

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München

Regulation des zytosolischen Kalziums durch IRAG

Katja Sigl

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. K.-H. Schleifer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann
2. Univ.-Prof. Dr. W. Staudenbauer

Die Dissertation wurde am 20.09.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.11.2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI

A. Einleitung 1

A.1. Kalziumregulation und Kontraktion des glatten Muskels	1
A.2. Aktivierung, Funktion und Lokalisation der cGMP-abhängigen Proteinkinasen	2
A.3. cGKI vermittelte Relaxierung des glatten Muskels	3
A.4. IRAG - ein Substratprotein der cGKI.....	5
A.5. Gene Targeting und Cre/loxP System	6
A.6. Ziele dieser Arbeit	7

B. Material und Methoden..... 9

B.1. Organismen und Plasmide.....	9
B.2. Anzucht und Stammhaltung	10
B.2.1. Nährmedium	10
B.2.2. Hemmstoffe und Medienzusätze	10
B.2.3. Kultivierung und Stammhaltung	10
B.2.4. Transformation von Bakterien.....	11
B.3. Molekularbiologische Methoden.....	12
B.3.1. Isolierung von Plasmid-DNS.....	12
B.3.2. Reinigung und Konzentrierung von DNS-Fragmenten	12
B.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	12
B.3.4. Enzymatische Modifikation von DNS	13
B.3.5. Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten.....	14
B.3.6. Agarose-Gelelektrophorese	14
B.3.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	15

B.3.8.	Sequenzierung von DNS	16
B.3.9.	Radioaktive Southernblot Analyse	17
B.4.	Kultivierung und Transfektion von COS Zellen	20
B.4.1.	Zellkultur	20
B.4.2.	Transfektion von COS-7 Zellen	21
B.5.	Isolierung und Kultivierung von VSMC	22
B.6.	Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2 (Calcium Imaging)	23
B.6.1.	Indikatorfarbstoff Fura-2	23
B.6.2.	Messtand	24
B.6.3.	Vorbereitung und Durchführung der Messungen	25
B.7.	Erzeugung genetisch veränderter Mäuse	26
B.7.1.	Kultivierung embryonaler Stammzellen	27
B.7.2.	Gewinnung embryonaler Fibroblasten	28
B.7.3.	Allgemeines Vorgehen bei der Kultivierung von ES Zellen	29
B.7.4.	Erstes Targeting: Homologe Rekombination in ES Zellen	29
B.7.5.	Zweites Targeting: Cre-vermittelte Rekombination in ES Zellen	32
B.7.6.	Injektion genetisch modifizierter ES Zellen in Blastozysten	33
B.7.7.	Testen von chimären Mäusen auf Keimbahntransmission	34
B.7.8.	Haltung und Zucht der Mäuse	35
C.	Ergebnisse	36
C.1.	Untersuchung der physiologischen Bedeutung von IRAG mittels Calcium Imaging	36
C.1.1.	Vorgehensweise der Messungen und deren Auswertung	36
C.1.2.	Kalziummessungen an COS-7 Zellen	37
C.1.3.	Kalziummessungen an glatten Gefäßmuskeln	40
C.1.4.	Effekt von 8-Br-cGMP auf die Kaliumdepolarisation in VSMC	42
C.2.	Generierung einer IRAG Knockout Maus	44
C.2.1.	Eigenschaften und Konstruktion des Targeting Vektors	44
C.2.2.	Gensonden zum Nachweis der Mutation im Genom von ES Zellen	46
C.2.3.	Funktionsanalyse der <i>loxP</i> Seiten	46
C.2.4.	Genetische Modifikation von ES Zellen	48

D.	Diskussion	56
D.1.	Physiologische Bedeutung von IRAG bei der Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration	56
D.2.	Genetische Modifikation von IRAG mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems	60
E.	Zusammenfassung	63
F.	Anhang	65
F.1.	Verwendete Oligonukleotide.....	65
F.2.	Restriktionsenzyme	66
G.	Literaturverzeichnis.....	67
G.1.	Zitierte Veröffentlichungen.....	67
G.2.	Eigene Veröffentlichungen.....	73

Abbildungsverzeichnis

Abb A-1	Zelluläre Synthesewege von cGMP	2
Abb A-2	Schema für die cGKI-abhängige Relaxierung der glatten Muskulatur	4
Abb A-3	Proteinstruktur von IRAG	5
Abb A-4	Struktur der <i>loxP</i> Seite und Produkte der Cre-vermittelten Rekombination .	7
Abb B-1	Strukturformel und Fluoreszenzintensität von Fura-2	24
Abb B-2	Herstellung genetisch veränderter Mäuse	26
Abb B-3	Homologe Rekombination und zufällige Integration	30
Abb B-4	Vorgehensweise zur Isolierung von ES Zellklonen	32
Abb C-1	Messung der hormoninduzierten Veränderung in der zytosolischen Kalziumkonzentration	37
Abb C-2	Beispiele für Kalziummessungen in COS-7 Zellen	38
Abb C-3	Histogramm aller Effekte von 8-Br-cGMP auf Bradykinin-induzierte Kalziumtransienten in COS-7 Zellen	39
Abb C-4	Beispiele für Kalziummessungen in VSMC	40
Abb C-5	Histogramm aller untersuchten Effekte von 8-Br-cGMP und cBIMPS auf Noradrenalin-induzierte Kalziumtransienten in VSMC	41
Abb C-6	Beispiele für die Effekte von 8-Br-cGMP auf die Kaliumdepolarisations-induzierten Kalziumtransienten in VSMC	42
Abb C-7	Histogramm der Effekte von 8-Br-cGMP auf die Kaliumdepolarisations-induzierten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in VSMC	43
Abb C-8	Strategie des Targeting Vektors	45
Abb C-9	PCR-Strategie zur Detektion der Cre-vermittelten Rekombination	47
Abb C-10	Southernblot Hybridisierung mit der 3' Sonde	48
Abb C-11	Nachweis der <i>loxP</i> Seite I mittels PCR	50
Abb C-12	Nachweis der homologen Rekombination durch Long-Range PCR	51
Abb C-13	Southernblot Hybridisierung mit der 5' Sonde	54
Abb D-1	Modell für die Beteiligung von IRAG an der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade im glatten Muskel	60

Tabellenverzeichnis

Tab B-1	Verwendete Organismen	9
Tab B-2	Verwendete Plasmide	9
Tab B-3	Hemmstoffe und Medienzusätze	10
Tab B-4	Zellkultur-Parameter	28
Tab C-1	Primerpaare zur Funktionsanalyse der <i>loxP</i> Seiten	46
Tab C-2	Charakterisierung der Southernblot positiven ES Zellklone	52
Tab C-3	Übersicht der reimplantierten ES Zellklone	55
Tab F-1	Verwendete Oligonukleotide (Primer)	65
Tab F-2	Verwendete Restriktionsenzyme	66

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	IRAG	IP ₃ -Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substratprotein
Abb.	Abbildung	kb	Kilobase
Ap	Ampicillin	kDa	Kilodalton
ATP	Adenosintriphosphat	l	Liter
AS	Aminosäure	LB	Lurea-Bertani
BAC	bacterial artificial chromosome	LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
bp	Basenpaar	loxP	DNS-Substrat von Cre (locus of crossing over of P1)
BSA	Rinderserumalbumin	M	Mol
C	Cytosin	m	Milli (10 ⁻³)
Ca²⁺	Kalziumionen	μ	Mikro (10 ⁻⁶)
[Ca]_i	zytosolische Kalziumkonzentration	MCS	Multiple Klonierungsstelle
Ca_v1.2	porenbildende Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals	MG od. MW	Molekulargewicht
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	min	Minute
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase	n	Nano (10 ⁻⁹)
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat	neo	Neomycinresistenzgen
cpm	counts per minute	nt	Nukleotid
Cre	Cre Rekombinase (cyclization recombination)	NO	Stickstoffmonoxid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	OD	optische Dichte
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	p.c.	<i>post coitum</i>
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat	PCR	Polymerase Kettenreaktion
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat	PLCβ	Phospholipase Cβ
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	RNS	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	rpm	Umdrehungen pro Minute
DNS	Desoxyribonukleinsäure	R	Rezeptor
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
EDTA	Natrium-ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat	s	Sekunde
EF	embryonale Fibroblasten ("Feederzellen")	SAP	Shrimps Alkaline Phosphatase
ER	Endoplasmatisches Reticulum	SDS	Natriumdodecylsulfat
ERG	Eppendorf-Reagenzgefäß	sGC	lösliche Guanylylzyklase
ES Zellen	embryonale Stammzellen	SR	Sarkoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol	SV40	simian virus 40
F	Farad (Kapazität)	T	Thymin
FCS	Fötales Kälberserum	TBE	Tris-Borat-EDTA
g	Gravitationskonstante oder Gramm	tk	Thymidinkinasegen
G	Guanin	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
G418	Geneticin ^R	U	Unit, Einheit
GANC	Ganciclovir	üN	über Nacht
gefloxt	<i>loxP</i> -flankiert	UV	Ultraviolett
GTP	Guanosintriphosphat	w	Gewicht
h	Stunde	v	Volumen
HT	Hypoxanthin, Thymidin	wt	Wildtyp
IP₃	Inositol-1,4,5,-triphosphat		
IP₃RI	Inositol-1,4,5,-triphosphat Rezeptor Typ I		

A. Einleitung

A.1. Kalziumregulation und Kontraktion des glatten Muskels

An vielen zellulären Prozessen, wie z.B. der Transkription, Proliferation und Muskelkontraktion ist Kalzium (Ca^{2+}) als ein universeller, intrazellulärer Botenstoff beteiligt. Dabei ist eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration in den meisten Zellen maßgeblich an der Auslösung dieser Prozesse beteiligt (Berridge, 1993; Berridge et al, 2000). Die Kalziumkonzentration im Zellinneren wird von vielen ineinandergreifenden Prozessen reguliert. Diese Prozesse kann man in „An-“ und „Aus-“ Mechanismen unterteilen, je nachdem ob sie für den Anstieg oder Abfall des zytosolischen Kalziums verantwortlich sind (Bootman et al, 2001). Sowohl Kanäle, die in der Plasmamembran lokalisiert sind und die Aufnahme von Kalzium aus dem Extrazellulärraum in die Zelle regulieren, als auch Kanäle des Endoplasmatischen und Sarkoplasmatischen Reticulums (ER und SR) zählen zu den „An-“ Mechanismen (Berridge et al, 2000). Zu der Gruppe der „Aus-“ Mechanismen gehören unter anderem die Ca^{2+} -ATPasen der Plasmamembran, des ER und SR. Weiter gehören dazu in der Plasmamembran lokalisierte Transporter, die sich Gradienten anderer Ionen bedienen, um Kalzium aus der Zelle zu transportieren, wie z.B. der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher.

Die Kalzium-abhängige Kontraktion der glatten Muskulatur wird über eine Hormon-Rezeptor-Bindung initiiert, so werden extrazelluläre Signale in intrazelluläre umgewandelt. Verschiedene Agonisten, wie z.B. Carbachol, Noradrenalin oder Bradykinin, aktivieren über eine Bindung an ihre Rezeptoren die GTP-bindenden Proteine (G_q oder G_{11}) und dadurch die Phospholipase $C\beta$ ($\text{PLC}\beta$). Diese generiert die „second messenger“ Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diazylglyzerol (DAG). IP_3 induziert durch eine Bindung an den IP_3 -Rezeptor, einem Kalziumkanal des ER, den Ausstrom von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern in das Zytosol, gefolgt von einem Einstrom extrazellulären Ca^{2+} durch spannungsabhängige und –unabhängige Kalziumkanäle der Zytoplasmamembran. Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt zur Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) und damit zur Phosphorylierung der Myosin-Leichten-Kette (MLC). Daraufhin kontrahiert der Muskel (Hofmann et al, 2000; Feil et al, 2003). Bei sinkender Kalziumkonzentration wird die MLC von der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) dephosphoryliert und der Muskel entspannt sich wieder.

A.2. Aktivierung, Funktion und Lokalisation der cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Die Kontraktilität der glatten Muskulatur spielt eine essentielle Rolle bei vielen biologischen Prozessen wie z.B. der Regulation des Blutdruckes oder der gastrointestinalen Motilität. Während ein Anstieg des zytosolischen Kalziums eine Kontraktion des glatten Muskels initiiert, kann die Relaxierung durch die sekundären Botenstoffe cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat) und cGMP (zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat) induziert werden. cGMP kann einerseits von der löslichen Guanylylzyklase (sGC), als auch von der partikulären Guanylylzyklase (pGC) aus GTP gebildet werden (**Abbildung A-1**).

Die Aktivierung der Guanylylzyklasen verläuft im Fall der sGC über Stickstoffmonoxid (NO), bei den drei Isoformen der pGC durch natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP) und Guanylin (Friebe und Koesling, 2003; Kuhn, 2003). Durch cGMP werden u.a. cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK) aktiviert (Pfeifer et al, 1999; Ruth, 1999; Hofmann et al, 2000). Diese sind z.B. an der Hemmung der Thrombozytenaggregation beteiligt (Horstrup et al, 1994; Massberg et al, 1999) oder führen im Fall der cGKI zu einer Relaxierung des glatten Muskels (Pfeifer et al, 1998; Sausbier et al, 2000).

Über cGMP als „second messenger“ werden noch verschiedene andere Enzyme reguliert. Dazu gehören cAMP-spezifische Phosphodiesterasen (PDE) (Sonnenburg und Beavo, 1994) und Zyklonukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG-Kanäle) in der Retina und im olfaktorischen System (Biel et al, 1998) (**Abbildung A-1**).

