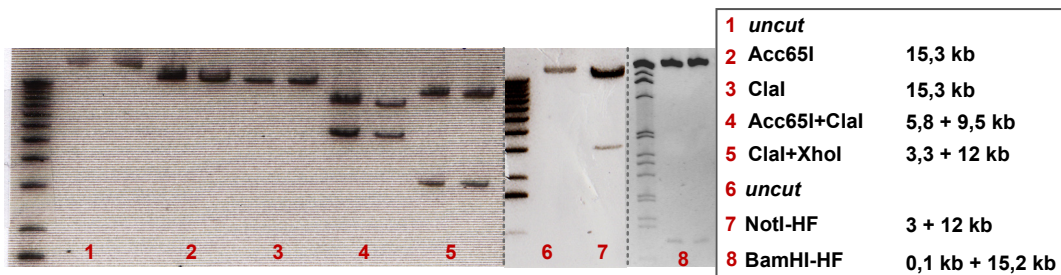


Abbildung 4-35 Restriktionsanalyse des STREP-Gentargetingvektors; die Nummern bezeichnen die verwendeten Restriktionsenzyme/-Kombinationen, die Größen der Fragmente sind tabellarisch dargestellt

### 4.3.2 Gentargeting mittels homologer Rekombination

Für das Targeting wurden 15 µg des mit Acc65I linearisierten Gentargetingvektors in embryonale Stammzellen (R1, Passage15) elektroporiert und auf 12 Feeder-Petrischalen verteilt. Nach 24 h wurde die Positiv-Selektion in G418-haltigem ES-Medium begonnen. Während der Selektionsphase mit erhöhtem Zellsterben wurde zweimal täglich das Kulturmedium gewechselt. An Tag 9 wurden die ersten ES-Zellkolonien isoliert. Insgesamt wurden an vier Folgetagen 640 Klone vereinzelt und in 96-well-Platten vermehrt. Die Masterplatte wurde bei 70 %iger Konfluenz mit DMSO-haltigen Einfriermedium bei -80 °C gelagert, die Screening-Platten bei vollständiger Konfluenz geerntet und auf richtige Integration des Gentargetingkonstrukts ins ES-Zellgenom untersucht.

#### 4.3.2.1 Untersuchung der ES-Zellklone

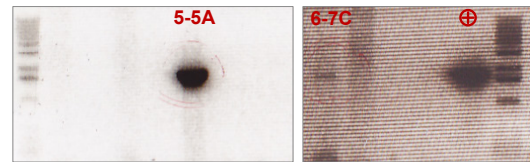
Die ES-Zellklone, die die G418-Selektion überlebt haben, tragen die Selektionskassette und somit das Gentargetingkonstrukt im Genom. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob das Konstrukt nur einmal und an der richtigen Stelle integriert wurde, wurden zunächst alle Klone mittel PCR-Screening überprüft. Positive Klone aus dem PCR-Screening wurden mittels Southern-Screening bestätigt.

##### PCR-Screening

Für das PCR-Screening wurde eine Strategie verwendet, bei der ein Primer 5' außerhalb des DNA-Bereichs, der für die Herstellung des Gentargetingkonstrukt verwendet wurde, liegt (*forward*-Primer, StrepPCRScr1\_for). Ein weiterer Primer liegt auf der Neo-Kassette (*reverse*-Primer, Neo1\_re). So konnte nur dann ein PCR-Produkt entstehen, wenn die Rekombination an der richtigen Stelle im Genom erfolgt war. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 1,7 kb (Abbildung 4-36). Es konnte bei 3 der 640 Klone das PCR-Produkt amplifiziert werden (Klone 2-5C, 5-5A und 6-7c). Diese Klone wurden weiter mit Sequenzanalyse und Southern-Blot überprüft.



Rekombination an richtiger Stelle: PCR-Produkt 1,7 kb



Wildtyp/Rekombination nicht an richtiger Stelle erfolgt: kein PCR-Produkt

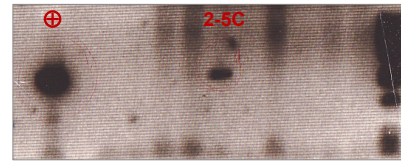
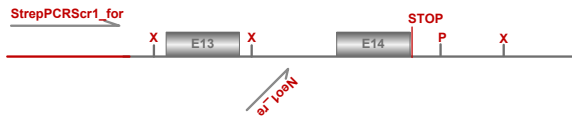


Abbildung 4-36 StrepPCR-Strategie und positive ES-Klone; bei richtiger Integration ins Genom ergibt sich ein PCR-Produkt mit der Größe 1,7 kb, (rote Linie: Bereich außerhalb des Gentargetingvektors); rechts: positive ES-Zellklon, +: positiv Kontrolle

### Southern-Screening

Die PCR-positiven ES-Zellklone wurden mittels Southern-Blot bestätigt. Um auszuschließen, dass eine Mehrfach-Integration stattgefunden hat, wurde eine DNA-Sonde verwendet, die auf der Neo-Resistenzkassette bindet (Neo-Sonde). Durch einen geeigneten Restriktionsverdau mit BspHI wurden die ES-Zell-DNA 5' vor dem rekombinierten Bereich und 3' hinter der Neo-Sonde geschnitten. Durch die Lage der Restriktionsschnittstelle 5' vor dem rekombinierten Bereich kann die Integration an der richtigen Stelle im Genom nachgewiesen werden. Das von der Neo-Sonde erkannte Fragment hat eine Größe von 3,9 kb und wird bei einfacher Integration als einziges Signal auf dem Blot sichtbar. Als Positiv-Kontrolle wurde der Klon 2H2B aus dem STOP-Gentargeting verwendet. In Abbildung 4-37 ist die richtige und einfache Integration der Klone 2-5C und 5-5A dargestellt. Klon 6-7C ergab ein ca. 4,5 kb großes Produkt und wurde nicht weiter für die Manipulation der Blastozysten und der Generierung der Mauslinie verwendet.

Neo-Southern: BspHI-Cut, 3,9 kb-Fragment

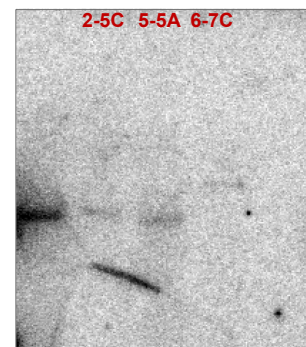
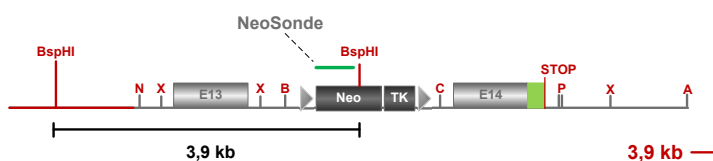


Abbildung 4-37 Southernblot-Strategie und positive ES-Klone: BspHI-Verdau, NeoSonde detektiert 3,9 kb-Fragment, rechts: positiv-Kontrolle, Klon 2H2B (15 µg)

#### 4.3.2.2 Sequenzanalyse der positiven ES-Zellklone

Mit Southern- und PCR-Screening konnten die richtige und einfache Integration nachgewiesen werden. Durch die Sequenzanalyse wurde überprüft, ob die Mutation im Genom an der richtigen Stelle vorhanden ist. Mit der Primerkombination Check1\_for (Bindung auf der 3'loxP-Sequenz) und

3'ArmScr10\_re (Bindung 3' hinter Exon 14) wurde der 3'-Arm mittels PCR amplifiziert (Phusion™HF-Polymerase) und anschließend sequenziert. Der OneStrepTag konnte bei den PCR- und Southern positiven ES-Zellklonen *in frame* mit Exon 14 nachgewiesen werden (Abbildung 4-38).

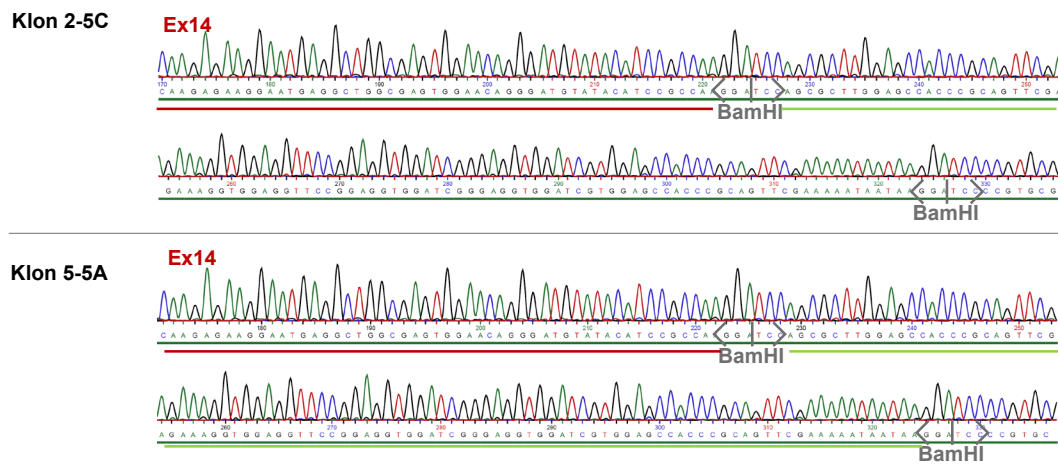


Abbildung 4-38 Sequenzanalyse der positiven OneStrepTag-ES-Zellklone; rote Linie: Exon 14; grüne Linie: OneStrepTag

### 4.3.3 Blastozysteninjektion

Aus dem ES-Zelltargeting gingen zwei positive ES-Zellklone (2-5C und 5-5A) hervor, welche in C57Bl/6N-Blastozysten injiziert wurden. In einer ersten Injektionsrunde wurden die Klone 2-5C und 5-5A an insgesamt 16 Tagen in 218 Blastozysten injiziert und in 20 CD1-Ammenmütter operiert. Es wurden aus nicht geklärten Umständen nur zwei der operierten Mäuse schwanger. Unter dem Nachwuchs befanden sich eine männliche Chimäre mit einem Chimärismus von ca. 80 % und eine weibliche Chimäre (ca. 30 %). Die männliche Chimäre wird mit C57Bl/6N-Weibchen verpaart. Aus dieser Verpaarung sollen Nachkommen entstehen, die die Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Untereinheit auf einem Allel tragen, d.h. heterozygot für diese Mutation sind. In einer zweiten Injektionsrunde soll die Injektion der positiven ES-Zellklone wiederholt werden.

## 5 Diskussion

Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration regulieren zahlreiche Prozesse, die von der Kontraktion von Muskelzellen bis zur Transkription von Genen reichen (Caterall, 2000). Ein wichtiger Modulator der Calciumionenkonzentration im Herzen ist der L-Typ Calciumkanal  $Ca_v1.2$ . Im adulten, murinen Herzen interagiert der  $Ca_v1.2$ -Kanal mit der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit, die den Transport des Kanals (Trafficking) vom ER an die Zelloberfläche und die funktionelle Anordnung des LTCCs in der Plasmamembran steuert (Bordin et al., 2010; Chien et al., 1995). Die Interaktion der  $Ca_v\beta_2$ - mit der  $Ca_v\alpha_1$ -Untereinheit kommt über den AID (*alpha interaction domain*)-ABP (*alpha binding pocket*)-Komplex zustande, der kristallographisch gut charakterisiert ist (Van Petegem et al., 2004). Fehlt diese Interaktion, kommt es *in vitro* zu einer fehlenden  $Ca_v1.2$ -Oberflächenexpression und damit korrelierend zu einem drastisch reduzierten Calciumeinstrom (Colecraft et al., 2002; Hullin et al., 2003; Nakayama et al., 2007; Pragnell et al., 1994).

Die Relevanz der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit für die Kanalexpression und den Calciumeinstrom *in vivo* konnte von Weissgerber et al. (2006) in einer  $Ca_v\beta_2$ -knock-out-Maus gezeigt werden: Die homozygoten Tiere sind nicht lebensfähig und sterben am embryonalen Tag 9,5 p.c. *in utero*. Grund für den Tod ist eine drastisch reduzierte Kontraktilität der Kardiomyozyten, mit stark reduzierter Pumpfunktion des Herzens und der daraus folgenden gehinderten Blutgefäßentwicklung. Das unzureichend ausgebildete Blutgefäßsystem führt zur Sauerstoffunterversorgung des Embryos und bedingt die Letalität. Die Vermutung, dass in diesen Tieren ein vermindertes LTCC-Trafficking stattfindet und nur wenige funktionale LTCC-Kanäle in die Kardiomyozyten eingebaut werden können, konnte durch elektrophysiologische Messungen bestätigt werden (Reduktion  $I_{Ca}$  um 60 %). Im Vergleich zum  $Ca_v\beta_2$ -knock-out stirbt der  $Ca_v1.2$ -knock-out erst an Tag 14,5 p.c. Diese Tatsache lässt vermuten, dass der knock-out des *CACNB2* Gens weitreichendere Folgen als der  $Ca_v1.2$ -knock-out hat. Abgesehen von der Interaktion mit der  $Ca_v1.2$ -Untereinheit im LTCC, könnten durch das Fehlen der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit weitere lebenswichtige Interaktionen in den  $Ca_v\beta_2$ -knock-out-Tieren gestört sein.

Mögliche Interaktionspartner der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit, die indirekt zur Reduktion des Calciumeinstroms führen könnten, sind kleine GTPasen der RGK-Proteinfamilie (Beguin et al., 2001; Correll et al., 2008; Flynn and Zamponi, 2011), das endozytotische Protein Dynamin (Gonzalez-Gutierrez et al., 2007a) und Phospholipase C (Beggren et al., 2004).  $Ca_v\beta$ -Proteine haben strukturelle Eigenschaften, die sie als Mitglied der MAGUK-Proteinfamilie definieren. MAGUK-Proteine sind Organisatoren (Scaffolds) in Signal-Transduktions-Kaskaden und bekannt dafür, eine Vielzahl von Proteininteraktionen einzugehen (Anderson, 1996; Dimitratos et al., 1999). Die MAGUK-Kernstruktur besteht aus einer PDZ-, einer GK- und einer SH3-Domäne sowie einem sogenannten HOOK;  $Ca_v\beta$ -Proteine besitzen drei dieser Strukturelemente (GK- und SH3-Domäne und HOOK) (Hidalgo and Neely, 2007). Die strukturellen Ähnlichkeiten machen die  $Ca_v\beta$ -Untereinheit zu einem möglichen Scaffold für Protein-Interaktionen, die über die LTCC-Interaktion hinausgehen können. Weitere mögliche Interaktoren des  $Ca_v\beta$ -Proteins sind Ryanodinrezeptoren,  $BK_{Ca}$ -Kanäle, Bestrophin und der Zinktransporter ZnT-1 (Übersicht in Buraei and Yang, 2010).

Der L-Typ Calciumkanalkomplex wird durch eine Vielzahl von Phosphorylierungskaskaden gesteuert, deren Zielprotein auch die  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit sein könnte. Mittels *in vitro*-Daten konnte die Phosphorylierung des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteins durch PKA, CaMKII und Akt/PKB gezeigt und unterschiedliche Einflüsse auf biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften von LTCCs festgestellt werden (Bünemann et al., 1999; Dolphin, 2003; Grueter et al., 2006; Viard et al., 2004). Weder der Einfluss der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Phosphorylierungsereignisse auf den LTCC-Strom, noch die  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Interaktionen sind bisher, mangels geeigneter Mausmodelle, *in vivo* untersucht worden. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden geeignete knock-in-Mausmodelle generiert. Diese *in vivo*-Modelle sollen dazu dienen, die verschiedenen Funktionen der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit im kardialen Calciumkanalkomplex unter physiologischen sowie unter pathophysiologischen Bedingungen zu untersuchen.

## 5.1 Die $\text{Ca}_v\beta_2$ STOP-Mauslinie

Die exakte Regulation spannungsabhängiger Calciumkanäle mittels Proteinkinasen und Phosphatasen ist bisher nicht geklärt und auch der Einfluss der  $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheit bei *in vivo*-Phosphorylierungsereignissen ist nicht verstanden. Die im Rahmen der Arbeit generierte knock-in-Mauslinie  $\text{Ca}_v\beta_2$ STOP dient zur Untersuchung von Exon 14 des *CACNB2* Gens und der darauf befindlichen PKA-, CaMKII- und Akt/PKB-Phosphorylierungsstellen. *In vitro*-Vorversuche verschiedener Gruppen zeigen einen entscheidenden Einfluss der Phosphorylierungsstellen auf den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  via LTCC-Komplexe.

### 5.1.1 Generierung und primäre Charakterisierung der Mauslinie

Für die Generierung der knock-in-Mauslinie wurde ein Gargetingvektor kloniert, der einen 5'- und 3'-Homologiebereich von insgesamt 7,4 kb besitzt. Als Grundlage für das Klonieren diente genomische DNA aus 129/Sv-Mäusen. Der Sequenzabgleich erfolgte anhand der Ensembl-Gene ID ENSMUST00000114723. Zwischen den Homologiearmen befindet sich eine Selektionskassette mit Neomycin-Resistenz, die von zwei loxP-Sequenzen flankiert ist. Die Neomycin-Resistenz diente der Selektion während dem Gargeting in ES-Zellen, die loxP-Sequenzen dienten dem Entfernen der Selektionskassette *in vivo*. Die homologe Rekombination des Gargetingvektors in ES-Zellen wurde durch Elektroporation erreicht. Dabei liegt die Wahrscheinlichkeit für die Rekombination durch *crossing-over* am richtigen Genort bei 0,1-1 % (Nagy et al., 2003; Thomas et al., 1986). Hier zeigte ein ES-Zellklon von 840 isolierten Klonen die einfache, richtige Rekombination. Das entspricht einer Quote von 0,12 %. Die Rekombinationseffizienz liegt am unteren Ende der Wahrscheinlichkeit für die richtige Integration; Gründe hierfür können in der Zugänglichkeit des Genorts, der DNA-Sequenz und in der Qualität der Stammzellen gesehen werden.

In dem positiven ES-Zellklon konnte die eingefügte Stop-Mutation mit Hilfe der Sequenzanalyse bestätigt und der Zellklon für die Manipulation von Blastozysten verwendet werden; die injizierten Blastozysten wurden in scheinsschwangere Ammenmäuse operiert. Im Fall der  $Ca_v\beta_2$ STOP-Mauslinie gingen aus den Operationen 10 Chimären mit unterschiedlichem Chimärismus (40-95 %) hervor. Der Chimärismus ist anhand des agouti-farbenen Fellanteils abschätzbar, der nur durch die Injektion von Stammzellen mit SV129-Hintergrund entstehen kann. Durch das Verpaaren der männlichen Chimären mit C57Bl/6N-Weibchen wurde die Keimbahngängigkeit der Mutation getestet. Ziel der Verpaarung waren heterozygote Nachkommen, die die Mutation auf einem Allel tragen. Nur eine der Chimären (95%) konnte die Mutation keimbahngängig vererben, die anderen Chimären waren infertil und konnten keine Nachkommen zeugen. Gründe für die Infertilität sind in der Qualität der Stammzellen, der Art der Injektion der Stammzellen und der Verschmelzung der injizierten Stammzellen mit der inneren Zellmasse der Blastozyste zu suchen und nur schwer zu ermitteln.

Mit der fertilen Chimäre wurde die  $Ca_v\beta_2$ STOP-Mauslinie gezüchtet. Durch Verpaaren der männlichen, heterozygoten Nachkommen mit weiblichen CreDeleter-Mäusen (Stamm: B6.C-Tg(CMV-Cre)1Cgn/J) wurde die NeoTK-Selektionskassette aus dem Genom entfernt und diese Nachkommen zu homozygoten knock-in-Tieren verpaart. Die NeoTK-Kassette wurde aus dem Genom entfernt, um mögliche Schwierigkeiten bei der  $Ca_v\beta_2$ STOP-Proteinexpression zu vermeiden. Die homozygoten Nachkommen sind lebensfähig und fertil. Es waren äußerlich keine Veränderungen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren erkennbar. Gleichzeitig wurden die heterozygoten Nachkommen mit NeoTK-Kassette zu einer homozygoten Mauslinie verpaart. Auch die homozygoten Nachkommen der  $Ca_v\beta_2$ STOP<sup>NeoTK</sup>-Linie sind lebensfähig und fertil; das bedeutet, dass die NeoTK-Kassette die Proteinexpression und die  $Ca_v\beta_2$ -Interaktionen nicht stört. Somit führt die Trunkierung des  $Ca_v\beta_2$ -C-Terminus zu keinem letalen Phänotyp. Die statistische Auswertung der Geburten zeigte, dass die eingefügte Stop-Mutation keine Auswirkungen auf die Vererbung hat, die gemäß dem Mendel'schen Gesetz verläuft ( $\chi^2=0,329$ ).

Das Vorhandensein der Stop-Mutation wurde durch Sequenzanalyse von genomischer DNA und cDNA bestätigt. Die entscheidende Funktion der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit, das Trafficking des Kanalkomplexes via AID-ABP-Komplex, wurde durch Einführen der Stop-Mutation nicht beeinflusst; eine Bestätigung dafür war die Co-Immünpräzipitation von  $Ca_v1.2$  durch das  $Ca_v\beta_2$ STOP-Protein. Das trunkierte  $Ca_v\beta_2$ -Protein konnte indirekt über den C-terminal bindenden Antikörper Anti $Ca_v\beta_{2v2}$  (keine Detektion des Proteins möglich) und direkt über den N-terminal bindenden Antikörper Anti $Ca_v\beta_2$ -N4/1195 (58 kDa  $Ca_v\beta_2$ STOP-Protein) nachgewiesen werden. Eine Tendenz zur Abnahme der LTCC-Stromdichte in den Kardiomyozyten der  $Ca_v\beta_2$ STOP-Tiere konnte durch die preliminären elektrophysiologischen Experimente gezeigt werden. Diese Daten müssen im Weiteren verifiziert werden.

Der Unterschied des Herzgewichts (normalisiert auf die Tibialänge) in Ki- und WT-Tieren ist ohne Signifikanz; es liegt jedoch bei den männlichen Ki-Tieren eine Tendenz zu einem reduzierten Herzgewicht vor, was auf eine kardioprotektive Eigenschaft des trunkierten  $Ca_v\beta_2$ -Proteins hindeuten könnte. Dass die  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit eine Rolle bei der Entstehung von pathophysiologischen

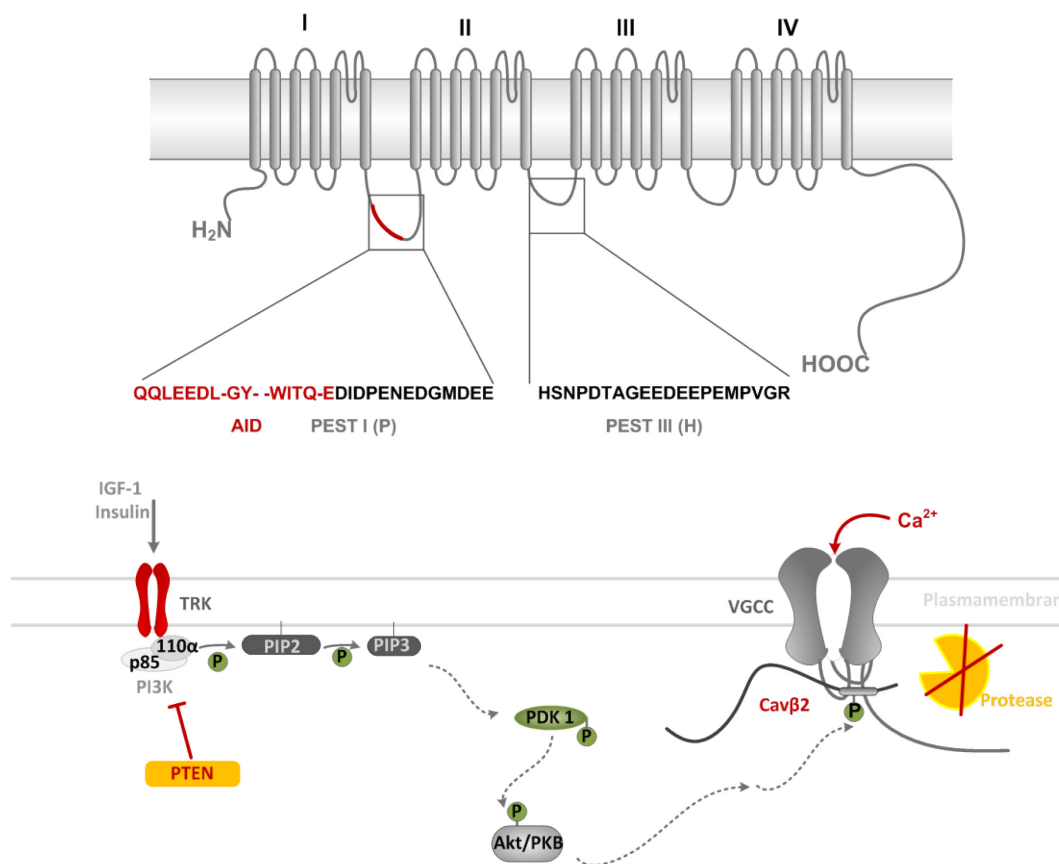
Herzwachstum (Hypertrophie) spielen kann, konnte von Nakayama et al. (2007) in einem transgenen, die  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit überexprimierenden Mausmodell gezeigt werden. In diesem Mausmodell führt die gesteigerte Expression des  $Ca_v\beta_2$ -Proteins zu einer signifikanten Zunahme des Calciumstroms, einer signifikanten Zunahme des Herzgewichtes, einer Zunahme an apoptotischen Gewebe und zu einer signifikant erhöhten Sterberate der transgenen Tiere, sowohl unter basalen, wie auch unter Isoprenalin-stimulierten Bedingungen (Nakayama et al., 2007). Die  $Ca_v\beta_2$ STOP-Maus hingegen zeigt eine Reduktion des Herzgewichtes und eine Tendenz zur Abnahme des LTCC-Stroms; dies könnte auf einen protektiven Mechanismus durch die eingefügte Stop-Mutation und das somit trunkierte  $Ca_v\beta_2$ -Protein hindeuten.