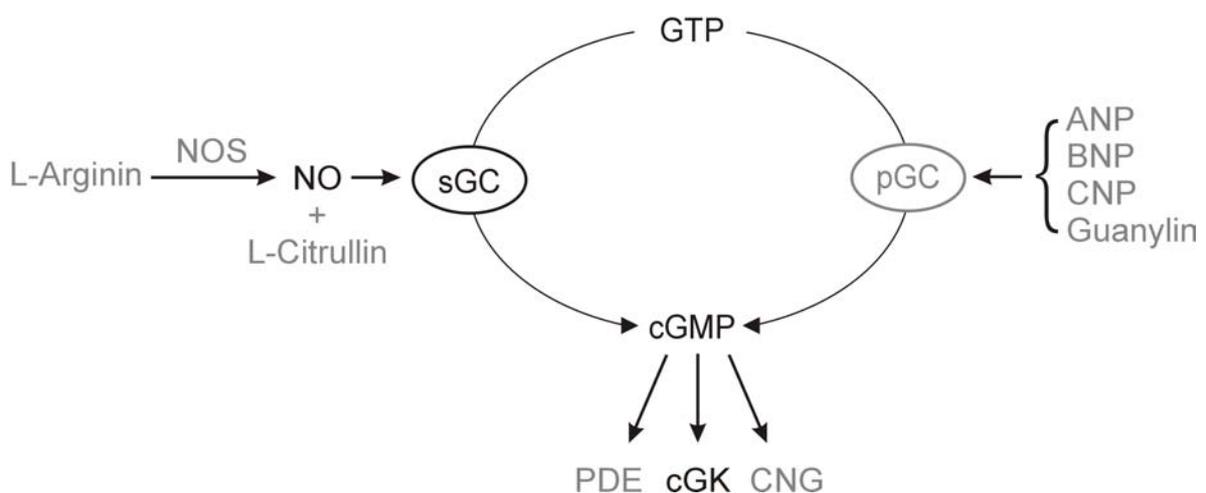


Abbildung A-1: Zelluläre Synthesewege von cGMP. Aus L-Arginin wird, katalysiert von der NO-Synthase (NOS), NO und L-Citrullin gebildet. NO aktiviert die lösliche Guanylylzyklase (sGC), die die Bildung von cGMP aus GTP vermittelt. cGMP kann zudem von der partikulären Guanylylzyklase (pGC) nach Aktivierung durch natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP) oder Guanylin gebildet werden. Zielproteine für cGMP sind Phosphodiesterasen (PDE), cGMP-abhängige Kinasen (cGK) und Zyklonukleotid-aktivierte Kationenkanäle (CNG-Kanäle).

In Säugetieren konnten zwei Gene identifiziert werden, die für cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs) kodieren. Ein Gen kodiert für die lösliche cGKI, wobei durch alternatives Spleißen zweier Exone des Aminoterminus die beiden Isoformen cGKI α und cGKI β entstehen. Ein weiteres Gen kodiert für die membrangebundene cGKII. Die cGKs gehören zu der Familie der Serin/Threonin-Kinasen, das bedeutet, sie übertragen ein γ -Phosphat von ATP auf ein Serin oder Threonin ihrer Substrate (Hofmann et al, 2000).

Das cGKI α Isoenzym wird hauptsächlich in Lunge, Herz und Cerebellum exprimiert. Die cGKI β dagegen überwiegt in glattmuskulären Geweben wie Gefäßen, Uterus und Intestinum, sowie in Thrombozyten und im Hippocampus (Keilbach et al, 1992; Geiselhöringer et al, 2004a).

Die cGKII ist durch Myristoylierung in der Membran verankert und ist durch die Phosphorylierung des CFTR Chloridkanals (Zystische Fibrose Transmembran Leitfähigkeitsregulator) an der Regulation der intestinalen Chlorid/Wasser-Sekretion beteiligt (Vaandrager et al, 1998). Exprimiert wird die cGKII in vielen Teilen des Gehirns, in der Niere, im Knochen und in der intestinalen Mucosa (Lohmann et al, 1997; Pfeifer et al, 1996).

A.3. cGKI vermittelte Relaxierung des glatten Muskels

Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass die cGMP-abhängige Proteinkinase I maßgeblich an der Relaxierung der glatten Muskulatur beteiligt ist. So zeigen z.B. Mäuse, deren Gen für die cGKI inaktiviert wurde, bereits in einem Alter unter 4 Wochen einen hypertensiven Phänotyp und eine verzögerte Magen-Darm-Passage (Pfeifer et al, 1998; Sausbier et al, 2000). Einige der bekannten Mechanismen, die unter Beteiligung der cGKI zur Relaxierung des glatten Muskels führen, sind in **Abbildung A-2** gezeigt.

Nach Aktivierung durch cGMP greift die cGKI in verschiedene Prozesse ein und nimmt dadurch Einfluss auf die zytosolische Kalziumkonzentration. Durch Phosphorylierung der Kalzium-aktivierten Kaliumkanäle (BK_{Ca}) wird deren Offenwahrscheinlichkeit erhöht. Das führt zu einer Hyperpolarisation der Membran und damit zum Schließen der spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle (z.B. L-Typ Kalziumkanäle), wodurch die [Ca²⁺]_i sinkt (Alioua et al, 1998; Fukao et al, 1999).

Neuere Studien haben gezeigt, dass die cGKI durch eine direkte Bindung RGS-2 phosphoryliert. RGS-Proteine (RGS für „Regulators of G-protein signalling“) erhöhen die GTPase Aktivität des G-Proteins um ein Vielfaches (100-1000-fach) und verringern dadurch die Halbwertszeit des an das G-Protein gebundene GTP (Hepler, 1999). Die Phosphorylierung von RGS-2 durch die cGKI führt zu dessen Bindung an das G_q-Protein und der damit verbundenen, erhöhten GTPase Aktivität (Tang et al, 2003).

Ein weiterer Mechanismus, der die $[Ca^{2+}]_i$ senkt, ist die Phosphorylierung des IP_3 -Rezeptor assoziierten cGMP-Kinase Substrates IRAG. Zusammen mit der cGKI β und dem IP_3 -Rezeptor I bildet IRAG einen trimeren Komplex und ist an der Membran des ER lokalisiert (Schlossmann et al, 2000; Ammendola et al, 2001). Die Phosphorylierung von IRAG durch die cGKI β inhibiert den Kalziumausstrom aus den intrazellulären Speichern des ER. Das überwiegend exprimierte Isoenzym der cGKI in der glatten Muskulatur ist die cGKI β (Keilbach et al, 1992). Das lässt vermuten, dass die Phosphorylierung von IRAG einer der Hauptmechanismen der Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ und somit der Regulation des Muskeltonus sein könnte (Hofmann et al, 2000).

Neben dem Einfluss auf die Kalziumkonzentration werden auch Kalzium-unabhängige Mechanismen der cGKI auf die Relaxierung der glatten Muskulatur diskutiert. Die α -Isoform der cGKI phosphoryliert die regulatorische Untereinheit (MBS für „myosin binding site“) der MLCP. Diese Phosphorylierung unterbindet eine weitere Phosphorylierung der MBS über die MLCK (Wooldridge et al, 2004).

Über die Phosphorylierung der Phospholipase C β_3 kann die cGKI zudem direkt die Synthese von IP_3 regulieren (Ruth et al, 1993; Xia et al, 2001). Ob diese Phosphorylierung eine Bedeutung für die Relaxierung der glatten Muskulatur hat, ist bisher nicht bekannt.

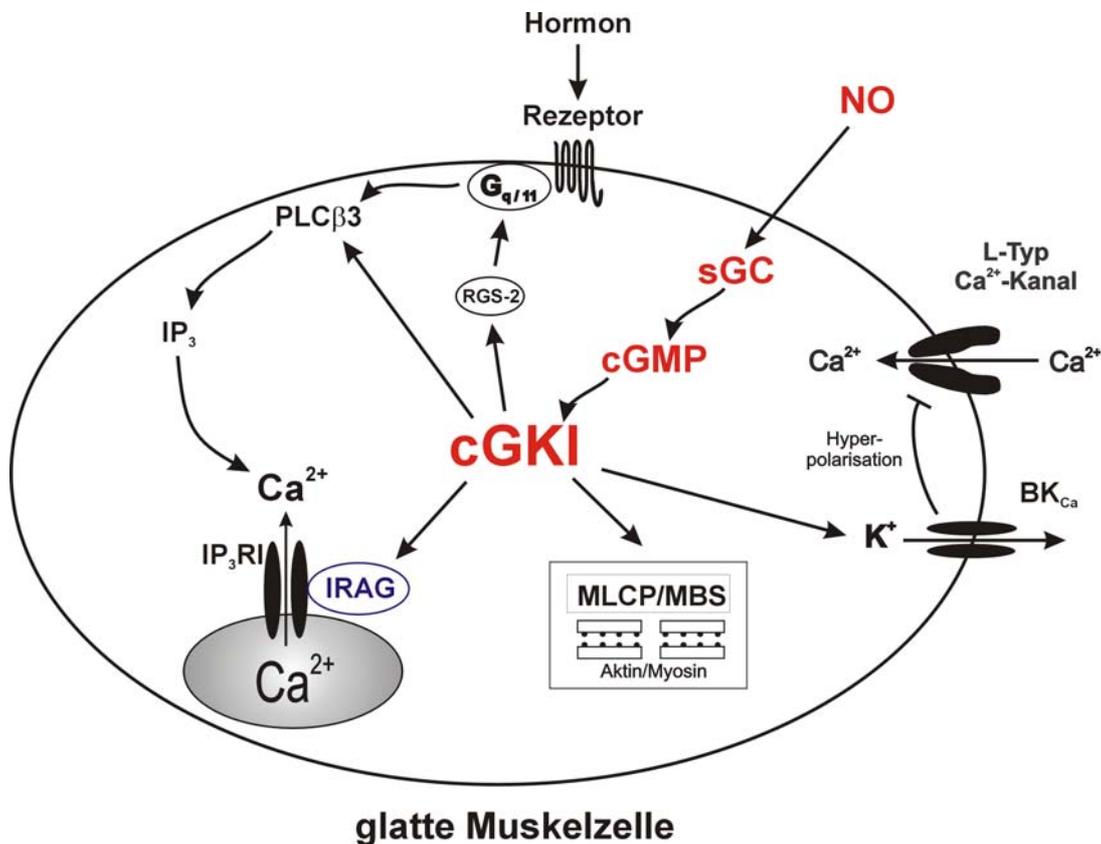


Abbildung A-2: Schema für die cGKI-abhängige Relaxierung der glatten Muskulatur. BK $_{Ca}$, RGS-2, IRAG, MBS und PLC β_3 sind Substratproteine der cGKI, deren Phosphorylierung eine Relaxierung der glatten Muskulatur zur Folge haben können. Weitere Erklärung im Text.

A.4. IRAG - ein Substratprotein der cGKI

Das 125 kDa Protein IRAG (IP₃-Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substrat) wurde vor einiger Zeit als Substratprotein der cGKI identifiziert (Schlossmann et al, 2000). Es konnte in vielen glattmuskulären Geweben nachgewiesen werden und liegt zusammen mit dem IP₃-Rezeptor Typ I und der β -Isoform der cGKI als trimerer Komplex vor. IRAG wird cGMP-abhängig durch die cGKI phosphoryliert. Die Phosphorylierungsstellen sind in **Abbildung A-3** gezeigt. Es existieren zwei Isoformen von IRAG, IRAGa und IRAGb, wobei IRAGa einen um 52 Aminosäuren längeren N-Terminus aufweist. Beide Isoformen verfügen über eine C-terminale Transmembrandomäne, die für die Verankerung des Proteins in der Membran des ER verantwortlich ist (**Abbildung A-3**). N-terminal befindet sich die Interaktionsstelle der beiden Isoformen mit der cGKI β (Ammendola et al, 2001). In funktionellen Studien mit heterolog exprimiertem IRAG in COS-7 Zellen konnte gezeigt werden, dass IRAG nach Aktivierung der cGKI β die Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern hemmt (Schlossmann et al, 2000). Diese Daten lassen vermuten, dass IRAG eine essentielle Rolle bei der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ hat.

Bei der kürzlich generierten IRAG ^{Δ 12/ Δ 12} Deletionsmutante wurde das Exon 12 des *IRAG* Gens mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems entfernt. Dieses Exon kodiert für den N-terminalen Bereich der Coiled-coil Domäne des Proteins. Auch von anderen Proteinen ist bereits bekannt, dass diese Domänen eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Proteinen spielen (Lupas, 1996). Die Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP₃ Rezeptor Typ I konnte durch diese Deletion zerstört werden (Geiselhöringer et al, 2004b).

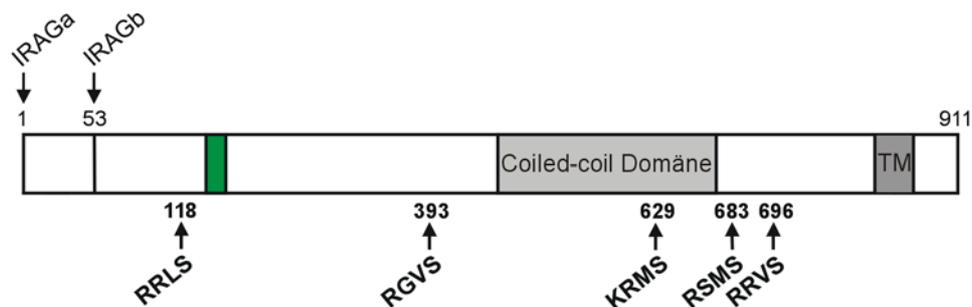


Abbildung A-3: Proteinstruktur von IRAG. ↓: Die beiden Spleißvarianten IRAGa und IRAGb. ↑: Aminosäurepositionen und Konsensussequenzen der fünf identifizierten Phosphoserine für die Phosphorylierung durch die cGKI β . Grünes Rechteck: Interaktionsstelle mit der cGKI β . TM: Transmembrandomäne.

A.5. Gene Targeting und Cre/loxP System

Die Möglichkeit, gezielt Mutationen in das Genom von Mäusen zu integrieren, hat in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Diese Methode hat wesentlich dazu beigetragen, die Funktionen von Genen und deren Proteine verstehen zu lernen. Als Gene Targeting bezeichnet man im Allgemeinen die zielgerichtete Modifikation eines bestimmten Gens innerhalb des Genoms embryonaler Stammzellen durch homologe Rekombination (Jaenisch, 1988; Capecchi, 1989).

Bei der klassischen Geninaktivierung (Knockout) erzielt man eine permanente, genetische Modifikation in der Keimbahn der Maus und damit verbunden den Verlust der Genfunktion in allen Zellen des Tieres während der prä- und postnatalen Entwicklung. Die Veränderung von essentiell lebenswichtigen Genen, oder solchen, die an der Embryonalentwicklung beteiligt sind, kann zu embryonal letalen Mausmutanten oder Tieren mit schweren Defekten und eingeschränkter Lebensfähigkeit führen. Des Weiteren ist eine gewebe- oder zeitspezifische Untersuchung der Genfunktion an Tieren mit einem konventionellen Knockout nicht möglich (Rajewsky et al, 1996).

Die konditionale Mutagenese mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems bietet im Gegensatz dazu die Möglichkeit, das Zielgen räumlich und zeitlich kontrolliert zu inaktivieren. Die Cre Rekombinase (Cre für „cyclization recombination“) ist ein 38 kDa Enzym des Bakteriophagen P1. Sie katalysiert reversibel die Rekombination zwischen zwei 34 bp *loxP* Erkennungssequenzen (*loxP* für „locus of crossing over of P1“) ohne Beteiligung eines Cofaktors. Durch Cre-vermittelte Rekombination kann man in Abhängigkeit der Orientierung der *loxP* Seiten zueinander und ihrer Lokalisierung eine Inversion, Translokation oder Exzision/Integration von DNS erzeugen (**Abbildung A-4**). Dabei ist die Exzision, also das Herausschneiden von *loxP*-flankierten („gefloxten“) DNS-Sequenzen, die am häufigsten verwendete Variante, um *in vivo* Modifikationen des Genoms durchzuführen (Sauer, 1998; Metzger und Feil, 1999), welche auch in dieser Arbeit Verwendung fand. Die zugrunde liegende Strategie ist, zwei gleichgerichtete *loxP* Seiten gezielt über homologe Rekombination so in das Genom von ES Zellen zu integrieren, dass sie den entsprechenden Bereich flankieren. Eine von Cre katalysierte Rekombination zwischen diesen *loxP* Seiten kann man einerseits durch transiente Expression des Enzyms in ES Zellen erhalten (Gu et al, 1993), andererseits aber auch in sog. Cre-transgenen Mäusen (Tsien et al, 1996). Der von den beiden *loxP* Seiten flankierte Bereich wird dadurch deletiert und damit die Genstruktur verändert.

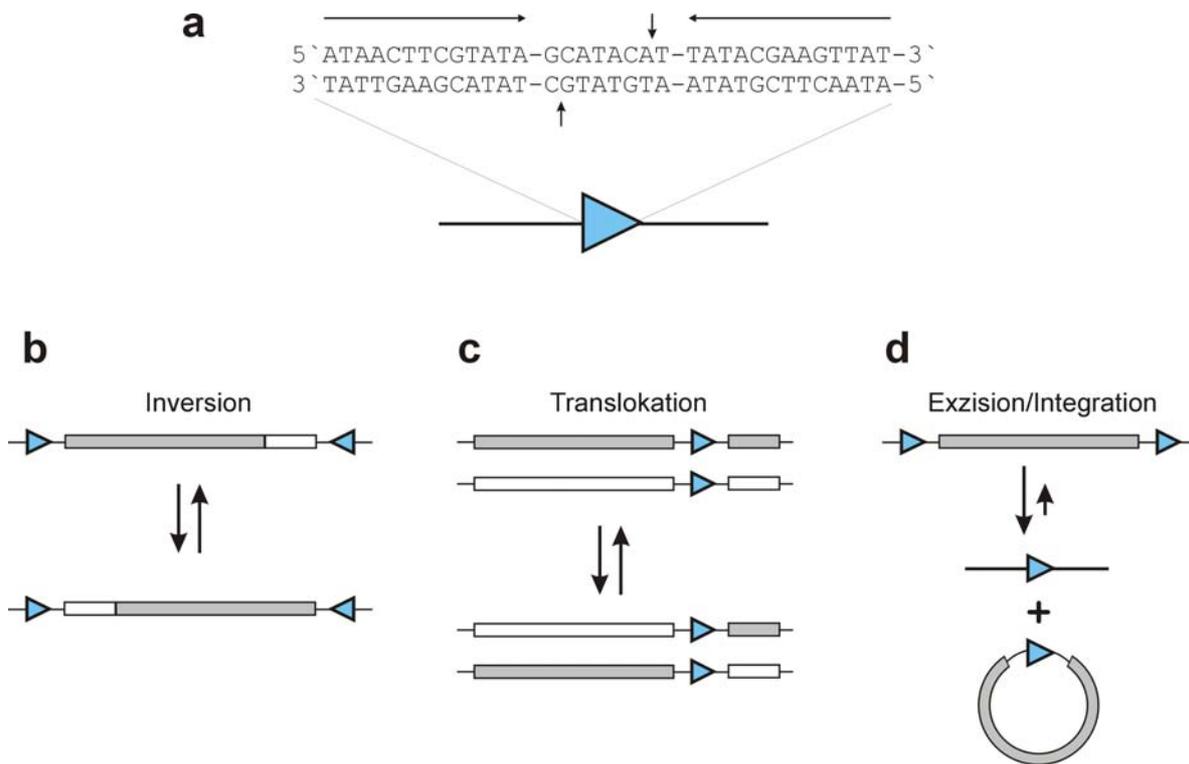


Abbildung A-4: Struktur der *loxP* Seite und Produkte der Cre-vermittelten Rekombination. **(a)** *loxP* Sequenz bestehend aus 34 bp. Darin enthalten sind zwei 13 bp Palindrome (waagrechte Pfeile) und eine asymmetrische 8 bp Spacer Region. Dieser Spacer definiert die Orientierung der *loxP* Seite, repräsentiert durch die Ausrichtung des blauen Dreieckes. Die Phosphodiesterbindungen, welche Cre spalten, sind durch senkrechte Pfeile angezeigt. **(b)** Die Rekombination zweier entgegengesetzt orientierter *loxP* Seiten führt zur Inversion der dazwischenliegenden Region. **(c)** Cre-vermittelte intermolekulare Rekombination zweier DNS Regionen mit je einer *loxP* Seite. Die *loxP* flankierten Regionen werden reziprok ausgetauscht, es kommt zu einer Translokation. **(d)** Die Cre-vermittelte Rekombination zwischen zwei gleichgerichteten *loxP* Seiten eines DNS Abschnittes führt zur Exzision und einer Ringbildung des *loxP* flankierten DNS Segmentes. Eine *loxP* Seite verbleibt auf jedem Teilstück.

A.6. Ziele dieser Arbeit

Bei der $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Deletionsmutante wurde das Exon 12 des *IRAG* Gens mit Hilfe des Cre/*loxP* Rekombinationssystems entfernt. Die aus dieser genetischen Modifikation resultierenden funktionellen Veränderungen sind Gegenstand dieser Arbeit.

Mit Hilfe des „Calcium Imaging“ sollte die physiologische Rolle von IRAG näher untersucht werden. Primärkulturen aus Aorten von $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen sollten mittels Kalziummessungen hinsichtlich ihrer Veränderungen in der zytosolischen Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ untersucht werden. Weiter sollte die Bedeutung von IRAG in Kalziummessungen an transient transfizierten COS-7 Zellen untersucht werden.

Bislang ist die Frage ungeklärt, welche Auswirkungen eine Inaktivierung des gesamten *IRAG* Gens hätte. Insbesondere die physiologische und molekulare Rolle der Interaktion von IRAG mit der cGMP-abhängigen Proteinkinase I kann mit Hilfe einer IRAG total ko Mausmutante näher untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher eine Mausmutante zu generieren, in der möglichst große Teile des IRAG Proteins deletiert sind, vor allem aber die in Exon 4 kodierte Interaktionsstelle mit der cGKI zerstört ist. Auf Grund der Leserahmenverschiebung nach einer Deletion des Exons 3 und dem daraus resultierenden, vorzeitigen Translationsstop wurde dieses Exon für die Generierung der Mausmutanten ausgewählt. Das Exon 3 des *IRAG* Gens sollte sowohl konventionell deletiert werden, als auch ein konditionales, „gefloxtes“ Exon erzeugt werden, um später die Möglichkeit zu haben, die Genfunktion auch zeit- und gewebespezifisch untersuchen zu können.

B. Material und Methoden

B.1. Organismen und Plasmide

In den folgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Organismen (Tabelle B-1) und Plasmide (Tabelle B-2) mit ihren relevanten Eigenschaften und ihrer Herkunft aufgeführt. Die Abkürzungen für Geno- und Phänotyp entsprechen der Nomenklatur von Bachmann und Low (1990).

Tabelle B-1: Verwendete Organismen

Organismus	Relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q</i> ΔM15 Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue MRF'	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q</i> ΔM15 Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F' <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

Tabelle B-2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Selektionsmarker	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
pBS II KS+	Ap ^R	PBluescript mit T3/T7pro-MCS	Klonierungsvektor	Stratagene
pCR [®] -BluntII-TOPO	Km ^R	<i>ccdB</i> (letales Gen)	Subklonierung von PCR-Produkten	Invitrogen
pIC- <i>Cre</i>	Ap ^R	Cre-Rekombinase exprimierend	Cre-vermittelte Rekombination, 2. Targeting	Dr. Feil (TU München)
pBleoBAC 11-22687	Cm ^R	Bacterial Artificial Chromosome mit IRAG-Insert	Vorlage der IRAG-PCR-Amplifikate	Genome Systems Inc
pBS loxP2neotkloxP	Ap ^R	pBluescript mit <i>neotk</i> -Kassette und 3 <i>loxP</i> -Seiten	Grundlage des IRAG-Targeting-Vektors	Dr. Fässler (MPI Biochemie, München); Dr. Feil (TU München)
pcDNA3.1-IRAGa	Ap ^R	pcDNA3.1- backbone mit IRAGa	Kalziummessungen in COS-7 Zellen	Schlossmann et al, 2000
pCMV-cGKIβ-IRES-EGFP	Km ^R	pEGFP-N1 backbone	Kalziummessungen in COS-7 Zellen	Dr. Feil (TU München)

B.2. Anzucht und Stammhaltung

B.2.1. Nährmedium

Als Nährmedium wurde LB-Vollmedium verwendet, das zur Sterilisierung 20 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert wurde. Temperaturempfindliche Zusätze sind sterilfiltriert und nach Abkühlen des Mediums auf 50°C (Festmedium) oder vor Inokulation (Flüssigmedium) zugesetzt worden.

Für das Festmedium wurden 16 g Agar pro Liter zugesetzt und mit dem Medium autoklaviert.

LB-Medium (Luria-Bertani); pH 7,4

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
H ₂ O _{dest}	ad 1 l

B.2.2. Hemmstoffe und Medienzusätze

Tabelle B-3: Hemmstoffe und Medienzusätze

Medienzusätze	Abkürzung	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	Ap	100 mg/ml in 50% EtOH/H ₂ O _{bidest.}	100 µg/ml
Kanamycin	Km	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	50 µg/ml
Chloramphenicol	Cm	12,5 mg/ml in MeOH	12,5 µg/ml

B.2.3. Kultivierung und Stammhaltung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium. Flüssigkulturen wurden in Plastikröhrchen oder Erlenmeyerkolben angezogen, die bei 37°C und 175-225 rpm inkubiert wurden. Zum Überimpfen dienten Einzelkolonien, die von den entsprechenden Agarplatten abgenommen wurden. Flüssigkulturen mit größerem Volumen wurden mit über Nacht gewachsenen Vorkulturen 1:1000 bzw. mit einer gewissen Zellzahl (bestimmt durch Trübungsmessung bei OD₆₀₀) beimpft.

E. coli Stämme können 4 bis 6 Wochen bei 4°C auf Agarplatten gehalten werden. Dazu werden Einzelkoloniausstriche über Nacht inkubiert und anschließend bei 4°C unter Selektionsdruck aufbewahrt. Ausgehend von diesen Kulturen können 25%ige Glycerinkulturen angelegt werden, die bei -80°C über mehrere Jahre stabil sind.

B.2.4. Transformation von Bakterien

B.2.4.1. Transfer von DNS in *E. coli*

Die Einschleusung von Plasmid-DNS in Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Dafür benötigt man kompetente Zellen, die in der Lage sind, exogene DNS aufzunehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transformationstechnik der Elektroporation zum Einschleusen fremder DNS in Zellen verwendet. Durch einen kurzen Hochspannungsimpuls kann eine lokale Perforation der Zellhülle erreicht werden, die eine Transformation von Plasmid-DNS in die Zelle ermöglicht. Bei geeignetem Selektionsdruck (z.B. durch Zugabe von Antibiotika) wird ein in die Zelle geschleustes Plasmid stabil an die Tochterzellen weitergegeben.