Um einen Hinweis auf Veränderungen der Herzkontraktion zu gewinnen, wurden mittels telemetrischer EKG-Aufzeichnungen P-Welle, PQ-, QT- und TP-Dauern in  $Ca_v\beta_2$ STOP-Tieren im Vergleich mit den Wildtyp-Kontrollen vor und nach Gabe von Isoprenalin aufgezeichnet. Es wurde bei einer Herzfrequenz von 630 bpm vor Isoprenalingabe, d.h. vor Stimulation der  $\beta$ -AR, gemessen. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen knock-in- und WT-Tieren festgestellt werden. Bei der Erhöhung der Herzfrequenz auf 700 bpm durch Isoprenalingabe konnte eine signifikante Verbreiterungen der P-Welle in den knock-in-Tieren festgestellt werden. Die P-Welle eines EKGs stellt die Vorhoferregung dar; eine verbreiterte P-Welle kann somit auf Veränderungen im Vorhof oder eine fehlerhafte Reizübertragung im Reizleitungssystem hindeuten (Schrader and Kelm, 2005); dies muss detaillierter in Folgeversuchen beleuchtet werden. Beide Genotypen reagieren auf Phenylepinephrin-Gabe ( $\alpha$ -AR-Agonist) mit einem Abfall der Herzfrequenz, auf Isoprenalin-Gabe ( $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -AR-Agonist) mit einer Zunahme der Herzfrequenz. Die sympatische Regulation des Herzens ist bei den Ki-Tieren somit unverändert.

### 5.1.2 $Ca_v1.2$ -Expression der $Ca_v\beta_2$ STOP-Mauslinie

In einer Theorie, die von Viard et al. (2004) für neuronale LTCCs und Catalucci et al. (2009) für kardiale LTCCs veröffentlicht wurde, wird der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit bzw. dem Exon 14 des *CACNB2* Gens eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Stabilität der LTCC-Kanäle in der Zellmembran zugewiesen. Grund hierfür könnte die Rolle der Akt/PKB-Phosphorylierungsstelle Ser574 sein, die sich im Carboxy-Terminus der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit befindet. Durch Phosphorylierung von Ser574 via PI3K-PDK1-Akt/PKB soll der Degradation des Kanals entgegengewirkt werden, was zur Erhöhung der  $Ca_v1.2$ -Membranexpression führen soll. Bekannt ist, dass die Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB nach IGF-1-Stimulation und daraus folgender Aktivierung der PI3K-Signalkaskade phosphoryliert wird und vom Zytosol an die Zellmembran wandert. Die ebenfalls durch PI3K-Produkte aktivierte *Phosphatidylinositol dependent kinase 1* (PDK1) phosphoryliert nun Akt/PKB, die wiederum ihre Zielproteine phosphorylieren kann (Fayard et al., 2010). Bezüglich der Akt/PKB-Phosphorylierung von Calciumkanälen konnte bei *in vitro*-Experimenten ein möglicher Einfluss auf die  $Ca_v1.2$ -Membranexpression durch die  $Ca_v\beta$ -Untereinheit gezeigt werden: Überexpressionsversuche in COS-7-Zellen zeigten, dass die Mutationen von Ser574 zu Alanin bzw. zu

Glutamat den PI3K-Akt/PKB-Effekt, d.h. eine Erhöhung der Stromdichte nach Akt-Phosphorylierung, verhindern bzw. imitieren (Viard et al., 2004). Weitere Versuche wurden mit PDK1-knock-out-Mäusen durchgeführt, einer Mauslinie mit Herzmuskel-spezifischem knock-out des PDK1-Proteins; der globale knock-out führt zu einem embryonal-letalem Phänotyp (Lawlor et al., 2002). Die Experimente mit PDK1-knock-out-Mäusen unterstützen die Theorie, dass die Phosphorylierung von Ser574 die LTCC-Stromdichte beeinflusst: Laut Catalucci et al. (Catalucci et al., 2009) enthält die Kanalpore  $Ca_v1.2$  hoch-konservierte PEST-Sequenzen (Signale für eine schnelle Proteindegradation) auf den intrazellulären Linkern I-II und II-III, die durch die Akt/PKB-abhängige Phosphorylierung der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit blockiert werden, wodurch die  $Ca_v1.2$ -Proteindegradation gebremst wird. Dies führt zu einer erhöhten LTCC-Dichte in der Plasmamembran und zur Veränderung der  $Ca_v1.2$ -Kanalfunktion. In den Herzmuskel-spezifischen PDK1-knock-out-Mäusen ist die Aktivierung der Akt/PKB-abhängigen  $Ca_v\beta_2$ -Phosphorylierung nicht möglich, was die Reduktion der LTCC-Stromdichte auf  $-9,08 \pm 0,96$  pA/pF (WT-Kontrollversuch:  $-16,26 \pm 0,96$  pA/pF) durch die verstärkte  $Ca_v1.2$ -Proteindegradation erklären könnte (Catalucci et al., 2009). In Abbildung 5-1 sind die PEST-Sequenzen des  $Ca_v1.2$ -Kanals und der postulierte Mechanismus dargestellt.



**Abbildung 5-1** PEST-Sequenzen der  $Ca_v1.2$ -Untereinheit und Akt/PKB-Phosphorylierung der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit

In der  $Ca_v\beta_2$ STOP-Maus wird die Akt/PKB-Stelle durch die eingeführte Stop-Mutation nicht mehr exprimiert, d.h.  $Ca_v\beta_2$  kann nicht mehr durch Akt/PKB phosphoryliert werden. Der Theorie Viard et al. und Catalucci et al. zufolge müsste dadurch der Abbau Membran-gebundener  $Ca_v1.2$ -Kanäle durch Proteasen begünstigt sein und die LTCC-Kanaldichte und der Calciumstrom  $I_{Ca}$  in die Zelle reduziert

werden. Die Rolle der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit bei der Akt/PKB-abhängigen Stabilisierung des  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals kann mit Hilfe der  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Mauslinie durch Messung der Stromdichte geklärt werden. Die Tendenz aus ersten Messungen zeigt, dass in den  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Kardiomyozyten eine geringere LTCC-Stromdichte vorliegt und somit weniger Calciumkanäle in der Zellmembran vorhanden sind. Es handelt sich um keinen signifikanten Unterschied, wobei die Zahl der gemessenen Zellen noch zu gering ist, um eine endgültige Aussage zu treffen. Auf Proteinebene kann in ersten, vorläufigen Experimenten kein drastischer Unterschied zwischen der  $\text{Ca}_v1.2$ -Expression in Ki- und WT-Tieren festgestellt werden. Dieses vorläufige Ergebnis muss jedoch mit einer ausreichend hohen Fallzahl an untersuchten Tieren mit weiteren Methoden verifiziert werden, da die von Catalucci et al. (2009) beschriebene Abnahme der Akt/PKB-abhängige LTCC-Membranexpression (durch Pest-Degradation) um ca. 25 % methodisch im Westernblot nur schwer nachweisbar ist. Daher sind weitere Untersuchungen geplant, mit welchen die tatsächlich in die Zellmembran eingebauten  $\text{Ca}_v1.2$  LTCCs durch Oberflächenquervernetzung nachgewiesen und quantifiziert werden könnten. Die  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Mauslinie könnte als geeignetes Modell zur Untersuchung der Theorie von Viard et al. und Catalucci et al. dienen und zur Klärung der PEST-Degradation von LTCCs beitragen.

### 5.1.3 Akute Regulation der $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Mauslinie via PKA

Die akute Regulation des Calciumeinstroms über den LTCC  $\text{Ca}_v1.2$  erfolgt u.a. über den  $\beta$ -adrenergen Signalweg, der die Aktivierung von  $\beta$ -Adrenozeptor ( $\beta$ -AR),  $G_s$ -Protein, Adenylatzyklase und PKA erfordert. Die bisherige Vorstellung der  $\beta$ -adrenergen Regulation beinhaltete die PKA-abhängige Phosphorylierung von Ser1928 auf dem  $\text{Ca}_v1.2$ -Carboxy-Terminus. Mit Hilfe einer Alanin-Mutante (S1928A) konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die PKA-Regulation und somit die  $\beta$ -adrenerge Stimulation des  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals nicht (oder zumindest nicht alleine) von dieser Phosphorylierungsstelle gesteuert wird: die S1928A-knock-in-Mäuse zeigen keine Veränderungen in  $I_{\text{Ca}}$  unter Kontrollbedingungen oder nach Isoprenalin-Stimulation im Vergleich mit WT-Mäusen (Lemke et al., 2008). Mit dieser knock-in-Maus wurden *in vitro*-Daten (De Jongh et al., 1996; De Jongh et al., 1991; Hall et al., 2006; Hofmann et al., 1999) widerlegt, in welchen Ser1928 als entscheidende Phosphorylierungsstelle bei der akuten  $\beta$ -adrenergen Regulation im Herzen publiziert wurde. Neben Ser1928 befinden sich weitere potentielle PKA-Phosphorylierungsstellen auf der  $\text{Ca}_v1.2$ - und der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit die potentielle Ziele für die PKA-Phosphorylierung *in vitro* sind (Fuller et al., 2010; Gerhardstein et al., 1999).

Für die  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit wurden mittels Phosphopeptid-*Mapping* und Micro-Sequenzierung von bakteriell-exprimierter  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Protein zunächst die PKA-Konsensussequenzen Thr164 und Ser591 identifiziert (Gerhardstein et al., 1999). Durch Mutation dieser Aminosäuren in Alanine und anschließenden Phosphorylierungsexperimenten konnten diese PKA-Sequenzen als nicht funktional identifiziert werden. Drei weitere putative Phosphorylierungsstellen, die nicht die PKA-Konsensus-Sequenz erfüllen, sind Ser459, Ser479 und Ser480. In den Arbeiten von Gerhardstein et al. (1999) und Bünemann et al. (1999) wurden diese Stellen *in vitro* auf ihre physiologische Relevanz hin



elektrophysiologisch untersucht und Ser479 sowie Ser480 als PKA-Phosphorylierungsziele identifiziert. Durch Phosphorylierungsstudien wurden diese Ergebnisse von Toni Lemke (2007, Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie, LMU München) bestätigt.

Bei der hier generierten  $Ca_v\beta_2$ STOP-Mauslinie fehlen die beiden PKA-Phosphorylierungsstellen Ser479/480 auf der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit. Erste *in vivo*-Untersuchungen zeigten keinen Einfluss der eingefügten Stop-Mutation auf die akute PKA-Regulation. Diese Aussage stützt sich bisher nur auf Ultraschallmessungen bei drei Monate alten Mäusen, vor und nach Isoprenalin-Gabe. Bei der Ultraschallmessung reagierten die knock-in-Tiere, ebenso wie die Wildtyp-Kontrollen auf Isoprenalin mit einem Anstieg der Herzfrequenz und einem verstärkten *Fractional shortening*. Elektrophysiologische Daten zur Bestätigung der Ultraschalldaten liegen noch nicht mit ausreichender Fallzahl vor. Das deutet vorläufig darauf hin, dass die akute  $\beta$ -adrenerge Regulation des Herzens durch das Entfernen der PKA-Stellen auf der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit zumindest nicht vollständig ausgeschaltet wird bzw. dass es *Backup*-Mechanismen gibt, die den Ausfall der  $Ca_v\beta_2$ -Funktion übernehmen können, etwa die Phosphorylierungsstelle Ser1700 (Fuller et al., 2010). Ser1700 befindet sich auf dem  $Ca_v1.2$ -Carboxy-Terminus, ist aber erst nach proteolytischer Spaltung des Carboxy-Terminus bei Aminosäure 1821 für die PKA-Phosphorylierung zugänglich. Abbildung 5-2 zeigt die putativen PKA-Phosphorylierungsstellen im LTCC-Komplex.

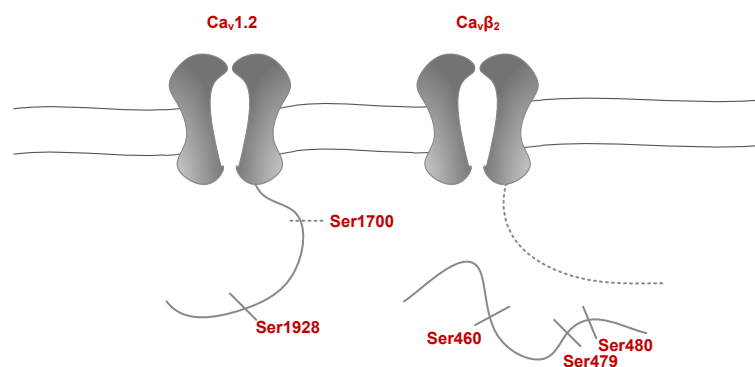


Abbildung 5-2 PKA-Phosphorylierungsstellen im LTCC-Komplex ; links: Carboxy-Terminus der  $Ca_v1.2$ -Untereinheit mit PKA-Stellen Ser1928 und Ser1700; rechts:  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit mit Ser460 und Ser479/480

Die bisher erhobenen Daten beziehen sich nur auf drei Monate alte Tiere. Ein nächster Schritt ist, die Funktion der  $Ca_v\beta_2$ STOP-Untereinheit unter pathophysiologischen Bedingungen zu klären. Durch die Trunkierung des  $Ca_v\beta_2$ -Proteins konnte eine Tendenz zu reduziertem Herzgewicht und reduziertem LTCC in den Ki-Tieren nachgewiesen werden. Dies könnte auf einen kardioprotektiven Mechanismus durch die  $Ca_v\beta_2$ STOP-Mutation hindeuten. Kardioprotektive bzw. hypertrophe Mechanismen können *in vivo* mit Hilfe unterschiedlicher Modelle untersucht werden, z.B. durch künstliches Hervorrufen einer pathophysiologischen Herzhypertrophie nach Verengung der Aorta (TAC, *transverse aortic constriction*) (deAlmeida et al., 2010) oder durch Behandlung mit Angiotensin II (Everett et al., 1994; Johar et al., 2006). Desweiteren können die Untersuchungen von kardioprotektiven Mechanismen auch in Tieren mit altersbedingter Herzhypertrophie durchgeführt werden. Für dieses Modell sollten Tiere verwendet werden, die älter als 8 Monate sind. Die Erklärung hierfür ist eine Veröffentlichung von Muth et al. (2001), in welcher eine altersbedingte Entstehung von pathologischer Hypertrophie und Herzinsuffizienz bei transgenen, den LTCC-überexprimierenden Mäusen festgestellt werden

konnte; diese krankhaften Veränderungen konnten in Versuchstieren jünger als acht Monate nicht festgestellt werden. In allen drei Hypertrophie-Modellen kann die Hypertrophie, bzw. ein möglicher protektiver Mechanismus, molekularbiologisch, histologisch und durch Bestimmung des Herzgewichts (im Verhältnis zur Tibialänge) nachgewiesen werden. Neben der akuten Regulation des  $\beta$ -AR-Signalwegs durch kurzzeitige Isoprenalin-Gabe muss auch die Langzeitwirkung der PKA-Stimulation in den genannten Hypertrophie-Modellen untersucht werden.