B.2.4.2. Herstellung elektrokompenter Zellen (Hanahan, 1983, modifiziert)

LB-Medium wird mit einer *E. coli* Übernachtskultur (XL1-Blue oder XL2-Blue MRF') 1:1000 beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 (logarithmische Wachstumsphase) inkubiert. Die Zellen werden auf Eis abgekühlt und anschließend geerntet. Das Zellpellet wird erst mit eiskaltem H₂O_{bidest} und anschließend mit eiskalter, 10%iger Glycerinlösung gewaschen. Nach Dekantieren des Überstandes werden die Zellen 1:1 in 10% Glycerin resuspendiert und als 60 µl Aliquots bei -80°C eingefroren. Die Zellen werden jeweils 10 min mit 4000xg bei 4°C zentrifugiert. Alle verwendeten Lösungen wurden autoklaviert.

B.2.4.3. Durchführung der Elektroporation

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit dem dialysierten Ligationsansatz (100-500 ng DNS) (B.3.4.3.) oder mit etwa 10 ng Plasmid-DNS vorsichtig gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation wurde mit dem Gene PulserTM und Pulse Controller von BioRad mit folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt:

Spannung 2,5 kV; Kapazität 25 µF; Widerstand 200 Ω; durchschnittliche Zeitkonstante 4,5 ms. Nach der Transformation wurden die Bakterien in LB-Medium zur phänotypischen Expression für 60 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde ein Aliquot der Bakteriensuspension auf selektiven LB-Platten ausplattiert. Die erhaltenen Klone konnten mittels Plasmidisolierung (B.3.1.) und entsprechender Restriktionsanalyse (B.3.4.1.) auf Anwesenheit des rekombinanten Plasmids überprüft werden.

B.3. Molekularbiologische Methoden

B.3.1. Isolierung von Plasmid-DNS

Für die Gewinnung hochwertiger Plasmid-DNS für präparative Zwecke (Klonierung und Sequenzierung) wurden die kommerziell verfügbaren Plasmid-Isolierungskits Plasmid Miniprep Kit (Peqlab) und Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Alle benötigten Puffer und Lösungen werden vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert. Prinzip dieser Isolierungsmethode ist der Zellaufschluß durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979) und eine anschließende DNS-Aufreinigung mittels Säulenchromatographie. Die Präparation erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

B.3.2. Reinigung und Konzentrierung von DNS-Fragmenten

Die Reinigung, Aufkonzentrierung und Umpufferung von DNS-haltigen Lösungen nach enzymatischer Modifikation sowie die Abtrennung der amplifizierten PCR-Fragmente von den Agenzien der PCR-Reaktion und die Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen). Diese Methode nutzt die Eigenschaft der DNS aus, an eine spezifisch dafür entwickelte Säulenmatrix zu binden. Die Elution der DNS kann anschließend mit dem im Kit vorhandenen Elutionspuffer oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ erfolgen. Alle benötigten Lösungen und das Arbeitsprotokoll sind im Kit enthalten.

B.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD_{260} von 1,0:

- 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doppelsträngiger DNS
- 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einzelsträngiger RNS
- 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ einzelsträngigem Oligonukleotid.

Die Reinheit von DNS und RNS kann aus dem Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ abgeschätzt werden. Dieser Quotient sollte über 1,7 liegen.

B.3.4. Enzymatische Modifikation von DNS

B.3.4.1. Spaltung von DNS mittels Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen (auch kurz Restriktionsenzyme genannt) bilden eine Klasse von bakteriellen Enzymen, die spezifische Basensequenzen in doppelsträngiger DNS erkennen und spalten (Sambrook et al, 1989). Die hier verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme spalten ihr DNS-Substrat innerhalb oder unmittelbar neben der meist palindromischen Erkennungssequenz, so dass Fragmente mit definierten Enden entstehen. Je nach Enzym entstehen bei der Spaltung entweder glatte Enden („blunt ends“) oder einander komplementäre, 5'- bzw. 3'-überhängende „sticky ends“. Die DNS-Enden besitzen immer eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe, was die spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden ermöglicht.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von NEB bezogen (siehe Anhang **Tabelle F-2**). Die Erkennungssequenzen, Reaktionspuffer und Inkubationsbedingungen wurden den entsprechenden Produktbeschreibungen des Herstellers entnommen.

Für analytische Zwecke wurden 0,2 bis 0,5 µg DNS mit 3 bis 5 U Enzym für die präparative Gewinnung von Restriktionsfragmenten (für Klonierungen) wurden 2 bis 5 µg DNS mit 5 bis 10 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 bis 50 µl für 1 bzw. 3 h inkubiert. Der Verdau von ES Zellen erfolgte über Nacht in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 20 U Enzym pro Loch einer 96-Loch Platte. Der Restriktionsansatz wurde anschließend gelelektrophoretisch untersucht.

B.3.4.2. Dephosphorylierung linearer DNS durch alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatase aus Shrimps (SAP = shrimps alkaline phosphatase) spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen von DNS-Molekülen ab. Linearisierte Vektoren wurden dephosphoryliert, um einen intramolekularen Ringschluss (Religation) während der Ligation zu verhindern und so die Klonierungseffizienz von Fremd-DNS zu erhöhen. Zu der gereinigten, linearisierten DNS (etwa 5 pmol) wurden 5 U SAP (Roche) und der entsprechende Puffer gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 min, 65°C) konnte die Vektor-DNS für die Ligation eingesetzt werden.

B.3.4.3. Verknüpfung von DNS-Fragmenten mit T4-DNS-Ligase

Die T4-DNS-Ligase (NEB) katalysiert ATP-abhängig die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende von doppelsträngiger DNS oder RNS. Als Substrat dienen sowohl überhängende als auch glatte Enden. Die Ligase wurde eingesetzt, um Fremd- und Vektor-DNS kovalent zu rekombinanter Plasmid-DNS zu verknüpfen. Ligase, linearisierter Vektor und Fremd-DNS (Insert in 2 bis

4-fachem molarem Überschuss) wurden in Ligasepuffer gemischt und für 3 bis 16 h bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend 20 min gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ dialysiert (Dialysemembran mit der Porengröße 0,025 μm , Millipore), um den hohen Salzgehalt zu reduzieren. Das rekombinante Plasmid konnte im Anschluss in *E. coli* transformiert werden (B.2.4.1.).

B.3.5. Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten

Nukleinsäuren werden bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld in einem Gel nach Masse und Konformation (linear, offenzirkulär oder superhelikal) aufgetrennt. Aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats sind Nukleinsäuren negativ geladen. Sie wandern daher bei der Elektrophorese zur Anode, und zwar um so langsamer, je größer sie sind. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können die getrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht (302 nm) als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich diente ein DNS-Standard (1 kb Ladder, Gibco-BRL). Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren, wurden dem Auftragspuffer Farbmarker zugegeben. Bromphenolblau wandert mit DNS-Fragmenten von ca. 100 bp und markiert die Elektrophorese-Front. Xylencyanol wandert mit DNS-Fragmenten von etwa 5 kb.

Die zu isolierende DNS-Bande wurde möglichst rasch im UV-Licht sichtbar gemacht, der entsprechende Gelbereich mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reagenzgefäß (ERG) überführt. Die DNS wurde anschließend mittels QIAquick Gel Extraction-Kit (Quiagen) isoliert (B.3.2.).

10x TBE

Tris (USB)	0,9 M
Borsäure (Merck)	0,9 M
EDTA (ICN)	20 mM

Elektrophoresepuffer

1x TBE (1 Teil 10x TBE + 9 Teile $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$)

Auftragspuffer (6x dye)

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18% (w/v)
EDTA, pH 8,0	0,12 mM
TBE	6x
Bromphenolblau (Serva)	0,1% (w/v)
Xylencyanol FF (Sigma)	0,1% (w/v)

Ethidiumbromidstammlösung

10 mg/ml (Sigma), wässrig

B.3.6. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten im Bereich von 0,1 bis 15 kb wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al, 1989) verwendet. Für analytische und präparative Zwecke wurden 0,7-2,0% (w/v) Agarose (Seakem LE, Biozym) in 1x TBE im

Mikrowellenherd geschmolzen. Vor dem Ausgießen der auf etwa 60°C abgekühlten Agaroselösung in eine horizontale Kammer wurde Ethidiumbromid zugegeben (finale Konzentration im Gel: 300 ng/ml). Die Elektrophorese erfolgte mit 1x TBE als Laufpuffer bei 80-130 V.

B.3.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine enzymatische Methode zur *in vitro*-Amplifikation von definierten DNS-Segmenten aus einem Gemisch von Nukleinsäuren (Saiki et al, 1988). Sie ist ein zyklisch verlaufender Prozess und beruht auf der Kettenverlängerung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer durch eine hitzestabile DNS-Polymerase. Durch die mehrfache Wiederholung eines Reaktionszyklus (Denaturierung, Primeranlagerung, Polymerisation) wird eine exponentielle Vervielfältigung des zwischen den beiden Primern liegenden DNS-Abschnittes erreicht. Über Basenaustausche in den Sequenzen der verwendeten Primer ist es möglich, gerichtet Mutationen in der Sequenz des Produktes zu erzeugen, was z.B. die Generierung oder Zerstörung artifiziereller Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme ermöglicht.

Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode sind vielfältig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Konstruktion von Plasmiden, zur Charakterisierung des konstruierten Targetingvektors und zur Amplifikation von genomischer DNS aus kultivierten Zellen verwendet.

B.3.7.1. PCR-Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden bei MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert. Sequenzen und Restriktionsschnittstellen sind im Anhang (**Tabelle F-1**) wiedergegeben. Die lyophilisierte Primer-DNS wurde in soviel H₂O_{bidest} gelöst, dass die Konzentration 100 pmol/μl betrug. Davon wurden Arbeitslösungen von 25 pmol/μl und 0,8 pmol/μl hergestellt.

B.3.7.2. Reagenzien

Für die PCR wurden folgende Polymerasen verwendet:

- Taq DNA Polymerase (Roche) zur Amplifikation eher kurzer Fragmente
- Platinum[®]Pfx DNA Polymerase Kit (Invitrogen) zur Amplifikation der Vektorfragmente
- Platinum[®]Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) für Amplifikate mit einer Größe über 3 kb

Die Reaktionsansätze für die PCR wurden gemäß den Angaben des Herstellers vorbereitet. Die Arbeitslösung der dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP [NEB]) wurde auf 10 mM eingestellt.

B.3.7.3. Standard-PCR

(für DNS-Fragmente bis ca. 1 kb)	
initiale Denaturierung	94°C, 5 min
Denaturierung	94°C, 15 sec
Primeranlagerung (Annealing)	55°C, 30 sec
Polymerisation (Elongation)	72°C, 30 sec
finale Polymerisation (Elongation)	72°C, 5 min

} 35x

Die Standardbedingungen wurden je nach Größe der zu amplifizierenden DNS-Fragmente (Elongationszeit und –temperatur) und Primersequenzen (Annealingtemperatur) optimiert. Die PCR-Reaktionen wurden im UNO-Thermoblock (Biometra) durchgeführt.

Die amplifizierten DNS-Fragmente, die für die Konstruktion von Plasmiden eingesetzt wurden, sind aufgereinigt (B.3.2.) und nach ihrer Klonierung sequenziert (B.3.8.) worden, um mögliche Fehler der Polymerasen zu erkennen.

B.3.7.4. Klonierung von PCR-Amplifikaten

Zur Subklonierung von gereinigten PCR-Amplifikaten wurde das Zero Blunt TOPO Cloning Kit für Pfx-Amplifikate ohne Überhänge (Invitrogen) verwendet. Schlüsselenzym ist hier die Topoisomerase I. Sie agiert hier als Restriktionsenzym und Ligase. Ihre biologische Rolle ist es, DNA während der Replikation zu spalten und wieder zusammzusetzen. Im Kit sind kompetente *E. coli* TOP10 Zellen und der Klonierungsvektor pCR®-BluntII-TOPO mit dem *ccdB* Gen enthalten. Das genaue Arbeitsprotokoll ist dem Kit beigelegt.

B.3.8. Sequenzierung von DNS

Die Sequenzierung von DNS erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977). DNS-Fragmente wurden mittels „Terminator Cycle Sequencing“ enzymatisch synthetisiert und durch den Einbau verschiedener, fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) terminiert. Die Sequenzanalyse erfolgte mit einem Sequenzierautomaten („ABI Prism™ Sequence-Analyser“, Perkin-Elmer Applied Biosystems). Dabei erkennt ein Laser die Abfolge der fluoreszenzmarkierten DNS-Fragmente, die durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Aus den Rohdaten wird von einem Computerprogramm (Multiscan 100ES, Sony) die DNS-Sequenz errechnet.

Durchführung des „Terminator Cycle Sequencing“:

Ansatz:	DNS (50-500 ng)	x µl
	Ready Reaction Mix ^a (RRM)	4 µl
	Primer (0,8 pmol/µl)	4 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

^aenthält AmpliTaq DNS Polymerase, Puffer, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Perkin-Elmer Applied Biosystems)

Synthese der DNS-Abbruchfragmente:

Denaturierung	95°C	2 min	} 25x
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primeranlagerung	50°C	40 sec	
Polymerisation	60°C	4 min	

Die Reinigung des Sequenzierproduktes erfolgte mit „Centri Sep Spin Columns“ (Perkin-Elmer Applied Biosystems) nach Anweisung des Herstellers.

Die getrocknete DNS wurde in 20 µl „Template Suppression Reagent“ (Perkin-Elmer Applied Biosystems) gelöst und vor der Analyse im Sequenzierautomaten 3 min bei 95°C denaturiert.

B.3.9. Radioaktive Southernblot Analyse

Als „Southern Blotting“ (Southern, 1975) bezeichnet man ein Verfahren, bei dem DNS-Fragmente durch Gelelektrophorese ihrer Größe nach getrennt und anschließend aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägermembran übertragen und immobilisiert werden. Das im Gel vorliegende Trennmuster der DNS-Fragmente bleibt erhalten, d.h. auf der Membran befindet sich eine Kopie des ursprünglichen Gels. Durch Hybridisierung der Membran mit einer ³²P-markierten DNS-Sonde können DNS-Fragmente lokalisiert werden, die eine zur Sonde komplementäre Region enthalten.

B.3.9.1. Isolierung von DNS aus 96 Loch Platten**Lösungen:****Lysepuffer für 96-Loch Platten**

NaCl	10 mM
Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA	10 mM
N-Laurylsarcosine	0,5% (w/v)
bei RT lagern	
+ 0,25 mg/ml Proteinase K (immer frisch zugeben)	

Proteinase K (Roche)

50 mg/ml in 1xTE (B.3.9.3.)
Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

EtOH/NaCl

10 ml 100% EtOH + 150 µl 5 M NaCl

Durchführung:

Die 96-Loch Platte wurde mit je 50 µl Lysepuffer pro Loch über Nacht bei 59°C inkubiert und mit Parafilm und Frischhaltefolie verschlossen (Verdunstungsgefahr). Am nächsten Tag wurde die Platte nach dem Abkühlen auf RT geöffnet, die DNS durch Zugabe von je 100 µl EtOH/NaCl pro Loch 1h bei RT gefällt (DNS haftet an der Plastikoberfläche) und danach die Platte vorsichtig aber zügig über eine Ecke abgekippt. Nach 2x waschen mit 70%igem Ethanol (100 µl) wurde die Platte schräg mit der Öffnung nach unten aufgestellt und ca. 1 h bei RT getrocknet.

Für die Southernblot Analyse wurde ein Restriktionsverdau (B.3.9.2.) durchgeführt bzw. für die PCR Analyse (B.3.7.) die DNS in H₂O_{bidest} gelöst. Die getrocknete oder gelöste DNS konnte bei -20°C gelagert werden.

B.3.9.2. Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau der isolierten DNS erfolgte direkt in den 96-Loch Platten. Dazu wurde der Enzymmix auf die getrocknete DNS gegeben und über Nacht inkubiert.

Enzymmix (pro Loch):	10x Puffer	5,0 µl
	100x BSA	0,5 µl
	Restriktionsenzym (10-50 U/µl)	1-3 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

B.3.9.3. Durchführung des Southernblot**Lösungen:****Hybridisierungslösung (Church-Puffer)**

BSA	1%
NaPhosphat-Puffer; pH 7,4	0,5 M
SDS	7%
EDTA; pH 8,0	1 mM
ssDNA (Sigma)	0,1 (mg/ml)
bei RT lagern	

10x SSC; pH 7,0

NaCl	1,5 M
Natriumcitrat	0,15 M
bei RT lagern	

10x TE

Tris-HCl; pH 8,0	0,1 M
EDTA; pH 8,0	10 mM
autoklavieren; bei RT lagern	

Waschlösung

SSC	0,4x bis 2x
SDS	0,1%
bei RT lagern	

Die mittels Restriktionsverdau fragmentierte DNS wurde durch Agarosegelelektrophorese (i.d.R. 0,8% Agarose in 1x TBE) aufgetrennt, mit Ethidiumbromid (1 mg/l H₂O, Sigma) gefärbt und mit angelegtem Lineal fotografiert.

Zur Depurinierung wurde das Gel nach dem Lauf 15 min in 0,4 N HCl geschwenkt (Verfärbung des Farbmarkers Bromphenolblau nach gelb) und kurz in H₂O gewaschen.

Die Denaturierung der DNS erfolgte durch Schwenken in 0,5 N NaOH mit 1,5 M NaCl für 30 min (Verfärbung des Farbmarkers von gelb nach blau).

Durch Schwenken in 0,5 M Tris pH 7,5 mit 3 M NaCl für 45 min wurde das Gel neutralisiert.

Anschließend wurde die DNS über Nacht aus dem Gel auf die Trägermembran („HybondTM-N“, Amersham Biosciences) transferiert.

Aufbau des Southernblots:

In eine Metallwanne wurde ein Schwamm gelegt, der etwas größer war als das Gel und dieser gut mit 10x SSC getränkt. Darauf wurden drei Lagen Gelblottingpapier (Whatman GB002) platziert, ebenfalls mit 10x SSC getränkt und das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Die in H₂O_{bide} getränkte und auf die Größe des Gels zugeschnittene Membran wurde ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt und mit drei Lagen in 10x SSC getränktem Gelblottingpapier abgeschlossen.

Durch Auflegen einer, mit ca. 1 kg beschwerten, dicken Lage Zellstoffs auf den Stapel erfolgte der Transfer der DNA auf die Trägermembran durch die Kapillarkräfte des Puffers.

Prähybridisierung:

Nach dem Transfer (12-16 h) wurde der Blot abgebaut, die Geltaschen mit Bleistift markiert und die Membran wie gewünscht zugeschnitten. Zur Immobilisierung der DNS auf der Membran wurde diese mit UV-Licht bestrahlt (Stratalinker, Stratagene) und 1 h bei 80°C getrocknet. Die Membran mit der immobilisierten DNS wurde mit 50 ml, auf 60°C vorgewärmter, Hybridisierungslösung in einem Hybridisierungsbeutel (Research Product International Corp.) eingeschweißt und im Wasserbad für 4 h bei 60°C prähybridisiert.

Herstellung ³²P-markierter DNS-Sonden durch „Random-Primed Labeling“:

Die DNS-Sonden (ca. 500-600 bp) wurden mittels PCR amplifiziert (B.3.7.), in TOPO pCR[®]-BluntII subkloniert, durch Restriktionsverdau aus dem Plasmid wieder ausgeschnitten (B.3.4.1.) und über Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt (B.3.5.). Etwa 100 ng Sonden-DNS dienten als Matrize zur Markierung mit dem „NEBlotTM Kit“ (New England Biolabs) nach Vorschrift des Herstellers mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH). Anschließend wurde die DNS durch Säulenchromatographie über eine „NickTM Column“ (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH) nach Herstellerangaben von nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt und mit 500 μl 1x TE eluiert. Die Messung der spezifischen Aktivität der ³²P-markierten Sonde erfolgte durch Szintillationszählung (ca. 1×10^5 cpm/ μl). Anschließend wurde die DNS-Sonde 10 min aufgeköcht und bis zur Hybridisierung auf Eis aufbewahrt.

Hybridisierung:

Zur Hybridisierung wurde die Sonde bis zu einer Konzentration von 5×10^6 cpm/ml in Hybridisierungslösung verdünnt und diese dann in einer neuen Hybridisierungstasche auf die prähybridisierten Membranen überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einem 60°C Schüttel-Wasserbad. Am nächsten Tag wurden die Membranen aus der Tasche genommen und mehrmals mit Waschlösung im Wasserbad gewaschen. Dabei wurde die Stringenz schrittweise durch eine Erniedrigung des Salzgehaltes der Waschlösung und durch eine Temperaturerhöhung bis 72°C gesteigert. Es wurde solange gewaschen, bis die Radioaktivität der Blots unter 50 Raten pro Sekunde gefallen war. Die Membranen wurden auf Filterpapier getrocknet und in Plastikfolie eingeschlagen. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte durch erstellen eines Autoradiogramms. Die Phosphoimagerplatte (BAS-MP) wurden auf den Blot aufgelegt und nach einer Expositionszeit von 24-72 h mit einem Phosphoimager der Firma Raytest (BAS-1500) ausgewertet.

B.4. Kultivierung und Transfektion von COS Zellen

Bei COS-7 Zellen handelt es sich um eine von Affennierenzellen abgeleitete Zelllinie (American Type Culture Collection), die durch Behandlung der Zellen mit einer Mutante des Affenvirus SV 40 entstanden ist. In vorliegender Arbeit wurden diese Zellen zur Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit Fura-2 (B.6.) und zur Überprüfung der Funktionalität der in dem Targeting Vektor enthaltenen *loxP* Seiten eingesetzt. Dazu wurde der Targeting Vektor zusammen mit einem Cre-exprimierenden Plasmid in COS-7 Zellen transfiziert. Anschließend wurde aus den COS Zellen die Plasmid-DNS isoliert und mittels PCR analysiert (B.3.7.).

B.4.1. Zellkultur

COS-7 Zellen wurden in Dulbecco's MEM Medium (DMEM, PAA) mit einer Mischung aus 100 U/ml Penicillin G und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin (PenStrep, PAA), 10% fötalem Kälberserum (FCS-Gold, PAA), 1% nichtessentiellen Aminosäuren (PAA) und 2% 50x HT-Medium (Biochrom) kultiviert. COS-7 Zellen wachsen in adhärennten Kulturen, sogenannten Monolayern, angeheftet an Plastik-Kulturgefäßen aus Polystyrol (Corning) oder auf runden Glasplättchen, sog. Coverslips. Die Zellen wurden mindestens 24 h vor der Transfektion ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und einem CO_2 -Gehalt von 5%, zur Konstanthaltung des pH-Wertes des Mediums.

B.4.2. Transfektion von COS-7 Zellen

Das Einschleusen von Fremd-DNS (rekombinante Plasmide) in eukaryontische Zellen bezeichnet man als Transfektion. Bei einer transienten Transfektion wird die zirkuläre Fremd-DNS unabhängig vom Genom der Wirtszelle (episomal) transkribiert. Allerdings sind die eingeschleusten Gene nur vorübergehend aktiv und gehen im Verlauf weiterer Zellteilungen wieder verloren. Bei Co-Transfektionen werden gleichzeitig mehrere Gene in die Wirtszellen eingeschleust.

B.4.2.1. Kalziumphosphat-Methode

In vorliegender Arbeit wurde die Kalziumphosphat-Transfektion nach Chen & Okayama (1987) angewandt. Dadurch kommt es zur Bildung eines Kalziumphosphat-DNS-Präzipitates. Dieser feinkörnige Niederschlag setzt sich auf den Zellen ab und wird durch Endozytose aufgenommen.

2x HBS; pH 7,05

NaCl	280 mM
Hepes	50 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 M
KCl	10 mM
Glukose	12 mM

Sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

PBS (Phosphat-gepufferte Saline); pH 7,4

NaCl	135 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄ * 12H ₂ O	8 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

Ansatz pro 10 ml Zellkulturschale:

- 5 bis 10 µg Plasmid-DNS
- ad 210 µl H₂O_{bidest} in 1,8 ml Kryo-Röhrchen (Nunc) verdünnen
- 30 µl 2 M CaCl₂ tropfenweise zugeben, mehrfach schütteln
- 240 µl 2x HBS in 4,5 ml Kryo-Röhrchen vorlegen und DNS-CaCl₂-Lösung (240 µl) tropfenweise zugeben, gut schütteln und 30 min bei RT inkubieren, dabei nach 15 min für 10 sec vortexen
- gesamten Ansatz (480 µl) ins Zellkulturmedium tropfen, dabei Schale gleichzeitig schwenken
- nach 24 h Medium wechseln (Medium mit Transfektionsansatz absaugen, mit PBS waschen, 10 ml frisches Medium zugeben)

B.4.2.2. Ernte der Zellen und Isolierung der Plasmid-DNS aus COS Zellen

Quick Digest Puffer

Tris-HCl; pH 8,0	50 mM
NaCl	20 mM
EDTA; pH 8,0	1 mM
SDS	1% (w/v)
Proteinase K	1 mg/ml

- Medium absaugen und Zellen 1x mit PBS waschen
- 2 ml Trypsin/EDTA (PAA) pro Petrischale auf den Zellrasen pipettieren und bis zum Ablösen der Zellen 5-10 min bei 37°C inaktivieren
- zur Inaktivierung des Trypsins 4 ml Medium zusetzen
- Zellsuspension zentrifugieren mit 180xg; 5 min; RT
- Überstand bis auf ca. 200 µl abnehmen und das Pellet im verbleibenden Rest resuspendieren
- 20 µl Quick Digest Puffer mit 5 µl Zellsuspension mischen, 30 min bei 55°C inkubieren, dabei nach 15 min vortexen
- 180 µl H₂O_{bidest} zugeben und den gesamten Ansatz 5 min bei 95°C aufkochen

B.5. Isolierung und Kultivierung von VSMC

Zur Kultivierung von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC für „Vascular Smooth Muscle Cells“) wurden Aorten von 6-8 adulten Mäusen präpariert, enzymatisch verdaut und in 12-Loch Platten mit Coverslips (20 mm Durchmesser) in unterschiedlichen Zelldichten (10.000 bis 60.000) ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's MEM Medium (DMEM, PAA) mit einer Mischung aus 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin (PenStrep, PAA) und 10% fötalem Kälberserum (FCS-Gold, PAA), bei 37°C und 5% CO₂.

Präparation und enzymatischer Verdau der Aorten

Lösungen:

Ca²⁺-freies Medium; pH 7,4

Na-Glutamat	85 mM
NaCl	60 mM
HEPES	10 mM
KCl	5,6 mM
MgCl * 6H ₂ O	1 mM

Enzymlösung A

Papain (Sigma)	0,7 mg/ml
BSA Fraktion 5 (Roth)	1 mg/ml
DTT (Gebro)	1 mg/ml

Enzymlösung B

Hyaluronidase (Sigma)	1 mg/ml
Kollagenase F (Sigma)	1 mg/ml
BSA Fraktion 5 (Roth)	1 mg/ml

Beide Enzymlösungen wurden mit Ca²⁺-freiem Medium hergestellt und steril filtriert.