Wie bereits diskutiert sind *Backup*-Mechanismen für wichtige zelluläre Signalwege sehr wahrscheinlich. Zu diesen wichtigen Signalwegen zählt die akute Regulation des  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals durch die PKA-Phosphorylierung. Ist die Regulation fehlerhaft, kann es zur Vergiftung der Zelle durch zu hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oder zu einer extrem verlangsamten Reaktion auf Catecholamin-abhängige  $\beta$ -AR- und PKA-Stimulation bei zu niedrigen Calciumkonzentrationen kommen. Deshalb ist das Zusammenspiel verschiedener PKA-Stellen im Calciumkanalkomplex sehr wahrscheinlich. Weiterführende Experimente müssen hierzu noch durchgeführt werden. Zur vollständigen Klärung der akuten  $\beta$ -AR- und PKA-abhängigen Regulation des LTCC-Komplexes müssen *in vivo*-Daten für eine S1700A-Mausmutante erhoben und diskutiert werden.

#### 5.1.4 CaMKII-abhängige Phosphorylierung und Fazilitierung

Eine weitere Regulation des  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals erfolgt mittels CaMKII, die zur Fazilitierung des Kanals führen kann. Die Fazilitierung wird als zelluläres Gedächtnis erregbarer Zellen betrachtet und durch einen stark depolarisierenden Puls (spannungsabhängige Fazilitierung) oder durch schwache, repetitive Pulse ( $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Fazilitierung) (Anderson et al., 1994; Lee et al., 2006; Xiao et al., 1994) ausgelöst. Effekt der Fazilitierung ist ein Öffnungsmodus (*Mode2*), der zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) des Kanals und zu kurzzeitig gesteigertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom ( $I_{\text{Ca}}$ ) in erregbare Zellen führt (Dzhura et al., 2000; Pietrobon and Hess, 1990). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Fazilitierung wird u.a. durch CaMKII ausgelöst, welche durch Phosphorylierung der Ryanodinrezeptoren Typ 2 (RyR2) im SR und der  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle des Herzens die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt. Mittels biochemischer Phosphorylierungsstudien konnten im L-Typ Calciumkanalkomplex verschiedene CaMKII-Stellen identifiziert werden: Ser1512 und Ser1570 auf der  $\text{Ca}_v1.2$ -Untereinheit und Thr498 auf der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit. Untersuchungen in heterologen Expressionssystemen lassen vermuten, dass die CaMKII direkt an den Carboxy-Terminus der  $\text{Ca}_v1.2$ -Untereinheit bindet bzw. direkt Ser1512 und Ser1570 phosphorylieren kann (Hudmon et al., 2005; Lee et al., 2006). Andere Untersuchungen zeigten, dass das erfolgreiche Targeting von CaMKII an den *full length*  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal in transfizierten HEK293-Zellen die Bindung von CaMKII an die  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit und die Phosphorylierung von Thr498 erfordert (Abiria and Colbran, 2010; Kamp et al., 2000).

Erste *in vivo*-Daten für die Funktion von Ser1512/1570 wurden durch ein knock-in-Mausmodell (SF-Maus) erhoben worden. Durch Mutation von Ser1512/1570 zu Alanin wurden die CaMKII-

Phosphorylierungsstellen blockiert, was in Theorie zur Inhibition der Fazilitierung in den SF (*sine facilitation*)-Mäusen führen sollte. Elektrophysiologische Messungen an isolierten SF-Kardiomyozyten zeigten, dass die Spannungs- bzw. Frequenz-abhängige Fazilitierung der Kardiomyozyten zwar stark erniedrigt (Reduktion der Fazilitierung vom 1,58fachen (WT) auf das 1,18fache (Ki)), aber nicht vollständig inhibiert ist (Blaich et al., 2010). Somit sind Ser1512/1570 zu einem hohen Anteil für die Fazilitierung des  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanalkomplexes verantwortlich. Es existieren aber womöglich weitere Mechanismen bzw. CaMKII-Phosphorylierungsstellen, um die Fazilitierung der Zelle aufrechtzuerhalten. Ein weiterer Effekt der von Blaich et al. (2010) durch die Mutation S1512/1570A festgestellt wurde, ist die signifikante Verkürzung des QT-Intervalls während des kardialen Aktionspotentials (AP) bei hoher Herzfrequenz (700 bpm). Studien belegen, dass die Verlängerung des APs, einhergehend mit der Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und strukturellen Herzschäden, durch CaMKII-Aktivität, Fazilitierung und frühzeitige Nachdepolarisierungen (EAD, *early after depolarization*) entstehen können. Die Folgen können Herzarrhythmie und plötzlicher Herztod sein (Anderson, 2004; Wu et al., 2002). Im SF-Modell könnten die homozygoten knock-in-Tiere durch die Verkürzung des QT-Intervalls vor EADs und Arrhythmien geschützt sein, wohingegen bei WT-Tieren bei 700 bpm die Wahrscheinlichkeit von Arrhythmien steigt.

Die Rolle der CaMKII-Phosphorylierungsstelle Thr498 auf der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit *in vivo* ist bis dato nicht geklärt. *In vitro*-Daten zeigen, dass die Mutation T498A die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Fazilitierung hemmt. Nach der Hypothese von Grueter et al. (2006) wird die CaMKII durch die Phosphorylierung der  $\text{Ca}_v\beta$ -Untereinheit an die CaMKII-Bindungsstellen auf dem  $\text{Ca}_v1.2$ -Carboxy-Terminus gebracht und kann dort Ser1512/1570 phosphorylieren. Deshalb werden synergistische Effekte der  $\text{Ca}_v1.2$ - und der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit bei der CaMKII-abhängigen Regulation des Calciumkanals vermutet (Grueter et al., 2006; Hudmon et al., 2005; Lee et al., 2006). In der  $\text{Ca}_v\beta_2$ STOP-Mauslinie wird Thr498 nicht exprimiert, weshalb die synergistischen Effekte nicht mehr vorhanden sein sollten und die Kardiomyozyten somit verändert auf Spannungs- und Frequenz-abhängige Fazilitierung reagieren sollten. Die Fazilitierung wird durch elektrophysiologische Messungen im *whole cell patch* bestimmt und ist entscheidend, um die Relevanz der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit bei der CaMKII-abhängigen Regulation der spannungsabhängigen Calciumkanäle zu ermitteln. Bisher konnten keine aussagekräftigen Messungen der  $\text{Ca}_v\beta_2$ STOP-Kardiomyozyten im Vergleich zu WT-Kardiomyozyten durchgeführt werden. Die geplanten elektrophysiologischen Messungen und die zu erhebenden Daten werden zeigen, ob diese Theorie *in vivo* unterstützt werden kann.

## 5.2 Interaktionsstudien: Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Mauslinie

Die Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit ist nicht nur als integraler Bestandteil von Calciumkanalkomplexen zu betrachten, der ausschließlich Funktionen für das Kanaltrafficking, die Membranexpression und die Beeinflussung der biophysikalischen Eigenschaften des Kanalkomplexes erfüllt. Dass das Ca<sub>v</sub>β-Protein weitere Funktion in vielfältigen Signalkaskaden haben könnte, wurde mehrfach in *in vitro*-Interaktionsstudien gezeigt: die Interaktion der Ca<sub>v</sub>β-Untereinheit mit kir/Gem, Rad, Rem und Rem2, kleinen GTPasen der RGK Proteinfamilie (Beguin et al., 2001), mit Dynamin, einem endozytotischen Protein (Gonzalez-Gutierrez et al., 2007b), und Phospholipase C in pankreatischen Inselzellen zur Regulation der Insulinsekretion (Beggren et al., 2004) wird diskutiert. Die Interaktion mit kleinen GTPasen, Dynamin und Phospholipase C führt zur Reduktion der Ca<sub>v</sub>1.2-Membranexpression bzw. zur reduzierten Insulinsekretion durch erniedrigte Ca<sup>2+</sup>-Oszillation in pankreatischen β-Zellen.

Die genannten Studien basieren überwiegend auf Experimenten in Überexpressionssystemen oder infizierten Primärzelllinien. Da diese Systeme die Komplexität und physiologischen Bedingungen eines Organs nicht widerspiegeln, ist die *in vivo*-Untersuchung der Interaktionspartner sinnvoll, um das Spektrum der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Interaktionen einzugrenzen und die physiologische Relevanz der Interaktionen zu betrachten. Interaktionsstudien in Kombination mit massenspektrometrischer Analyse bieten einen vielversprechenden Ansatz, um die Komplexität von Proteininteraktionen darzustellen, neue Interaktoren zu definieren und die Relevanz der Interaktoren in (geklärten und ungeklärten) relevanten Signalkaskaden zu analysieren. Auf dem Gebiet der Calciumkanal-Proteine wurde mit diesem Vorgehen das Ca<sub>v</sub>2-Ionenkanal-Interaktom beleuchtet und eine komplexe Vielzahl bekannter und unbekannter Interaktionspartner aufgezeigt (Müller et al., 2010). Der dabei gewählte Ansatz beinhaltet die Affinitätsaufreinigung des Ca<sub>v</sub>2-Interaktoms über Antikörpermatrix und die Analyse der Interaktionspartner mittels nanoflow-LC-MS/MS (*liquid chromatography*, Flüssigchromatographie, Tandem-Massenspektrometrie). Dies ist ein gängiges Vorgehen bei der Untersuchung von Interaktionspartnern, wobei ein Problem bei der Verwendung von Antikörpern zur Co-Immünpräzipitation des Zielproteins und dessen Interaktionspartnern liegt. Antikörper produzieren bei der massenspektrometrischen Analyse starke Hintergrundsignale, was die Analyse erschwert bzw. schwache Signale verdeckt. Ein weiteres Problem stellt die Qualität der Antikörper-Antigen-Bindung dar, die im Fall von Ionenkanalproteinen häufig mit vielen unspezifischen Bindungen einhergeht. Diese unspezifischen Bindungen führen zur Detektion von falsch-positiven Bindungspartnern und somit zur Verfälschung des Interaktoms.

Das Problem der unspezifischen Antikörperbindung ist auch bei der Untersuchung des Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Interaktoms ein Hindernis. Um dieses Problem zu umgehen, existiert die Möglichkeit, das Protein zu taggen, d.h. mit einer kurzen Aminosäuresequenz zu fusionieren. Mit einem Tag-spezifischen Antikörper können das getaggte Protein und die gebundenen Interaktionspartner (Interaktom) aus einer Proteinlösung „gefischt“ werden. Die Anforderung an einen Aminosäure-Tag sind eine geringe Größe, eine hohe Affinität zur Aufreinigungsmatrix, keine falsch-positiven Interaktionen und eine kostengünstige Verwendung im großen Maßstab. Diese Anforderungen erfüllen eine Vielzahl von

Tags. Bekannte Beispiele sind HIS (Hexahistidin)-, FLAG-, GST (Glutathion S-Transferase)-, HPC (*Heavy Chain of Protein C*)- und CBP (*Calmodulin binding Peptide*)-Tag. Alle Tags können C- und N-terminal an Proteine fusioniert werden, unterscheiden sich in ihrer Größe, in der Affinitätsmatrix und den Elutionsbedingungen. In einer vergleichenden Studie von Lichty et al. (2005) wurden die höchsten Spezifitäten bei geringster Größe mit FLAG- und HPC-Tag, sowie mit dem neu entwickelten OneStrep-Tag (Junttila et al., 2005) erreicht.