Durchführung:

Die Aorten wurden möglichst ganz aus der Maus präpariert und in PBS unter dem Binokular von dem umgebenden Fettgewebe befreit. Die gesäuberten Aorten wurden mit einer Schere zerkleinert und 40 min im Wasserbad bei 37°C in Enzymlösung A inkubiert. Anschließend wurde für 10 min mit 180xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Enzymlösung B aufgenommen. Es folgte ein 20-25 minütiger zweiter Verdau bei 37°C im Wasserbad, wobei ca. alle 7 min die Zellen durch Auf- und Abpipettieren immer mehr vereinzelt wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium abgestoppt, die Zellen 10 min mit 180xg zentrifugiert und das Pellet in 3 ml Kulturmedium

resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und die Vitalität mittels einer Trypanblaufärbung bestimmt. Dazu wird die Zellsuspension mit einer 0,04%igen Trypanblaulösung (Sigma) versetzt. Tote Zellen lassen sich durch ihre dunkle Blaufärbung von den nur leicht gefärbten, lebenden Zellen unterscheiden. Im Allgemeinen lag die Ausbeute bei etwa 250.000 Zellen pro Aorta mit einer Vitalität von 97 %.

Zwei bis drei Tage nach dem Aussähen wurde das Medium gewechselt. Etwa 48 h vor den Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2 (B.6.) wurde das Serum-haltige Medium durch Serum-freies ersetzt.

B.6. Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2 (Calcium Imaging)

In vorliegender Arbeit wurden Änderungen in der zytosolischen Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ mit Hilfe des Indikatorfarbstoffes Fura-2 und einer quantitativen Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

B.6.1. Indikatorfarbstoff Fura-2

Einer der am häufigsten verwendeten Fluoreszenzindikatoren für die Messung des zytosolischen Kalziumspiegels $[Ca^{2+}]_i$ ist Fura-2 (1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-amino-benzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraessig-säure)

(**Abbildung B-1a**).

Dieser Chelator bindet Ca^{2+} in einem Verhältnis von 1:1. Wird ein Ca^{2+} -Ion gebunden, so lagert es sich in einen Hohlraum aus vier Carboxygruppen ein. Dadurch kommt es zu einer Veränderung in der Struktur der elektronischen Energieniveaus und somit zu dem veränderten Absorptionsverhalten von Fura-2. Der isosbestische Punkt liegt bei $357 \pm 0,5$ nm. Wird bei dieser Wellenlänge angeregt, so hat eine Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ keine Schwankung der Fluoreszenzintensität zur Folge. Wird der Farbstoff mit einer kürzeren Wellenlänge angeregt, so verstärkt sich mit zunehmender $[Ca^{2+}]_i$ die Fluoreszenzintensität, während sie für längere Anregungswellenlängen bei zunehmender $[Ca^{2+}]_i$ abnimmt. Aus dem Verhältnis der Anregungswellenlängen 350 und 380 nm kann so eine quantitative Aussage über die $[Ca^{2+}]_i$ getroffen werden (**Abbildung B-1b**).

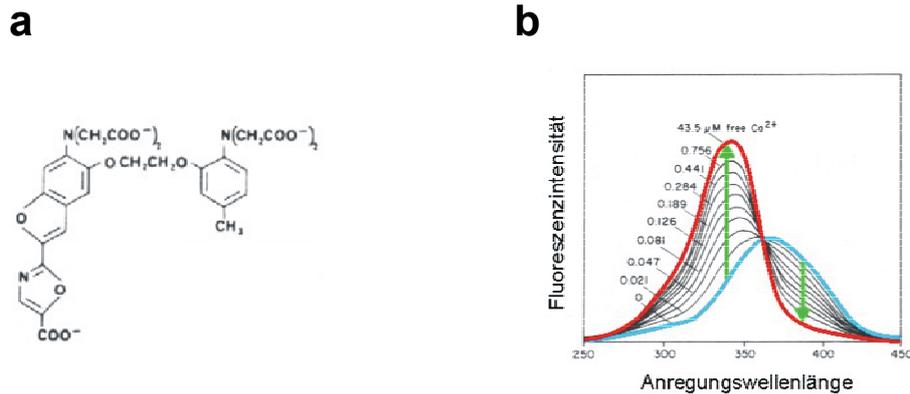


Abbildung B-1: (a) Strukturformel von Fura-2; (b) Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei einer Emissionswellenlänge $\lambda_E = 510$ nm in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge und verschiedenen Kalziumkonzentrationen. Modifiziert nach Grynkiewicz et al, 1985.

Als eigentliche Messgrößen dienen die Fluoreszenzintensitäten F_{350} und F_{380} , die bei Anregung mit den Wellenlängen λ_{350} und λ_{380} bei 510 nm emittiert werden. Der Quotient $R = F_{350}/F_{380}$ ist somit proportional zur absoluten $[Ca^{2+}]_i$ und unabhängig von der Farbstoffkonzentration, Zelldicke und anderen variierenden Komponenten (Grynkiewicz et al, 1985).

Fura-2 wird als lipophiler, nicht fluoreszierender, membranpermeabler Acetomethylester (Fura-2 AM) auf die Zellen appliziert. Der Farbstoff kann in dieser Form durch die Zellmembran in das Zytoplasma diffundieren. Intrazelluläre Esterasen spalten hydrolytisch den Acetomethylester von den Carboxygruppen, zurück bleibt eine Ca^{2+} -sensitive, freie Säure, die nicht mehr aus der Zelle entweichen kann (Moore et al, 1990).

B.6.2. Messtand

Es handelt sich hier um ein Imaging-System, basierend auf einem Monochromator mit integrierter Lichtquelle (Polychrom IV, TILL Photonics). Das monochromatische Licht wird über einen Epifluoreszenzkondensator zum Mikroskop (Axiovert 35M, Zeiss) geleitet und die Fluoreszenzsignale über eine Peltierelement-gekühlte CCD-Kamera (IMAGO CCD, TILL Photonics) detektiert. Die Steuerung des gesamten Systems, sowie die Messungen, erfolgten mit dem Programm Vision 4.0 (TILL Photonics).

Bei den Messungen wurden mit den Exzitationswellenlängen λ_{350} und λ_{380} 1x pro Sekunde für 20 msec belichtet. Dabei konnten, durch die bei jeder Messung individuell bestimmten „Regions of Interest“ (ROI), jeweils mehrere Zellen und deren mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt werden.

B.6.3. Vorbereitung und Durchführung der Messungen

Lösungen:

Tyrode; pH 7,4		K-85 Tyrode; pH 7,4	
NaCl	140 mM	NaCl	57 mM
KCl	5 mM	KCl	85 mM
CaCl ₂	2 mM	CaCl ₂	2 mM
MgSO ₄	1,2 mM	MgSO ₄	1,2 mM
HEPES	5 mM	HEPES	5 mM
Glucose	10 mM	Glucose	10 mM

Vor Beginn der Messungen mussten die auf Coverslips angezogenen Zellen zunächst mit Fura-2 beladen werden. Die Coverslips wurden in die dafür vorgesehenen Messkammern gespannt und mit je 500 µl des in Tyrode + 1% BSA gelösten Fura-2 überschichtet. Es erfolgte eine einstündige Inkubation bei RT im Dunkeln mit anschließendem 3-maligen Waschen mit Tyrode. COS-7 Zellen wurden mit einer 5 µM Fura-2 Lösung beladen, die VSMC mit einer 3 µM Lösung.

Die Applikation der verschiedenen Substanzen während einer Messung erfolgte entweder über eine Glaskapillare in geringem Abstand zu den zu messenden Zellen oder über das Einwaschen direkt in die Badlösung mittels einer Pumpe (Ismatec Vario Pumpsystem).

B.7. Erzeugung genetisch veränderter Mäuse

Seit einigen Jahren ist es möglich, durch „Gene Targeting“ definierte Mutationen in das Erbgut von Mäusen einzuführen (Capecchi, 1989). Pluripotente, embryonale Stammzellen (ES Zellen) der Maus werden *ex vivo* kultiviert, gezielt genetisch verändert und wieder in die Keimbahn der Maus eingeführt.

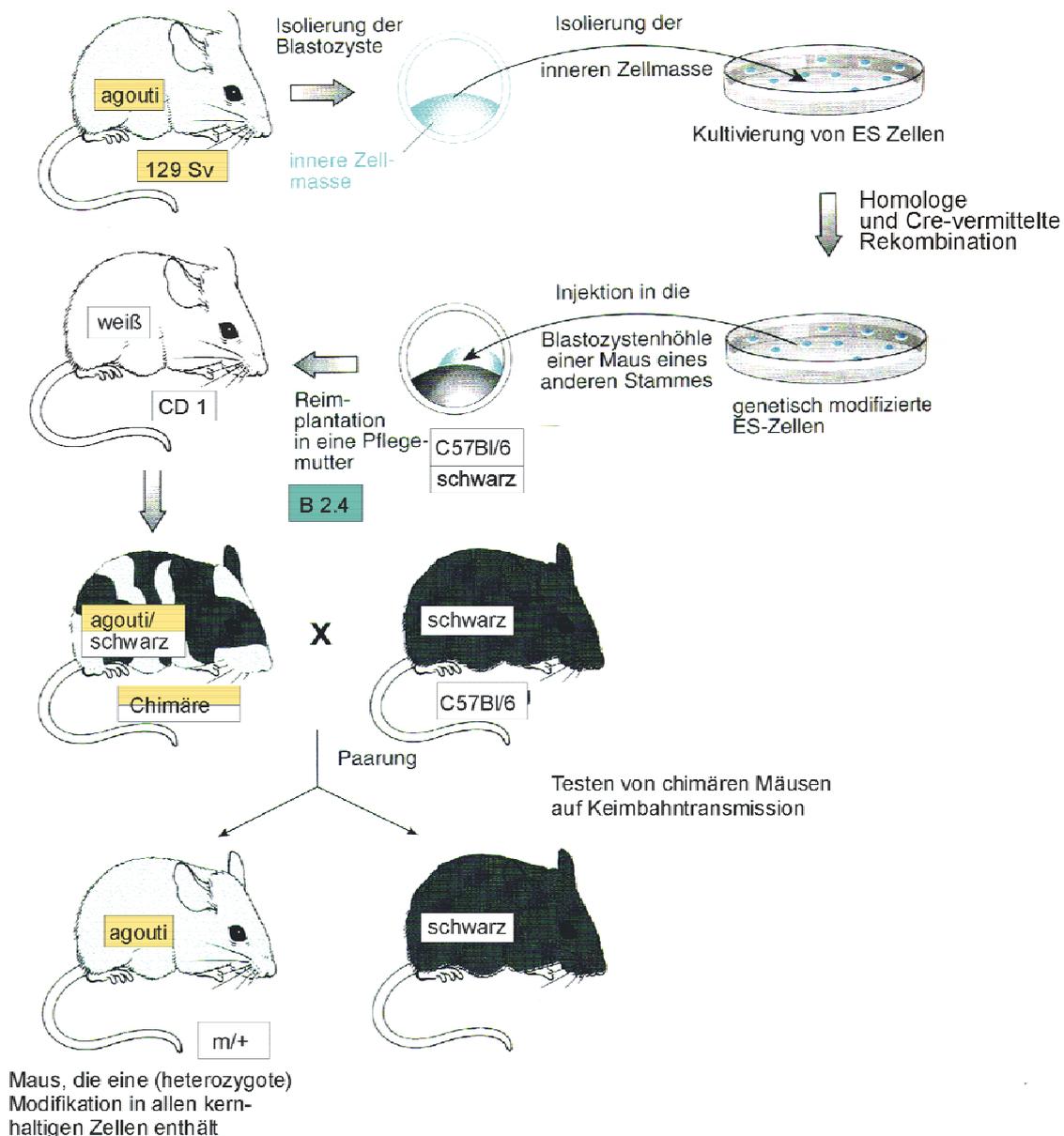


Abbildung B-2: Herstellung genetisch veränderter Mäuse. Modifiziert nach Strachan und Read, 1996; weitere Erklärung im Text.

B.7.1. Kultivierung embryonaler Stammzellen

ES Zellen sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen werden. Sie lassen sich kultivieren, genetisch manipulieren und wieder in Ammenmäuse reimplantieren. Allerdings können aus den ES Zellen nur dann Mauslinien etabliert werden, wenn sie in der Keimbahn der Mäuse weitergegeben werden. Um die „Keimbahngängigkeit“ der ES Zellen zu erhalten bzw. um eine Differenzierung der Zellen zu verhindern, muss ihre Kultivierung unter optimalen Bedingungen erfolgen. Da die Differenzierung von ES Zellen in Anwesenheit des Maus „Leukämie-inhibierenden Faktors“ (LIF) unterdrückt wird, wurde dem Nährmedium LIF zugegeben. Darüber hinaus wurden die ES Zellen immer auf einem Zellrasen embryonaler Fibroblasten („Feederzellen“) kultiviert, die neben anderen Wachstumsfaktoren auch LIF bilden. Dadurch bleiben die ES Zellen pluripotent und proliferieren weiterhin ohne zu differenzieren. Eine hohe Zelldichte und Passagenzahl (>30) sollte vermieden werden, da dadurch die Keimbahngängigkeit beeinträchtigt werden kann.

In dieser Arbeit wurden R1 ES Zellen (Nagy et al, 1993) verwendet, die aus Blastozysten von agouti-farbenen 129/Sv Mäusen gewonnen wurden (Passage 15 vom Februar 1999).