Der OneStrep-Tag hat gegenüber den genannten Affinitätsaufreinigungs-Tags den Vorteil, dass eine Tandemaffinitäts-Aufreinigung (TAP, *tandem affinity purification*) durchgeführt werden kann. Das bedeutet, dass getaggte Proteine und die gebundenen Interaktionspartner mit nur einem Tag über zwei unterschiedliche Matrizes gereinigt werden können. Die primäre Aufreinigung wird hierbei an einer Streptavidin-Matrix (StrepTactin) ohne Beteiligung von Antikörpern und, bei Bedarf, die zweite Aufreinigung mit monoklonaler Antikörper-Matrix durchgeführt. Dies bedeutet einen großen Vorteil gegenüber ursprünglichen TAP-Systemen, welche durch das Fusionieren von zwei spezifischen Aufreinigungstags schnell eine unhandliche Größe erreichen (Drakas et al., 2005; Gloeckner et al., 2007; Rigaut et al., 1999). Der OneStrep-Tag dagegen hat trotz Tandem-Aufreinigung eine sehr geringe Größe (3,3 kDa) und führt bei physiologischen Elutionsbedingungen dennoch zu spezifischen Resultaten bei hoher Selektivität für das getaggte Protein. Bisher wurde der OneStrep-Tag nur in *in vitro*-Systemen verwendet (De Guiseppe et al., 2010; Frelet-Barrand et al., 2010; Herasimenka et al., 2010; Warth et al., 2011), wobei eine *in vivo*-Anwendung vielversprechende Ergebnisse bei der Isolation von Membranproteinen liefern könnte. Um die Funktionalität des OneStrep-Tag-Affinitätsaufreinigungs-Systems in Verbindung mit der  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit im Calciumkanalkomplex zu testen, wurden vor der Durchführung der *in vivo*-Studien die experimentellen Anforderungen und Protokolle *in vitro* getestet.

### 5.2.1 *In vitro*-Experimente

Für *in vitro*-Studien wurde das Protokoll zur Aufreinigung der getaggen Proteine bereits veröffentlicht (Schmidt and Skerra, 2007); Aufreinigungsmatrix, Protokolle und Detektionsmöglichkeiten sind käuflich erwerblich (Iba, Göttingen). Die Funktionalität des getaggen  $Ca_v\beta_2$ OneStrep-Proteins wurde in HEK293T-Zellen getestet und bestätigt. Die Interaktion der  $Ca_v1.2$ - $Ca_v\beta_2$ -Interaktion war durch das fusionierte OneStrep-Konstrukt nicht gestört, was in Co-Immunitätspräzipitations-Experimenten aus HEK293T-Zellen gezeigt wurde. Desweiteren zeigte die Detektion mit dem monoklonalen OneStrep-Tag-Antikörper und mit StrepTactin sehr hohe Spezifität für die getaggte  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit, was eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung des Tags in *in vivo*-Interaktionsstudien darstellt. Die Spezifität und hohe Effizienz der OneStrep-Tag-Detektion konnte in einem Überexpressionsversuch gezeigt werden; das überexprimierte, gereinigte  $Ca_v\beta_2$ STREP-Protein konnte spezifisch bis in sehr hohe Verdünnungen (1:10 000 bzw. 1: 1000) durch StrepTactin HRP bzw. StrepMAB HRP in Herzlysat detektiert werden.

### 5.2.2 Generierung der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Mauslinie

Basierend auf den *in vitro*-Untersuchungen zur OneStrep-Aufreinigung und -Detektion wurde das *in vivo* Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Modell geplant. Das Klonieren des Gargetingvektors für die Manipulation des ES-Zellgenoms mittels homologer Rekombination wurde wie beschrieben mit genomischer DNA aus 129/Sv-Mäusen durchgeführt. Der Gargetingvektor besitzt einen Homologiebereich von 7,4 kb, der eingefügte OneStrep-Tag befindet sich *in frame* mit Exon 14 und die Expression des Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>OneStrep-Proteins wird durch zwei Stop-Codons (TAA/TAA) am 3'Ende des Tags terminiert. Desweiteren ist eine Neomycin-Selektionskassette mit zwei flankierenden loxP-Sequenzen zwischen den 5'- und 3'-Homologiebereich eingefügt. Nach der Elektroporation des OneStrep-Tag-Konstrukts in 129/Sv-ES-Zellen und Selektion konnten aus 640 isolierten Zellklonen zwei Zellklone mit einfacher, richtiger Rekombination nachgewiesen werden; das entspricht 0,3 % und liegt im Rahmen der Wahrscheinlichkeit für die hier durchgeführte *tag and exchange*-Strategie. Die Zellklone wurden expandiert, an 16 Tagen in Blastozysten injiziert und in scheinchwangere Ammenmäuse operiert. Im Fall der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Mauslinie gingen aus den Operationen nur zwei Chimären hervor: eine männliche Chimäre (80 % Chimärismus) und eine weibliche Chimäre (30 % Chimärismus). Das Ziel ist nun, durch Verpaaren mit C57Bl/6-Mäusen, die Mutation an heterozygote Versuchstiere weiterzugeben. Nach Entfernen der Selektionskassette durch Verpaaren der männlichen Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>OneStrep-Mäuse mit dem CreRekombinase exprimierenden Mausstamm (Stamm: B6.C-Tg(CMV-Cre)1Cgn/J) können mit dem heterozygoten Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STREP-Mäusen erste Interaktionsstudien durchgeführt werden. Um eventuelle Auswirkungen des OneStrep-Tags *in vivo* auszuschließen, muss auf einen homozygoten Genotyp verpaart werden.

### 5.3 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine knock-in-Mauslinie (Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STOP) generiert, die dazu dient die Rolle von Exon 14 des *CACNB2* Gens und die Funktionen der darauf befindlichen Phosphorylierungsstellen (PKA, Akt/PKB, CaMKII) zu beleuchten. Erste Experimente zur Grundcharakterisierung dieser Mauslinie wurden durchgeführt. Preliminäre Ergebnisse geben den Hinweis auf eine mögliche kardioprotektive Eigenschaft durch das Einführen der Stop-Mutation und der daraus folgenden Expression eines Carboxy-terminal verkürzten Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>-Proteins. Die Theorie, dass die Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STOP-Mäuse einem kardioprotektiven Mechanismus unterliegen, muss nun in Hypertrophie-Modellen untersucht werden. Dazu soll sowohl die altersbedingte Herzhypertrophie (in Mäusen älter als acht Monate), als auch die Hypertrophie im TAC- und im Angiotensin-Modell untersucht werden. Um die Ursache des möglichen kardioprotektiven Mechanismus in der Ca<sub>v</sub>β<sub>2</sub>STOP-Mauslinie zu klären, werden mögliche verantwortliche Phosphorylierungs-Signalwege (PKA, CaMKII, Akt/PKB) biochemisch näher untersucht. Desweiteren sind elektrophysiologische Messungen notwendig, um die Parameter Stromdichte und Fazilitierung zu bestimmen bzw. die Fallzahl für diese Experimente zu erhöhen.

Mit der Bestimmung der Stromdichte können Rückschlüsse auf ein verändertes Membrantrafficking bzw. eine veränderte Stabilisierung des  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals in der Zellmembran getroffen werden. Dadurch kann die Theorie untersucht werden, dass das  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Protein mit der darauf befindlichen Akt/PKB-Phosphorylierungsstelle die Degradation von LTCCs in der Plasmamembran verzögert bzw. verhindert. Die elektrophysiologischen Ergebnisse sollen parallel durch biochemische Versuche bestätigt werden. Dazu könnten das Quervernetzen der membranständigen  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle und die anschließende Quantifizierung der  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanäle nach Westernblotting und Antikörperdetektion dienen. Anhand der elektrophysiologischen Bestimmung der Fazilitierung kann die Rolle der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit bei der CaMKII-abhängigen Regulation von LTCCs untersucht werden. Für die Untersuchung der Theorie, dass die CaMKII-Phosphorylierungsstelle Thr498 auf der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit die Fazilitierung des  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals entscheidend beeinflusst, könnte die  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STOP}$ -Mauslinie, die defizient an Thr498 ist, ein geeignetes Modell darstellen. Die Messungen der Fazilitierung muss in ausreichend hoher Fallzahl ( $n > 10$ ) durchgeführt werden.

Für die Untersuchung des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Interaktoms wurde die  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STREP}$ -Mauslinie generiert und soll nun für die *in vivo*-Versuche eingesetzt werden. Die heterozygoten Nachkommen der  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STREP}$ -Mauslinie könnten bereits für das Etablieren der *in vivo*-Aufreinigung und Detektion verwendet werden. Dabei muss das Aufreinigungsprotokoll auf die sensiblen Bedingungen von Membranproteinen und eine erhöhte Menge an falsch-positiven Interaktoren angepasst werden. Sind diese Bedingungen passend gewählt, ist das nächste Ziel, das Protokoll für die massenspektrometrische Analyse des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Interaktoms in Kooperation zu etablieren und die Interaktionspartner der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit im LTCC unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zu bestimmen. So könnte die  $\text{Ca}_v\beta_2\text{STREP}$ -Mauslinie dazu dienen, neue, bisher unbekannte Interaktionspartner und Signalwege des *CACNB2* Gens zu identifizieren und zu analysieren.

## 6 Zusammenfassung

Die Funktion von  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteinen bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im kardiovaskulären System *in vivo* ist bis dato ungeklärt, obwohl es viele Hinweise auf wichtige Aufgaben der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteine gibt. Dass das *CACNB2* Gen lebenswichtige Funktionen bei der Regulation des Calciuminfluxes in die Herzmuskelzellen erfüllt, konnte von Weissgerber et al. (2006) in einem knock-out-Mausmodell gezeigt werden: In dem embryonal-letalen  $\text{Ca}_v\beta_2$ -knock-out wurde ein Einfluss der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit auf das Trafficking und die biophysikalischen Kanaleigenschaften der kardialen L-Typ Calciumkanäle demonstriert. Aufbauend auf diesen Befunden sollten im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit neuartige Mausmodelle entwickelt werden, um die Vielzahl von postulierten  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Funktionen zu verstehen und auch physiologisch wichtige Interaktionspartner der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit zu finden.

Das erste neuartige Modell, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der homologen Rekombination generiert wurde, war die  $\text{Ca}_v\beta_2$ STOP-Maus. In diesem Modell sollten die Rollen der putativen Phosphorylierungsstellen wichtiger kardiovaskulärer Kinasen (PKA, CaMKII, Akt/PKB) auf der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Untereinheit genauer betrachtet werden. *In vitro*-Vorarbeiten verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, dass die Deletion der genannten Phosphorylierungsstellen zur Abnahme des Calciumstroms in die Zelle führt. In der  $\text{Ca}_v\beta_2$ STOP-Mauslinie wurde durch Trunkierung des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Carboxy-Terminus die Expression der genannten Phosphorylierungsstellen aufgehoben. Dieses Fehlen würde nach unseren Erwartungen einen protektiven Effekt auf die (bei Dauerstimulation) kardiotoxischen PKA-, CaMKII-, und Akt/PKB-Signalwege *in vivo* haben. Die homozygoten Nachkommen der  $\text{Ca}_v\beta_2$ STOP-Mauslinie sind lebensfähig und fertil. Durch Sequenzanalyse von genomischer DNA und cDNA konnte die Mutation in der *knock-in*-Mauslinie nachgewiesen und die Trunkierung des  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteins im Westernblot gezeigt werden. Erste Untersuchungen der Herzphysiologie ergaben im Belastungs-EKG eine signifikante Verbreiterung der P-Welle und bei elektrophysiologischen Messungen von Kardiomyozyten die Tendenz zur reduzierten Stromdichte in den Ki-Tieren. Desweiteren wurde ultrasonographisch die linksventrikuläre Durchmesserverkürzung vor und nach akuter Isoprenalingabe bestimmt, wobei keine Unterschiede zwischen WT- und Ki-Tieren feststellbar waren. Bei den männlichen Ki-Tieren ist die Tendenz zu einem reduzierten Herzgewicht (normalisiert auf die Tibialänge) erkennbar. Dies ist zusammen mit der erwähnten reduzierten Stromdichte ein erster möglicher Hinweis auf kardioprotektive Effekte der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Trunkierung.

Das  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Protein erfüllt wichtige Aufgaben im L-Typ Calciumkanalkomplex, transportiert diesen an die Zellmembran und steuert die biophysikalischen Eigenschaften des LTCC-Komplexes. Desweiteren ist durch Vorarbeiten verschiedener Arbeitsgruppen zu erwarten, dass das  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Protein ein Scaffold-Protein der MAGUK-Proteinfamilie ist und weitere wichtige physiologische Aufgaben als Teil anderer Makroproteinkomplexe wahrnehmen kann. Die bisher in der Literatur *in vitro* identifizierten potentiellen Interaktionspartner der  $\text{Ca}_v\beta_2$ -Proteins reichen von kleinen GTPasen der RGK-Familie



(Rad/Gem/kir), Dynamin, Phospholipase C in pankreatischen  $\beta$ -Zellen und Bestrophin bis hin zu Ryanodinrezeptoren,  $BK_{Ca}$ -Kanälen und dem Zinktransporter ZnT-1. Eine systematische Analyse des  $Ca_v\beta_2$ -Interaktoms war bis dato allerdings methodisch nicht möglich. Dieses Problem könnte mit neuartigen Proteinaufreinigungssystemen, die *in vivo*-Maustechniken mit Affinitätsaufreinigung und massenspektrometrischer Analyse verbinden, gelöst werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das neuartige Tandemaffinitätsaufreinigungs-System, der OneStrep-Tag, verwendet, der für die *in vitro*- und *in vivo*-Anwendung zur Identifikation der  $Ca_v\beta_2$ -Interaktionspartner etabliert werden soll. Das *in vitro*-System diene zum Testen und Etablieren der Aufreinigungs- und Detektionsmöglichkeiten des getaggtten LTCC  $Ca_v\beta_2$ -Proteins und erfüllte die gesetzten Anforderungen. Die Anforderungen beinhalteten die Detektion des  $Ca_v\beta_2$ OneStrep-Proteins im Herzlysate bis in hohe Verdünnungen und die spezifische Isolation der getaggtten  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit mit ihrem bekanntesten Interaktionspartner  $Ca_v1.2$ . Für die *in vivo*-Interaktionsstudien wurde eine Mauslinie durch Manipulation muriner ES-Zellen mit Hilfe der homologen Rekombination generiert, die die  $Ca_v\beta_2$ -Untereinheit mit C-terminal fusionierten OneStrep-Tag enthält. Mit der  $Ca_v\beta_2$ STREP-Untereinheit soll das  $Ca_v\beta_2$ -Interaktom unter physiologischen sowie pathophysiologischen Bedingungen (z.B. in Herzhypertrophie-Modellen) untersucht und relevante Interaktionspartner und ihre Funktion bei der Regulation der  $Ca_v\beta_2$ -Proteins näher betrachtet werden. Aus der Manipulation von Blastozysten mit genetisch veränderten ES-Zellen und der Operation der Blastozysten in Ammenmäuse ging eine Chimäre mit 80 % Chimärismus hervor. Durch Verpaaren der Chimäre mit C57Bl/6-Mäusen soll nun die  $Ca_v\beta_2$ STREP-Mauslinie etabliert werden, die für alle weiteren Interaktionsversuche verwendet wird.