Nährmedien und Zusätze

DMEM (PAA)

Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium with High Glucose, Sodium Pyruvate and L-Glutamine

FCS (PAA)

Fötales, bovines Serum; hitzeinaktiviert und auf ES Zellverträglichkeit getestet.

Trypsin/EDTA (PAA)

LIF (ESGRO™; Chemicon)

Maus „Leukämie-inhibierender Faktor“

Arbeitslösung: $0,5 \times 10^6$ U/ml EF Medium, sterilfiltrieren, Aliquots à 1 ml bei 4°C lagern

2-Mercaptoethanol (Sigma)

β -ME, Arbeitslösung: 50 mM, Endkonzentration: 0,1 mM, sterilfiltrieren,

Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

Selektionszusatz G418 (PAA)

Geneticin®/G418-Sulfat; Endkonzentration: 0,4 mg/ml

Selektionszusatz GANC (Roche)

Cymeven®/Ganciclovir-Natrium; Endkonzentration: 2 μ M

EF-Medium (Feederzellen)

DMEM 450 ml

FCS 50 ml

ES-Medium (ES-Zellen)

DMEM 400 ml

FCS 100 ml

500x LIF 1 ml

500x β -ME 1 ml

Tabelle B-4: Zellkultur-Parameter

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

B.7.2. Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten („Feederzellen“) wurden aus Embryos am Tag 14,5 p.c. isoliert. Um die Selektion rekombinanter ES Zellen mit G418 zu überleben, müssen die Feederzellen ein Neomycinresistenzgen besitzen. Für die Erzeugung der Embryos wurden daher Wildtyp Mäuse mit Mäusen, die homozygot ein Neomycinresistenzgen enthalten, verpaart. In dieser Arbeit wurden für die Verpaarung CNG3^{-/-} Mäuse verwendet (freundlicherweise von Herrn Prof. M. Biel, Department Pharmazie, LMU München, zur Verfügung gestellt). Aus einem Embryo konnten Feederzellen für die Kultivierung in 2 Zellkulturflaschen (175 cm²) gewonnen werden. Die Zellen einer 90-100% konfluent bewachsenen Flasche wurden durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen teilungsunfähig gemacht und bis zu ihrer Verwendung eingefroren. Jede Präparation von Feederzellen wurde vor Gebrauch auf ihre Eignung für die Kultivierung von ES Zellen getestet.

Durchführung:

- Verpaarung von CNG3^{-/-} Männchen mit je 2 C57BL/6 Weibchen; Weibchen mit Vaginalpfropf (Plug) am Tag 0,5 p.c. separieren
- 1-3 schwangere Weibchen am Tag 14,5 p.c. töten, in 80% EtOH baden und Uterus entnehmen, Embryos in Petrischale mit PBS legen, den Kopf und alle blutführenden Gewebe entfernen
- Torso in kleine Stücke zerschneiden und mit 1 ml Trypsin pro Embryo 10 min bei 37°C inkubieren
- Gewebe mit Pipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml) mechanisch zerkleinern, 5 min bei 37°C inkubieren und mit einer 2 ml Pipette gut homogenisieren
- pro Embryo 2 Zellkulturflaschen (175 cm²) ansetzen; bei 37°C und 6% CO₂ bis zu 90-100%igen Konfluenz wachsen lassen (4-6 Tage)
- Zellen trypsinieren, ca. 80% der Zellsuspension entnehmen, den Rest weiter kultivieren (steigende Passagezahl)
- entnommene Zellen zur Teilungsinhibierung mit 5000 Rad bestrahlen (Röntgenquelle im Max-Planck-Institut, Martinsried)
- Zellen zentrifugieren (180xg, 5 min, RT) und in 3 ml Einfriermedium (90% EF-Medium + 10% DMSO) pro geernteter Flasche aufnehmen, Aliquots à 1 ml in flüssigem Stickstoff lagern
- es können bis zu 6 Passagen gewonnen werden, wobei der Inhalt eines Kryoröhrchens auf ca. 200 cm² ausgesät werden kann

B.7.3. Allgemeines Vorgehen bei der Kultivierung von ES Zellen

B.7.3.1. Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 6% CO₂ in ES-Medium. Am Abend vor dem Aussäen der ES Zellen wurden Feederzellen aufgetaut und in EF-Medium ausgesät. Am nächsten Morgen wurde das EF-Medium durch ES-Medium ersetzt und die ES Zellen auf die Feederzellen ausgesät. Jeden Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

Bei 60-80%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsinlösung abgelöst (5-10 min bei 37°C), 1-2 Volumen ES-Medium zugegeben, suspendiert, zentrifugiert (180xg, 5 min, RT) und auf das 3-fache der „abgeernteten“ Fläche ausgesät (1:3 „Splitting“). Bei jedem Ablösen mit Trypsin stieg die Passagenzahl.

B.7.3.2. Anlegen von Gefrierkulturen

Die Zellen einer ca. 80% konfluenten Zellkulturflasche (75 cm²) wurden mit 3 ml Trypsinlösung abgelöst (5-10 min bei 37°C), 3 ml ES-Medium zugegeben, suspendiert und zentrifugiert (180xg, 5 min, RT). Anschließend wurden die Zellen in 6 ml Einfriermedium (90% ES-Medium + 10% DMSO) aufgenommen, Aliquots à 1 ml in Kryoröhrchen abgefüllt, bei -80°C eingefroren (ca. 24 h) und in flüssigem Stickstoff gelagert.

B.7.4. Erstes Targeting: Homologe Rekombination in ES Zellen

Das Targeting von chromosomaler DNS über homologe Rekombination in ES Zellen ermöglicht die gezielte Einführung von Mutationen in das Genom von Mäusen. Das Prinzip des „Gene Targeting“ ist in **Abbildung B-3** dargestellt. Mit Hilfe kurzer Hochspannungsimpulse wird die Permeabilität der Zytoplasmamembran kurzzeitig erhöht (Elektroporation), so dass der Targeting Vektor in das Innere der Zellen eingeschleust wird. Die DNS wird nun entweder durch zweifaches „crossing over“ homologer Regionen gezielt an einen vorbestimmten Genort eingebaut (homologe Rekombination, **B-3a**), zufällig in das Genom integriert (**B-3b**) oder aber überhaupt nicht eingebaut. Um diejenigen ES Zellen anzureichern, die die fremde DNS in ihr Genom integriert haben, enthält das Targeting Konstrukt Selektionsmarker, z.B. ein Neomycinresistenzgen (*neo*). Nur Zellen die das *neo* Gen enthalten, können in Anwesenheit von G418 wachsen (positive Selektion). Die Frequenz der homologen Rekombination ist entscheidend von der Länge und Isogenität der zum Zielgen homologen Arme des Targeting Konstrukts abhängig. Durch weitere Charakterisierungen wie z.B. Southernblot (B.3.9.) oder PCR (B.3.7.) können ES Zellklone, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, von denen mit einer zufälligen Integration unterschieden werden.

Die Häufigkeit, mit der man korrekt modifizierte ES Zellklone erhält, beträgt je nach Zielgen, DNS Konstrukt und Selektionsmethode ca. 0,1-10%, d.h. es sollten etwa 500 bis 1000 Klone isoliert und analysiert werden.

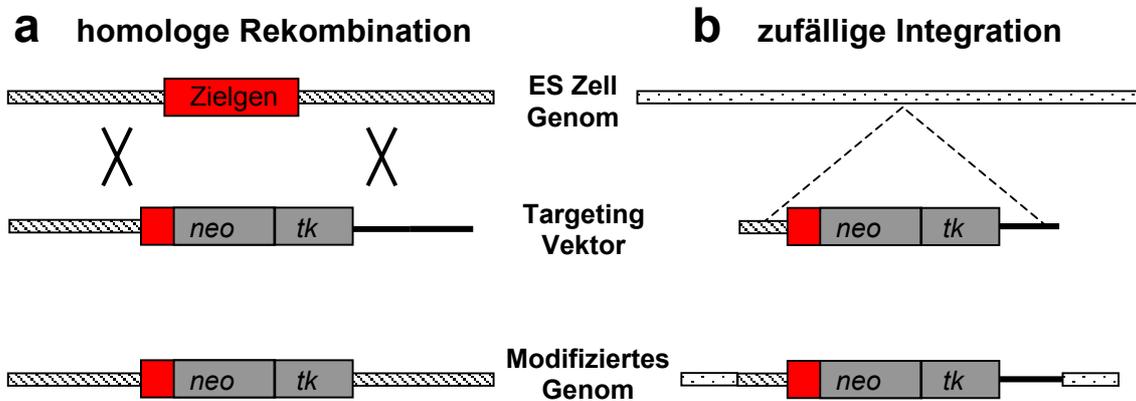


Abbildung B-3: Homologe Rekombination und zufällige Integration **(a)** Homologe Rekombination. Kreuze deuten das „crossing over“ homologer Regionen von Genom und Targeting Konstrukt an. **(b)** Zufällige Integration. Unterbrochene Linien deuten die nicht homologe Rekombination an.

B.7.4.1. Vorbereitung der DNS

50 µg der Targeting Vektor DNS wurden durch Restriktionsverdau mit *Acc65I* linearisiert, mit Ethanol gefällt und unter sterilen Bedingungen getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl H_2O_{bidest} gelöst und auf 100 µl mit PBS aufgefüllt (konnte bei $-20^{\circ}C$ gelagert werden). Mit Hilfe eines Agarosegels wurde die DNS-Konzentration abgeschätzt und 2-5 pmol (entspricht ca. 20-50 µg eines 15 kb Konstrukts) linearisierte DNS für die Elektroporation (B.7.4.3.) eingesetzt.

B.7.4.2. Vorbereitung der ES Zellen

Wie unter B.7.3.1. beschrieben, wurden die ES Zellen aufgetaut, auf eine 25 cm² Flasche ausgesät (Passagenzahl notiert), auf eine 75 cm² Flasche passagiert und bis 60-80%iger Konfluenz wachsen gelassen. Die Zellen einer 75 cm² Flasche waren für 1-2 Elektroporationen ausreichend. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsinlösung abgelöst (5-10 min bei $37^{\circ}C$), suspendiert, nach Zugabe von 7 ml ES-Medium zentrifugiert (180xg, 5 min, RT) und in 0,9 ml PBS resuspendiert.

B.7.4.3. Elektroporation

Der linearisierte, in 0,1 ml H_2O_{bidest} /PBS gelöste Targeting Vektor wurde der Zellsuspension zugegeben. Die Suspension wurde gemischt und in eine Elektroporationsküvette (4 mm; PeqLab) gegeben.

Elektroporationsbedingungen („Gene PulserTM“ ohne „Pulse Controller“, BioRad):

Spannung: 0,23 kV

Kapazität: 500 μ F

Es sollte sich eine Zeitkonstante von ca. 5 ms ergeben.

Anschließend wurden die Zellen 5 min bei RT stehen gelassen, in 13 ml ES-Medium übergeführt, suspendiert und je 1 ml auf Petrischalen (55 cm²) mit Feederzellen in ES-Medium ausgesät.

B.7.4.4. Selektion mit G418

24 h nach der Elektroporation wurde mit der Neomycinselektion begonnen. Zur Selektion wurde G418 mit einer finalen Konzentration von 400 μ g/ml dem Nährmedium zugesetzt. Das Medium wurde bei allen Petrischalen täglich gewechselt.

Massives Absterben der nicht resistenten Zellen setzt i.d.R. 4-6 Tage nach der Elektroporation ein, dabei sind G418-resistente Zellklone leicht an ihren scharfen Umrissen zu erkennen.

B.7.4.5. Isolierung von ES Zellklonen

Je nach Zielgen und Konstrukt erhält man 500-2000 G418 resistente Klone. Das Vorgehen zur Isolierung von ES Zellklonen ist in **Abbildung B-4** gezeigt. Die Klone werden isoliert („gepickt“) und auf zwei 96-Loch Platten (A, B) dupliziert. Platte A wird bei 70-80%iger Konfluenz eingefroren (in Nährmedium + 10% DMSO), Platte B wird vervielfältigt (B, C, D). Aus diesen Platten wird DNS isoliert (B.3.9.1.) und analysiert, um Klone mit korrekt integriertem Konstrukt zu identifizieren. Die gewünschten ES Zellklone werden schließlich aus der eingefrorenen Platte A wieder in Kultur genommen und für die Injektion in Blastozysten (B.7.6.) bzw. für die Cre-vermittelte Rekombination (B.7.5.) verwendet.

Die ersten Klone konnten 6-8 Tage nach der Elektroporation gepickt werden. Je nach Wachstum der Zellen konnte das Picken alle 1-2 Tage wiederholt werden (bis zu 3 x). Die Klone waren mit bloßem Auge auf dem Boden der Petrischalen zu erkennen. Pro Tag konnten 100-600 Klone isoliert werden. Am Morgen wurden Feederzellen in ES/G418-Medium in 96-Loch Platten ausgesät (150 μ l) und 2 Platten pro 96 gepickte Klone angesetzt (Platte A und B). Zum Picken der Klone wurde in 96-Loch Platten je 30 μ l PBS vorgelegt. Das Picken der Klone erfolgte mit einer 20 μ l Pipette (auf 2 μ l eingestellt) durch Ablösen vom Boden der Petrischalen und Überführen in je ein Loch der Platte mit PBS. 30 μ l 2x Trypsinlösung wurden zugegeben, die Zellen 10 min bei 37°C inkubiert, suspendiert, mit 60 μ l ES/G418-Medium aufgefüllt und nochmals suspendiert. Je 60 μ l suspendierte Zellen wurden auf die zwei Platten mit Feederzellen (Platte A und B) verteilt (**Abbildung B-4**). Nach etwa 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Bei 60-80%iger Konfluenz (3-4 Tage nach dem Picken) wurde Platte A eingefroren (B.7.4.6.) und Platte B auf 3 weitere 96-Loch Platten (B, C, D) passagiert (B.7.4.7.).