Sowohl das im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit erstellte  $Ca_v\beta_2$ STOP-, als auch das  $Ca_v\beta_2$ STREP-Mausmodell könnte dazu dienen, die ungeklärten Funktionen und Interaktionen des  $Ca_v\beta_2$ -Proteins unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zu klären und neue Einsichten in kardioprotektive sowie maladaptive Prozesse zu ermöglichen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abiria, S.A. and Colbran, R.J. (2010) CaMKII associates with Cav1.2 L-type calcium channels via selected  $\beta$  subunits to enhance regulatory phosphorylation. *J. Neurochem.*, **112**, 150-161.
- Ai, X., Curran, J.W., Shannon, T.R., Bers, D.M. and Pogwizd, S.M. (2005)  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leak in heart failure. *Circ. Res.*, **97**, 1314-1322.
- Anderson, J.M. (1996) Cell signalling: MAGUK magic. *Curr. Biol.*, **6**, 382-384.
- Anderson, M.E. (2004) Calmodulin kinase and L-type calcium channels; a recipe for arrhythmias? *Trends Cardiovas Med.*, **75**, 854-861.
- Anderson, M.E., Braun, A.P., Schulman, H. and Premack, B.A. (1994) Multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent protein kinase mediates  $\text{Ca}^{2+}$ -induced enhancement of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in rabbit ventricular myocytes. *Circ. Res.*, **14**.
- Beene, D.L. and Scott, J.D. (2007) A-kinase anchoring proteins take shape. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**, 192-198.
- Beggren, P.-O., Yang, S.N. and Murakami, M. (2004) Removal of  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\beta_3$  subunit enhances  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell*, **119**, 273-284.
- Beguín, P., Nagashima, K. and Gonoï, T. (2001) Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channel expression at the cell surface by the small G-protein kir/Gem. *Nature*, **411**, 701-706.
- Berrow, N. (1995) Antisense depletion of  $\beta$ -subunits modulates the biophysical and pharmacological properties of neuronal calcium channels. *J. Physiol. (Lond.)*, **482**, 481-491.
- Bers, D.M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, **415**, 198-205.
- Bers, D.M. (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu. Rev. Physiol.*, **70**, 23-49.
- Bichet, D., Cornet, V. and Geib, S. (2000) The I-II loop of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_1$  subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the  $\beta$  subunit. *Neuron*, **25**, 177-190.
- Birnbaumer, L., Quin, N., Olcese, R., Tareilus, E., Platano, D., Costantin, J. and Stefani, E. (1998) Structures and functions of calcium channel beta subunit. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **30**, 357-375.
- Blaich, A., Welling, A., Fischer, S., Wegener, J.W., Köster, K., Hofmann, F. and Moosmang, S. (2010) Facilitation of murine cardiac L-type Cav1.2 channel is modulated by Calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 10285-10289.
- Bordin, b., Marger, F., Wall-Lacell, S., Schneider, T., Klein, H., Sauvé, R. and Parent, L. (2010) Molecular determinants of the  $\text{Ca}_v\beta$ -induced plasma membrane targeting of the  $\text{Ca}_v1.2$  channel. *J. Biol. Chem.*, **285**, 22853-22863.
- Brice, N., Berrow, N.S., Campbell, V., Page, K.M., Bricklex, K., Tedder, I. and Dolphin, A.C. (1997) Importance of the different  $\beta$  subunits in the membrane expression of the  $\alpha_{1a}$  and  $\alpha_2$  calcium channel subunits: studies using a depolarization sensitive  $\alpha_{1a}$  antibody. *Eur. J. Neurosci.*, **9**, 749-759.
- Bünemann, M., Gerhardstein, B.L., Gao, T. and M.M., H. (1999) Functional Regulation of L-type Calcium Channels via Protein Kinase A-mediated Phosphorylation of the  $\beta_2$  Subunit. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33851-33854.
- Buraei, Z. and Yang, J. (2010) The  $\beta$  subunit of voltage-gate  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Physiol. Rev.*, **90**, 1461-1506.
- Canti, C., Davies, A., Berrow, N.S., Butcher, A.J., Page, K.M. and Dolphin, A.C. (2001) Evidence for two concentration-dependent processes for  $\beta$ -subunit effects on  $\alpha_{1b}$  calcium channels. *Biophys. J.*, **81**, 1439-1451.
- Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L. and Perez-Reyes, E. (1993) Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit. *J. Biol. Chem.*, **268**, 12359-12366.

- Catalucci, D., Zhang, D.-H., De Santiago, J., Aimond, F., Barbara, G., Chemin, J., Bonci, D., Picht, E., Rusconi, F., Dalton, N.D., Peterson, K.L., Richard, S., Bers, D.M., Brown, J.H. and Condorelli, G. (2009) Akt regulates L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity by modulating  $\text{Ca}_v\alpha_1$  protein stability. *J. Cell. Biol.*, **184**, 923-933.
- Catterall, W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 521-555.
- Ceci, M., Ross Jr., J. and Condorelli, G. (2004) Molecular determinants of the physiological adaptation to stress in the cardiomyocyte: a focus on AKT. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **37**, 905 – 912.
- Chien, A.J., Zhao, X.L., Shirokov, R.E., Puri, T.S.C., C.F., Sun, D., Rios, E. and Hosey, M.M. (1995) Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J. Biol. Chem.*, **270**, 30036-30044.
- Clapham, D.E. (2007) Calcium signaling. *Cell*, **131**, 1047-1058.
- Colbran, R.J. (2004) Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.*, **378**, 1-16.
- Colecraft, H.M., Alseikhan, B., Takahashi, S.X., Chaudhuri, D., Mittman, S., Yegnasubramanian, V., Alvania, R.S., Johns, D.C., Marbán, E. and Yue, D.T. (2002) Novel functional properties of  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\beta$  subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. *J. Physiol.*, **541.2**, 435–452.
- Correll, R.N., Pang, C., Niedowicz, D.M., Finlin, B.S. and Andres, D.A. (2008) The RGK family of GTP-binding proteins: Regulators of voltage-dependent calcium channels and cytoskeleton remodeling. *Cell Signal.*, **20**, 292-300.
- Dai, S., Hall, D.D. and Hell, J.W. (2009) Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol. Rev.*, **89**, 411-452.
- Davare, M.A. and Hell, J.W. (2003) Increased phosphorylation of the neuronal L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\text{Ca}_v1.2$  during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 16018-16023.
- De Guiseppe, A., Forti, K., Feliziani, F., Severi, G. and Cagiola, M. (2010) Purification by Strep-Tactin affinity chromatography of a delete envelope gp51 protein of Bovine Leukaemia virus expressed in Sf21 insect cells. *Protein J.*, **29**, 153-160.
- De Jongh, K.S., Murphy, B.J., Colvin, A.A., Hell, J.W., Takahashi, M. and Catterall, W.A. (1996) Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3', 5' cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry.*, **35**, 10392-10402.
- De Jongh, K.S., Warner, C., Colvin, A.A. and Catterall, W.A. (1991) Characterization of the two size forms of the  $\alpha_1$  Subunit of Skeletal muscle L-Type Calcium Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 10778-10782.
- deAlmeida, A.C., van Oort, R.J. and Wehrens, X.H. (2010) Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp.*, **21**.
- Dimitratos, S.D., Woods, D.F., Stathakis, D.G. and Bryant, P.J. (1999) Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family. *Bioessays.*, **21**, 912-921.
- Dolphin, A.C. (2003)  $\beta$ -subunits of voltage-gated calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **35**, 599-620.
- Drakas, R., Prisco, M. and Baserga, R. (2005) A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells. *Proteomics*, **5**, 132-137.
- Dzhura, I., Wu, Y., Colbran, R.J., Balsler, J.R. and Anderson, M.E. (2000) Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 173-177.
- Everett, A.D., Tufro-McReddie, A., Fisher, A. and Gomez, R.A. (1994) Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor- $\beta$ 1 expression. *J. Hypertens.*, **23**, 587-592.
- Fayard, E., Xue, G., Parcellier, A., Bozulich, L. and Hemmings, B.A. (2010) Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr Top Microbiol Immunol.*, **346**, 31-56.
- Flynn, R. and Zamponi, G.W. (2011) Regulation of calcium channels by RGK proteins. *Channels*, **4**, 434-439.

- Frelet-Barrand, A., Boutigny, S., Kunji, E.R. and Rolland, N. (2010) Membrane protein expression in *Lactococcus lactis*. *Methods Mol. Biol.*, **601**, 67-85.
- Fuller, M.D., Emrick, M.A., Sadilek, M., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (2010) Molecular Mechanism of Calcium Channel Regulation in Fight-or-Flight Response. *Sci. Signal.*, **141**, ra70,71-10.
- Gerhardstein, B.L., Puri, T.S., Chien, A.J. and Hosey, M.M. (1999) Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the  $\beta 2$  subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochem. J.*, **38**, 10361-10370.
- Gloeckner, C.J., Boldt, K., Schumacher, A., Roepman, R. and Ueffing, M. (2007) A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes. *Proteomics*, **7**, 4228-4234.
- Gonzalez-Gutierrez, G., Miranda-Laferte, E., Neely, A. and Hidalgo, P. (2007a) The Scr homology 3 domain of the  $\beta$ -subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction. *J. Biol. Chem.*, **282**, 2156-2162.
- Gonzalez-Gutierrez, G., Miranda-Laferte, E., Neely, A. and Hidalgo, P. (2007b) The Scr homology 3 domain of the  $\beta$ -subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction. *J Biol Chem*, **282**, 2156-2162.
- Gregg, R.G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M., Moss, R., Behan, M., Sukhareva, M., Haynes, S., Powell, J.A. and Coronado, R. (1996) Absence of the  $\beta$  subunit (CCNB1) of skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the  $\alpha_1$  subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 13961-13966.
- Grueter, C.E., Dzhura, I., Wu, Y., Ham, A.-J.L., Mohler, P.J., Anderson, M.E., Colbran, R.E. and Abiria, S.A. (2006) L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CamKII. *Moll Cell*, **23**, 641-650.
- Hall, D.D., Feekes, J.A., Arachchige Don, A.S., Shi, M., Hamid, J., Chen, L., Strack, S., Zamponi, G.W., Horne, M.C. and Hell, J.W. (2006) Binding of protein phosphatase 2A to the L-type calcium channel Cav1.2 next to Ser1928, its main PKA site, is critical for Ser1928 dephosphorylation. *Biochemistry.*, **45**, 3448-3459.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*, **391**, 85-100.
- Hanlon, M.R., Berrown, N.S., Dolphin, A.C. and Wallace, B.A. (1999) Modelling of a voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel beta subunit as basis for understanding its functional properties. *FEBS Lett.*, **445**, 366-370.
- Herasimenka, Y., Kotasinska, M., Walter, S. and Schrepf, H. (2010) A selective assay to detect chitin and biologically active nano-machineries for chitin-biosynthesis with their intrinsic chitin-synthase molecules. *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 3122-3237.
- Herzberg, C., Weidinger, L.A.F., Dörrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J. and Commichau, F.M. (2007) SPINE: A method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. *Proteomics*, **7**, 4031-4035.
- Hidalgo, P. and Neely, A. (2007) Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel beta-subunit. *Cell Calcium.*, **42**, 489-496.
- Hofmann, F., Lacinová, L. and Klugbauer, N. (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **139**, 33-87.
- Hudmon, A., Schulman, H., Kim, J., Maltez, J.M., Tsien, R.W. and Pitt, G.S. (2005) CaMKII tethers to L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, establishing a local and dedicated integrator of  $\text{Ca}^{2+}$  signals for facilitation. *J. Cell Biol.*, **171**, 537-547.
- Hullin, R., Khan, J.F., Wirtz, S., Mohacsi, P., Varadi, G., Schwartz, A. and Herzig, S. (2003) Cardiac L-type calcium channel beta-subunits in human heart have differential effects on single channel characteristics. *J. Biol. Chem.*, **24**, 21623-21630.
- Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F. and Flockerzi, V. (1992) Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.*, **11**, 885-890.

- Ji, Y., Li, B., Reed, T.D., Lorenz, J.N., Kaetzel, M.A. and Dedman, J.R. (2003) Targeted inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac longitudinal sarcoplasmic reticulum results in decreased phospholamban phosphorylation at threonine 17. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25063–25071.
- Ji, Y., Zhao, W., Li, B., Desantiago, J., Picht, E., Kaetzel, M.A., Schultz, J., Kranias, E.G., Bers, D.M. and Dedman, J.R. (2006) Targeted inhibition of sarcoplasmic reticulum CaMKII activity results in alterations of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and cardiac contractility *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, H599–H606.
- Johar, S., Cave, A.C., Narayanapanicker, A., Grieve, D.J. and Shah, A.M. (2006) Aldosterone mediates angiotensin II induced interstitial fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FEBS J.*, **9**, 1546-1548.
- Junttila, M.R., Saarinen, S., Schmidt, T.G., Kast, J. and Westermarck, J. (2005) Single-step Strep-tag purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells. *Proteomics*, **5**, 1199-1203.
- Kalipatnapu, S. and Chattopadhyay, A. (2005) Membrane protein solubilization: recent advances and challenges in solubilization of serotonin<sub>1A</sub> receptors. *Life*, **57**, 505-512.
- Kamp, T.J., Hu, H. and Marban, E. (2000) Voltage-dependent facilitation of cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels expressed in HEK-293 cells requires beta-subunit. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **278**, 126-136.
- Lawlor, M.A., Mora, A., Ashby, P.R., Williams, M.R., Murray-Tait, V., Malone, L., Prescott, A.R., Lucocq, J.M. and Alessi, D.R. (2002) Essential role of PKD1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO J.*, **21**, 3728-3738.
- Lee, T.S., Karl, R., Moosmang, S., Lenhardt, P., Klugbauer, N., Hofmann, F., Kleppisch, T. and Welling, A. (2006) Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type  $\text{Ca}_v1.2$  calcium channel: identification of the phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.*, **281**, 299-304.
- Lemke, T., Welling, A., Christel, C.J., Blaich, A., Bernhard, D., Lenhardt, P., Hofmann, F. and Moosmang, S. (2008) Unchanged beta-adrenergic stimulation of cardiac L-type calcium channels in  $\text{Ca}_v1.2$  phosphorylation site S1928A mutant mouse. *J. Biol. Chem.*, **283**, 34738-34744.
- Lichty, J.J., Malecki, J.L., Agnew, H.D., Michelson-Horowitz, D.J. and Tan, S. (2005) Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression Purif.*, **41**, 98-105.
- Ludwig, A., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1997) Regional expression and cellular localization of the  $\alpha 1$  and  $\beta$  subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J. Neurosci.*, **17**, 1339-1349.
- McMullen, J.R., Shioi, T., Huang, W.Y., Zhang, L., Tarnavski, E., Bisping, E., Schinke, M., Kong, S., Sherwood, M.C. and Brown, J. (2004) The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase (p110 $\alpha$ ) pathway. *J. Biol. Chem.*, **279**.
- Melzer, W., Andornache, Z. and Ursu, D. (2006) Functional roles of the gamma subunit of skeletal muscle DHP-receptor. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **27**, 307-314.
- Müller, C.S., Haupt, A., Bildl, W., Schindler, J., Knaus, H.-G., Meissner, M., Rammner, B., Striessnig, J., Flockerzi, v., Fakler, B. and Schulte, U. (2010) Quantitative proteomics of the  $\text{Ca}_v2$  channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 14950-14957.
- Murakami, M., Fleischmann, B., De Felipe, C., Freichel, M., Trost, C., Ludwig, A., Wissenbach, U., Schwegler, H., Hofmann, F. and Hescheler, J. (2002) Pain perception in mice lacking the  $\beta_3$  subunit of voltage-activated calcium channels. *J. Biol. Chem.*, **277**, 40342-40351.
- Muth, J.N., Bodi, I., Lewis, W., Varadi, G. and Schwartz, A. (2001) A  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent transgenic model of cardiac hypertrophy - a role for protein kinase  $\text{C}\alpha$ . *Circulation*, **103**, 140-147.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K. and Behringer, R. (2003) *Manipulating the mouse embryo*. Inglis, J., New York.
- Nakayama, H., Chen, X., Baines, C.P., Klevitsky, R., Zhang, X., Zhang, H., Jaleel, N., Hewett, T.E., Robbins, J., Houser, S.R. and Molkenstin, J.D. (2007)  $\text{Ca}^{2+}$  and mitochondrial-dependent

- cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J. Clin. Invest.*, **117**, 2431-2444.
- Ono, K. and Iijima, T. (2010) Cardiac T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the heart. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **48**, 65-70.
- Perez-Reyes, E., Castellano, A., Kim, H.S., Bertrand, P., Baggstrom, E., Lacerda, A.E., Wie, X. and Birnbaumer, L. (1992) Cloning and expression of cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel. *J. Biol. Chem.*, **267**, 1792-1797.
- Pietrobon, D. and Hess, P. (1990) Novel mechanism of voltage-dependent gating in L-type calcium channels. *Nature*, **346**, 651-655.
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T.P. and Campbell, K.P. (1994) Calcium channel  $\beta$ -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha_1$ -subunit. *Nature*, **368**, 67-70.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 1030-1032.
- Ruth, P., Röhrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H.E., Flockerzi, V. and Hofmann, F. (1989) Primary structure of the beta subunit of DHP sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*, **245**, 1115-1118.
- Schmidt, T.G. and Skerra, A. (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.*, **2**, 1528-1535.
- Schrader, J. and Kelm, M. (2005) Das Herz. In Klinker, R., Pape, H.-C. and Silbernagel, S. (eds.), *Physiologie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, Vol. 5., pp. 137-174.
- Seisenberger, C., Specht, C., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A. and Kuhbandner, S. (2000) Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type  $\alpha_{1C}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ) calcium channel gene in the mouse. *J. Biol. Chem.*, **275**, 39193-39199.
- Takahashi, S.X., Miriyala, J., Tay, L.H., Yue, D.T. and Colecraft, H.M. (2005) A  $\text{Ca}_v\beta$  SH3/guanylate kinase domain interaction regulates multiple properties of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J. Gen. Physiol.*, **126**, 365-377.
- Thomas, K.R., Folger, K.R. and Capecchi, M.R. (1986) High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, **44**, 419-428.
- Van Petegem, F., Clark, K.A., Chatelain, F.C. and Minor, D.L.J. (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel  $\beta$ -subunit and an  $\alpha$ -subunit domain. *Nature*, **429**, 671-675.
- Van Petegem, F., Duderstadt, K.E., Clark, K.A., Wang, M. and Minor, D.L.J. (2008) Alanine-scanning mutagenesis defines a conserved energetic hotspot in the  $\text{Ca}_v\alpha_1$  AID- $\text{Ca}_v\beta$  interaction site that is critical for channel modulation. *Cell Structure*, **16**, 280-294.
- Van Petegem, F. and Minor, D.L.J. (2006) The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation. *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 887-893.
- Vasilescu, J. and Figeys, D. (2006) Mapping protein-protein interactions by mass spectrometry. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 394-399.
- Viard, P., Butcher, A.J., Helt, G., Davies, A., Nürnberg, B., Heblich, F. and Dolphin, A.C. (2004) PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat. Neurosci.*, **7**, 939-946.
- Warth, L., Haug, I. and Altenbuchner, J. (2011) Characterization of the tyrosin recombinase MrpA encoded by *Streptomyces coelicolor* A3(2) plasmid SCP2. *Arch. Microbio.*, **193**, 187-200.
- Weissgerber, P., Held, B., Bloch, W., Kaestner, L., Chien, K.R., Fleischmann, B.K., Lipp, P., Flockerzi, V. and Freichel, M. (2006) Reduced cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in  $\text{Ca}_v\beta_2^{-/-}$  embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circ. Res.*, **99(7)**, 749-757.
- Wheeler, D.G., Barrett, C.F., Groth, R.D., Safa, P. and Tsien, R.W. (2008) CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription coupling. *J. Cell Biol.*, **183**, 849-863.

- 
- Wu, Y., MacMillan, L.B., Mc Neill, R.B., Colban, R.J. and Anderson, M.E. (1999) CaM kinase augments cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias. *Am. J. Physiol.*, **276**, 2168-2178.
- Wu, Y., Temple, J., Zhang, R., Dzhura, I., Zhang, W., Trimble, R., Roden, D.M., Passier, R., Olson, E.N., Colbran, R.J. and Anderson, M.E. (2002) Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation*, **106**, 1288-1293.
- Xiao, R.P., Cheng, H., Lederer, W.J., Suzuki, T. and Lakatta, E.G. (1994) Dual regulation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 9695-9663.
- Xu, L., Dongwu, L., Cheng, J., Lim, H.J., Keskanokwong, T., Backs, J., Olson, E.N. and Wang, Y. (2010) Alterations of L-type calcium current and cardiac function in CaMKII $\delta$  knockout mice. *Circ. Res.*, **107**, 398-407.
- Yuan, W. and Bers, D.M. (1994) Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-Calmodulin-dependent kinas. *Am. J. Physiol.*, **267**, 982-993.

## 8 Anhang

### 8.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
$\alpha^{32}\text{PdCTP}$	Hartmann Analytic
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	biostep
Agarose LE	Biozym
Ampicillin	Sigma
Ammoniumacetat	Roth
BCA Protein Assay, Pierce	Thermo Fisher
Borsäure	Roth
Bromophenolblau	Roth
BSA (Bovines Serum Albumin)	Roth
Calpain InhibitorI	Roche
Calpain InhibitorII	Roche
Deoxycholat	Sigma
DEPC	Roth
DMEM	Invitrogen
DMSO	Roth
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
ECL	Perkin Elmer
EDTA	Roth
Esgro™LIF	Millipore
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
FBS	Invitrogen
Geneticin (G418)	Invitrogen
GST-Sepharose 4B	GE
Isopropanol	Roth
IPTG (Isopropylthiogalactopyranosid)	Sigma
kb-Leiter (DNA Molecular Weight Marker X)	Roche
L-Glutathion reduced	Sigma
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Lysoszym	Roche
Ketavet, 100 mg/ml	Pfizer
M16-Medium	Sigma
M2-Medium	Sigma
Methanol	Roth
Mercaptoethanol ( $\beta$ ME)	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumchlorid, isotone Lösung 0,9%	Braun
Natriumdodecylsulfat	Roth
Natriumacetat	Roth
NorthernMaxR-Gly	Ambion
Quantum286	PAA
OptiMEM <i>reduced Serum Medium with GlutaMAX</i>	Invitrogen
OptiMEM <i>reduced Serum Medium</i>	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin 100x	Invitrogen
PhenolChloroform	Roth
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth
PMSF	Fluka
Polyacrylamid (PAGE)	Roth
PolyA™ Spin Kit	NEB
Precision Plus Protein Standard	Biorad
ProteinA-Sepharose	Sigma



Proteinase K	Roche
RNaseA	Roche
RNA-Ladder, 0,5-10 kb	Invitrogen
Rompun, 2%	Bayer
Rotiphorese®Gel 40 (29:1)	Roth
Sarkosyl	Chemicon
ssDNA (DNA from Hering sperm)	Sigma
TrisBase	Roth
TrisHCl	Roth
Trizol	Invitrogen
TritonX-100	Sigma
Trypsin/EDTA 10x	Invitrogen
Tween 20	Roth
Ventranquil, 1%	Albrecht
Xylencyanol	Sigma

## 8.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

### Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bakterienschüttler Certomat®R/H	B.Braun
Curix 60 Filmentwickler	AGFA
Druckdosierer Cell Tram Oil	Eppendorf
GenePulser	Biorad
Inkubator	Memmert
Inkubator (CO <sub>2</sub> )	Binder
Inkubator HERAcell (CO <sub>2</sub> )	Hereaus
LaminAir HB2448	Hereaus
Mikromanipulator Modell MMN-1	Narishige
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss
Mikroskop Stemi 2000	Zeiss
MiniProtean3Cell Gelkammer	Biorad
Nanodrop®Spectrophotometer ND-1000	peqlab,
pH-Messgerät pH211	Hanna Instruments
Phosphoimager Cyclon®Plus	Perkin Elmer
Phosphoimagerplatte	Kodak
PCR Geräte Unoll/T1 Thermocycler	Biometra
Rotator	Neolab
Semi-dry Blotter Multiphor II	Pharmacia LKB
Szintillationsmessgerät	Packard
Taumelmischer	Neolab
Tischzentrifuge	Eppendorf
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Ultrazentrifuge	Beckmann
Vakuumzentrifuge	Bachofer
Überkopfschüttler Rotator	Neolab
Wasserbäder	Köttermann, Haake

### Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Petrischalen 3 cm	Nunc
Petrischalen 10 cm	Corning

Falkon 15 ml	Corning
Falkon 50 ml	TPP
Wellplatten (6, 24, 96)	Corning
Cryovial	Nunc
Kulturflaschen ES	Corning
Kulturflaschen HEK	TPP
Stripetten	Corning
Pateurpipetten	Roth
Parafilm	Roth
Haltekapillare 35° GC-100T-10	Biomedical Instruments
Injektionskapillare 20° 100, Gr.40	Biomedical Instruments
Transferpipette, 115-124 µm,	Biomedical Instruments
Transferpipette, 125-134 µm,	Biomedical Instruments
polyA Spin™ mRNA Isolation Kit	NEB
Southernfolie	GE (Amersham)
illustra NICK Columns	GE
EP-Küvetten Klonieren (#712020)	peqlab,
EP-Küvetten Stammzellen(#712010)	peqlab
Whatman 3 MM	Schleicher und Schüll
Hyperfilm ECL	GE
Immobilon-P (PVDF-Membran)	Millipore

### 8.3 Enzyme

#### Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen. Ausnahmen sind markiert und der Hersteller ist angegeben.

Bezeichnung	Restriktionssequenz
Acc65I	GGT ACC
BamHI	GGA TCC
BspHI	TCA TGA
Clal	ATC GAT
DpnI*	CATC (Agilent)
EcoRI	GAA TCC
NotI	GCG GCC GC
PstI	CTG CAG
XbaI	TCT AGA
XhoI	CTC GAG

#### Polymerasen

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase	NEB	DNA-Amplifikation für Klonierungen
Expand High Fidelity PCR System	Roche	DNA-Amplifikation für Klonierungen
Pfu Ultra	Agilent	Quik Change II Mutagenese
Taq DNA Polymerase	GenScript	Genotypisierung der Mausezucht
GoTaq® Hot Start Polymerase	Promega	Genotypisierung der ES-Zellen
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen	Umschreiben RNA in cDNA

Weitere Enzyme

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
Cre-Rekombinase	NEB	Funktionalitätstest der loxP-Sequenzen
T4 DNA Ligase	NEB	Ligation von DNA-Fragmenten
CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	NEB	Dephosphorylierung gecutteter Vektoren

**8.4 Oligonukleotide**

Oligonukleotidprimer sind ein notwendiger Bestandteil der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). PCR-Primer können Mutationen und Restriktionssequenzen enthalten und dienen der Amplifikation bestimmter genomischer DNA-Bereiche. Desweiteren werden Oligonukleotide zur Sequenzierung von Plasmiden und genomischer DNA verwendet (Sequenzierprimer). Alle Primer werden von MWG Eurofins, Ebersberg bezogen.

PCR-Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Veränderungen und eingefügte Basen sind farbig hervorgehoben.

Primer	Sequenz in 5' – 3'-Richtung	Verwendung
Mob2_22_for	TAA ACT GGC CCA ATG TCC	pBl(XbaI-XbaI)
Mob2_23_re	CCC AAT GGA GGA GCT AGA GAA	pBl(XbaI-XbaI)
XbaI_for	ATG AGA ACC AGC TGG AGG AC	pBl(ClaI-PstI)
PstI_re	TCC CAC TTG TTA TCT GCG CTG C	pBl(ClaI-PstI)
PstI_for	ATG TGG ACC GGT ATG TCC CA	pBl(PstI-XhoI)
XhoI_re	TCA GGA TTC TAC CAC GGA GTT GGT TA	pBl(PstI-XhoI)
XhoI_for	AGT CCA GTG CTA ATG GAT	pBl(XhoI-EcoRI)
EcoRI_re	AGG CCA AGA TCT TAA GCG AGA	pBl(XhoI-EcoRI)
pUC_Kpn_for	GTA AAA CGA CGG CCA GTG GTA CCC CCA GA	pBl(XhoI-Acc65I)
pUC_re	CAG GAA ACA GCT ATG AC	pBl(XhoI-Acc65I)
quikMUT_for	CAA GGT GAT CAA AGG TGA* TCG CTC TGC TCC CCG	Einfügen Stop-Mutation in E14
quikMUT_re	CGG GGA GCA GAG CGA ACT* CCT TTG ATC ACC TTG	Einfügen Stop-Mutation in E14
quikInsertCla_for	GCG GCC GCT CTA GAA TCG ATA TAG TAC ATG TCC C	Einfügen ClaI in pBl(ClaI-PstI)
quikInsertCla_re	GGG ACA TGT ACT ATA TCG ATT CTA GAG CGG CCG C	Einfügen ClaI in pBl(ClaI-PstI)
5'Verl_for	GCG ATC GCG GCC GCC TGT TTA ACC TTT ACA G	NotI, 5'Verlängerung
5'Verl_re	CCC AGA GCG GCC GCA TAA AAT ACA ACG TAG AG	NotI, 5'Verlängerung
Genotyp_for	GCA CTT CCT TTT ATG GTC TTC	Genotypisierung der Ki-Linie
Genotyp_re	ACC AAA GGG GCA AGA ATG	Genotypisierung der Ki-Linie
Neo1_re	CTA CCC GGT AGA ATT GAC	Genotypisierung der Ki-Linie
RE22_re	GAA TTG ACC TGC AGG GGC CCT	PCR-Screen der Stop-ES-Zellen
PCRSscreen3_for	CTC AGC ATC AGC TTT ACT CTT G	PCR-Screen der Stop-ES-Zellen
Check1	TAG GTC CCT CGA AGC TTA	Amplifikation 3'Arm in ES-Zellen
3'ArmScr12	TTC TTC AGC TTG GGA AGC AG	Amplifikation 3'Arm in ES-Zellen
pGEX_HindIII_for	TTC CAG GGG CCC CTG AAG CTT CTT GAC AGG CAC CTC	Einführen HindIII in pGEX-Cavβ2
pGEX_HindIII_re	GAG GTG CCT GTC AAG AAG CTT CAG GGG CCC CTG GAA	Einführen HindIII in pGEX-Cavβ2
pGEX_BamHI_for	GTT TAC ATC CGC CAA GGA TCC GCG GCC GCA TCG TG	Einführen BamHI in pGEX-Cavβ2
pGEX_BamHI_re	TCA CGA TGC GGC CGC GGA TCC TTG GCG GAT GTA AAC	Einführen BamHI in pGEX-Cavβ2
quikBamHI_for	TTT ACA TCC GCC AAG GAT CCC TTG TGC CCT TTT G	BamHI in pcDNA3Cavβ2
quikBamHI_re	CAA AAG GGC ACA AGG GAT CCT TGG CGG ATG TAA A	BamHI in pcDNA3Cavβ2
quikInsBamHI_for	ATG TAT ACA TCC GCC AAG GAT CCC CGT GCG TGT CC	Ersetzen Stop durch BamHI E14
quikInsBamHI_re	GGA CAC GCA CGG GGA TCC TTG GCG GAT GTA TAC AT	Ersetzen Stop durch BamHI E14
Neo3_re	TTC AGA CCT AAT AAC TTC GTA TAG	PCR-Screen der Strep-ES-Zellen
StrepPCRScr3_for	ATG CTC ACT AAC AT GGC	PCR-Screen der Strep-ES-Zellen

Sequenzierprimer

Primer	Sequenz in 5' – 3'-Richtung	Verwendung
pUC_for	GTA AAA CGA CGG CCA GT	End- und Zwischenvektoren
pUC_re	CAG GAA ACA GCT ATG AC	End- und Zwischenvektoren
pcDNA3_for	GGC TAA CTA GAG AAC CCA CTG	pcDNA3-Konstrukte
pcDNA3_re	GGC AAC TAG AAG GCA CAG TC	pcDNA3-Konstrukte
pGEX_re	GAG CTG CAT GTG TCA GAG G	pGEX-Konstrukt
Check1_for	TAG GTC CCT CGA AGC TTA	End- und Zwischenvektoren
5'ArmScr1	GAA GAG GTC CAT CTT ACA AAC C	End- und Zwischenvektoren
5'ArmScr2	AAC TCT TCT GCA CTG TCC	End- und Zwischenvektoren
5'ArmScr3	GCA TAC TG AAG GCC ACC	End- und Zwischenvektoren
5'ArmScr4	CTC CAG ATA GTC GGC AAG	End- und Zwischenvektoren
5'ArmScr5	TAG CCT CCT CAA CTT TAC	End- und Zwischenvektoren
3'ArmScr1	TAG CAA TGG CAT GCA ATC	End- und Zwischenvektoren
3'ArmScr3	GTA ACC AAA CTC CAG AGG	End- und Zwischenvektoren
3'ArmScr4	CAA TCT TTG TGT GTC AGA G	End- und Zwischenvektoren
3'ArmScr5	TGC CTG TGT TAA GAA GCT TAG	End- und Zwischenvektoren
3'ArmScr6	CTC GTA GGC ATT TAT GTA AAG C	End- und Zwischenvektoren
3'ArmScr7	CTG GAA CTC ACT TTG TAG AC	End- und Zwischenvektoren
3'ArmScr8	TTT GGC ACA GTA AAG CAC	End- und Zwischenvektoren
3'ArmScr9	TCT GCT TCC CAA GCT GAA G	End- und Zwischenvektoren
3'ArmScr10	CTA CCC AAA CAG CTT TTG	End- und Zwischenvektoren
3'ArmScr11	AAT AAT CTT CCT TTG GCT CC	End- und Zwischenvektoren
3'ArmScr12	TTC TTC AGC TTG GGA AGC AG	End- und Zwischenvektoren
MutScreen1	AAA GTC CCC CAC ACA TTC	End- und Zwischenvektoren
MutScreen2	ACA AGA GAC AAC TCG TGT TT	End- und Zwischenvektoren
Seq_cDNA_E8	CCT TCT TTA AGA AGA CAG AGC	cDNA Ca <sub>v</sub> β <sub>2</sub> STOP-Maus
Seq_cDNA_E11	CCA GCT TAG CGG AAG TTC	cDNA Ca <sub>v</sub> β <sub>2</sub> STOP-Maus
Seq_cDNA_E14	ACA GGG TTC TCA AGG TGA TC	cDNA Ca <sub>v</sub> β <sub>2</sub> STOP-Maus

**8.5 Antikörper**

Bezeichnung und Ursprung	Protein	Verdünnung	Bezugsquelle/Referenz
Anti-Cav1.2, rabbit	Cav1.2	1:250	Prof. F. Hofmann, TU München
Anti-Cavβ2v2, rabbit	Cavβ2, C-terminal	1:200	Prof. F. Hofmann, TU München
Anti- Cavβ2-N4/1195, rabbit	Cavβ2, N-terminal	1:1000	Prof. V. Flockerzi, Homburg
Anti-MAPK (p44/42), rabbit	MAPK, Ladekontrolle	1:1000	Cell Signaling Technology™
StrepMAB HRP, mouse	Strep-Fusionsprotein	1:33 333	IBA AG, Göttingen
TactinHRP	Strep-Fusionsprotein	1:100 000	IBA AG, Göttingen
GAR HRP, goat	Sekundär Antikörper	1:50 000	Dianova
GAM HRP, goat	Sekundär Antikörper	1:50 000	Dianova

# DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Herrn PD Dr. Sven Moosmang und Herrn Prof. Schemann dafür danken, dass sie mir das Vertrauen entgegengebracht haben, eine Doktorarbeit auf dem Gebiet der Molekularbiologie zu beginnen und diese erfolgreich abzuschließen.

Ich danke Dr. Moosmang für die zahlreichen Hilfestellungen und Denkanstöße, für seine unmittelbare Erreichbarkeit bei Problemlagen und Zwickmühlen. Ich konnte sehr viel von ihm lernen, sowohl auf fachlicher Ebene als auch bei Präsentationen oder bei der Anleitung neuer Arbeitsgruppenmitglieder. Für die Möglichkeit, im Namen des Lehrstuhls für Humanbiologie am WZW zu promovieren, möchte ich mich bei Herrn Prof. Schemann herzlich bedanken.

An zweiter Stelle geht mein Dank an die Direktoren des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der TU München, Herrn Prof. Franz Hofmann und Herrn Prof. Stefan Engelhardt, die mir ermöglicht haben meine Doktorarbeit an ihrem Institut durchzuführen. Es war eine spannende Zeit mit immer neuen Herausforderungen.

Ein wichtiger und herzlicher Dank gebührt meinen Kollegen aus der AG Moosmang, AG Hofmann und AG Engelhardt, die unerlässlich waren, um freudige Ereignisse zu feiern, aber auch um gemeinsam Probleme zu lösen.

Einen besonderen Dank möchte ich dabei Steffi und Carl sagen, die mich in die Pharmakologie und die Generierung und Analyse von Mausmodellen eingeführt haben. Es war ein super Jahr mit euch beiden!

Als Sonnenschein mit stetig guter Laune und aufbauenden Worten war Angela mein „Amphetamin“ der Promotion: Danke dass du so ein toller Support-Act auf der Bühne meiner Doktorarbeit warst und bist!

Danke liebe Eva, für schöne Tage im Labor und in der Natur, liebe Sophie für deinen trockenen Humor, Katrin und Bea für eure unendliche Geduld und unendliche Kaffeevorräte und liebe Lulu für deine aufbauende Art.

Die Danksagung ist nur komplett, wenn ich einen essentiellen Faktor erwähne: Meine Familie. Vielen Dank Mama, Papa, Felix, Sebastian und Bernhard für eure unendliche Unterstützung und den Glauben an mich! Euch widme ich diese Arbeit. Ihr wart und seid der Cofaktor der mich erst zur Aktivität bringt!