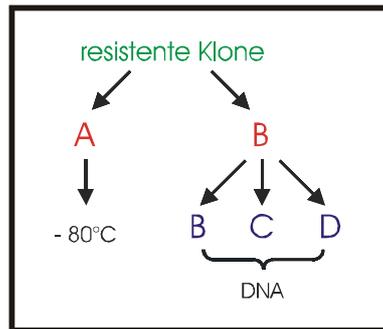


Abbildung B-4: Vorgehensweise zur Isolierung von ES Zellklonen. Resistente ES Zellklone werden isoliert und auf zwei 96-Loch Platten (A, B) dupliziert. Platte A wird bei 70-80%iger Konfluenz eingefroren und Platte B zur DNS Isolierung vervielfältigt (Platten B, C, D). Weitere Erklärung im Text.

B.7.4.6. Einfrieren

Das Medium von Platte A wurde abgekippt, die Zellen mit PBS gewaschen (180 µl), mit 30 µl Trypsinlösung abgelöst (10 min bei 37°C), 180 µl Einfriermedium (90% ES-Medium + 10% DMSO, frisch angesetzt) zugegeben und suspendiert. Anschließend wurde die Platte mit Autoklavierband verschlossen, langsam eingefroren (1-3 h bei -20°C) und bei -80°C gelagert.

B.7.4.7. Passagieren

In zwei 96-Loch Platten (Platte C und D, ohne Feederzellen) wurden je 150 µl ES-Medium vorgelegt, das Medium von Platte B abgekippt, die Zellen mit PBS gewaschen (180 µl), mit 30 µl Trypsinlösung abgelöst (10 min bei 37°C), 120 µl ES-Medium zugegeben und suspendiert. Danach wurde je 50 µl aus Platte B in Platte C und D zugegeben (**Abbildung B-4**). Die Platte B wurde mit 150 µl ES-Medium aufgefüllt und die Zellen bis zur 100%igen Konfluenz wachsen gelassen (3-4 Tage). Das Medium von Platten B, C und D wurde abgekippt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen, getrocknet und die Platten anschließend bei -20°C gelagert.

B.7.5. Zweites Targeting: Cre-vermittelte Rekombination in ES Zellen

In ES Zellen, die im Ersten Targeting nach homologer Rekombination und der darauf folgenden Charakterisierung durch Southernblot Analyse und PCR in allen Punkten als positiv identifiziert werden konnten, wurde durch Elektroporation die Cre-Rekombinase eingebracht.

Ziel dieser Cre-vermittelten Rekombination war es, die beiden „gefloxten“ Selektionsmarkergene (**Abbildung B-2** und A.5.) zu entfernen. Eine Selektion auf dieses

Rekombinationsereignis war durch die Zugabe von Ganciclovir zum Nährmedium möglich. Ganciclovir ist ein Nukleosid-Analogon, das zum Kettenabbruch bei der DNS Replikation führt. Es wird nur von der Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus phosphoryliert und führt daher nur bei den Zellen zum Absterben, die das *Thymidinkinasegen* (*tk*) enthalten.

Die erfolgreich charakterisierten ES Zellklone, wurden aufgetaut und in jeweils einem Loch einer 24-Loch Platte in ES Medium kultiviert. Dazu wurden die 96-Loch Platten (Platten A) bei 37°C inkubiert bis die ES Zellklone in allen Löchern aufgetaut waren. Die entsprechenden Klone wurden in je ein Loch einer 24-Loch Platte mit zuvor ausgesäten Feederzellen überführt. Die Klone wurden mehrmals gesplittet (B.7.3.1.) bis eine 75 cm² Flasche für die Elektroporation ausreichend bewachsen war. Insgesamt wurden 1x10⁷ Zellen mit dem *Cre*-exprimierenden Plasmid pIC-*Cre* (ca. 40 µg) wie in B.7.4.3. elektroporiert. Mit dem Plasmid pIC-*Cre* wurde die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle des Herpes simplex Virus Thymidinkinase (HSV *tk*) Promotors exprimiert (freundlicherweise von Herrn Dr. Robert Feil zur Verfügung gestellt). Nach der Elektroporation wurden die Zellen auf Petrischalen mit Feederzellen in unterschiedlicher Zellkonzentrationen zwischen 2x10⁵ und 4x10⁶ Zellen ausgesät.

Mit der Selektion auf das Thymidinkinasegen wurde 2-3 Tage nach der Elektroporation begonnen. Dazu wurden die Zellen mit 0,2 µM Ganciclovir-haltigem Medium kultiviert. 8 bzw. 9 Tage nach der Elektroporation wurden Ganciclovir resistente ES Zellklone, wie unter B.7.4.5. beschrieben, isoliert. Dabei wurden wieder A-Platten als Masterplatten bzw. B-, C-, D-Platten für DNS kultiviert und eingefroren. Nach der DNS Isolierung (B.3.9.1.) wurden die ES Zellklone mittels Southern Blot (B.3.9.3.) analysiert.

B.7.6. Injektion genetisch modifizierter ES Zellen in Blastozysten

Die in dieser Arbeit verwendeten ES Zellen stammten aus dem Mausstamm 129/Sv (*agouti*). Das Fell dieser Mäuse ist agouti-farben („gelb“). Diese 129/Sv ES Zellen wurden in die Blastozysten schwarzer C57BL/6 Mäuse injiziert. In **Abbildung B-2** ist die Vorgehensweise der Herstellung genetisch modifizierter Mäuse dargestellt. Die Blastozysten wurden am Tag 3,5 *post coitum* aus den Weibchen isoliert. Die C57BL/6 Weibchen wurden deshalb mit C57BL/6 Männchen verpaart. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf einen sichtbaren, vaginalen Pfropf (plug) hin untersucht. War dieser Pfropf vorhanden, befand sich das Weibchen im Falle einer Befruchtung am Tag 0,5 der Schwangerschaft. 3 Tage später wurden aus diesen positiven Weibchen die Blastozysten isoliert. Die genetisch modifizierten ES Zellen wurden jetzt in diese Blastozysten injiziert. Anschließend wurden diese Blastozysten in scheinchwangere CD-1 Weibchen, die als Leihmütter („foster“) fungierten, reimplantiert. Da auch die Leihmütter vor der Reimplantation der Blastozysten im richtigen Schwangerschaftsstadium sein mussten,

wurden sie mit vasktomierten FVB/N Männchen (B.7.8.) verpaart. Am nächsten Morgen wurden auch diese Weibchen dem „plug check“ unterzogen. „Plug-positiven“ Weibchen wurden ungefähr 2,5 Tage später die injizierten Blastozysten in den Uterus eingesetzt. Sowohl die Blastozysteninjektion als auch die Reimplantation wurde von Frau Dr. Susanne Feil durchgeführt (Kühbandner, 2001; Hogan et al., 1994). Befanden sich unter den Nachkommen chimäre Tiere, deren Fellfarbe gelb und schwarz gemischt war, so war die Injektion der modifizierten ES Zellen und die Reimplantation der Blastozysten erfolgreich.

Vorbereitung der ES Zellen für die Injektion:

Die im Zweiten Targeting charakterisierten ES Zellen wurden 7-9 Tage vor der Injektion wieder in Kultur genommen (B.7.5.). Bei 60-80%iger Konfluenz einer 6-Loch Platte wurden die Zellen in unterschiedlicher Dichte (1:5 bis 1:40 „Splitting“) in 6-Loch Platten passagiert (B.7.3.1.), um sicher zu gehen, dass zum Zeitpunkt der Injektion ausreichend Zellen im richtigen Wachstumsstadium zur Verfügung standen. Von allen Klonen wurden Gefrierkulturen unterschiedlicher Passagen angelegt. Pro Loch einer 60-80% konfluenten 6-Loch Platte konnten 2-3 Gefrierstocks angelegt werden (B.7.3.2.).

Am Injektionstag wurden die Zellen aus einem Loch einer 6-Loch Platte (ca. 60% konfluent, nicht differenziert) 1 x mit PBS gewaschen, mit Trypsinlösung abgelöst und in 3-5 ml ES-Medium aufgenommen. 1 bis 1,5 ml davon wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (180xg, 2 min, RT), der Überstand bis auf ca. 50 µl abgenommen und die Zellen in dem verbleibenden Medium gut suspendiert. Die Zellen wurden im Idealfall sofort injiziert und nur wenn nötig für maximal 1-2 h bei 4°C gelagert.

Die übrigen Zellen wurden bei -20°C eingefroren und für eine eventuelle erneute Charakterisierung des Genotypes gelagert.

B.7.7. Testen von chimären Mäusen auf Keimbahntransmission

Chimäre Mäuse besitzen einen Anteil von Zellen, der aus den Blastozysten der schwarzen C57BL/6 Spendertiere stammt und einen Anteil von Zellen, der aus den injizierten ES Zellen hervorgegangen ist (**Abbildung B-2**). Da die ES Zellen von agouti-farbenen 129/Sv Mäusen abstammen, kann deren Anteil leicht am Fell abgelesen werden. Um eine genetisch veränderte Mauslinie zu etablieren, muss das mutierte Allel von der Chimäre weiter vererbt werden. D.h. die genetisch modifizierten ES Zellen müssen zur Bildung von Keimzellen der Chimäre beitragen bzw. „keimbahngängig“ sein. Alle Chimären wurden mit schwarzen C57BL/6 Mäusen verpaart. Da agouti dominant über schwarz vererbt wird, kann das modifizierte Gen nicht an die Nachkommen mit schwarzem Fell übertragen worden sein. Dagegen sind agouti-farbene Nachkommen bezüglich ihres Genoms heterozygot (129/Sv/C57BL/6), d.h. je ein Allel stammt aus dem 129/Sv bzw. C57BL/6 Genom. Das

Genom jeder agouti-farbenen Maus muss daraufhin analysiert werden, ob bezüglich der eingeführten, genetischen Veränderung das Wildtyp (+) oder das mutierte (m) Allel von der Chimäre weitergegeben wurde.

B.7.8. Haltung und Zucht der Mäuse

Die Mäuse wurden in einem dafür geeigneten Tierstall gemäß den Anforderungen in Makrolon Käfigen gehalten (maximal 5 adulte Tiere in einem Typ II Käfig, maximal 12 adulte Tiere oder 2 Weibchen mit ihren Würfen in einem Typ III Käfig; Tierversuchsgenehmigung AZ: 211-2531-120/99 vom 10.02.04). Als Einstreu wurden autoklavierte Späne (Altromin) verwendet, die bei Bedarf noch mit Nistmaterial („Nestlets“, Emsicon) ergänzt wurden. Die Fütterung („Zuchtdiät Ratten und Mäuse“, Altromin 1314) und Wasserversorgung erfolgten *ad libidum*. Zur Zucht wurden i.d.R. jeweils zwei Weibchen im paarungsfähigen Alter (5 bis 30 Wochen) zu einem Männchen (6 Wochen bis 1¹/₂ Jahre) gesetzt.

Die Inzuchtstämme C57BL/6 (C57BL/6N Cr1 BR) und FVB/N (FVB/N Cr1 BR) sowie der Auszuchtstamm CD-1 [Cr1:CD[®]-1(ICR) BR] wurden von der Firma Charles River, Sulzfeld, bezogen. Die Vasektomie von FVB/N Männchen wurde von der Fa. Iffa Credo, Lyon, durchgeführt. Die 129/Sv Inzuchtmäuse stammten aus dem Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried (Prof. A. Pfeifer, persönliche Mitteilung).

C. Ergebnisse

C.1. Untersuchung der physiologischen Bedeutung von IRAG mittels Calcium Imaging

Ein Forschungsschwerpunkt unserer Arbeitsgruppe ist die Charakterisierung des IP₃-Rezeptor assoziierten cGMP-Kinase Substrates IRAG. In der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade beeinflusst IRAG die Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration. Die genaue Untersuchung seiner physiologischen Rolle bei der Kontraktion und Relaxierung glatter Muskelzellen und somit des Tonus von Gefäßen und gastrointestinaler Organe ist daher von großem Interesse.

Die kürzlich generierte IRAG^{Δ12/Δ12} Maus sollte in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i mit Hilfe des Indikatorfarbstoffes Fura-2 und einer quantitativen Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. In dieser Maus wurde das Exon 12 des IRAG Gens deletiert, welches für den N-terminalen Bereich der Coiled-coil Domäne codiert. Dadurch wurde die Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP₃ Rezeptor Typ I zerstört. Phänotypisch zeigt diese Mausmutante eine starke Dilatation des gesamten Gastrointestinalbereiches.

Für die Untersuchungen der Kalziumregulation im glatten Muskel der IRAG^{Δ12/Δ12} Maus wurden in dieser Arbeit Primärkulturen von Aorten, sog. VSMC („Vascular Smooth Muscle Cells“) verwendet.

Zunächst erfolgte eine Charakterisierung der Funktion von IRAG durch Kalziummessungen an mit IRAG und cGKIβ co-transfizierten COS-7 Zellen.

C.1.1. Vorgehensweise der Messungen und deren Auswertung

Das Prinzip der Messungen der Hormon-induzierten Änderungen in der zytosolischen Kalziumkonzentration [Ca²⁺]_i mit dem Indikatorfarbstoff Fura-2 ist in B.6. ausführlich beschrieben. Die Zellen wurden während einer Messung zweimal über eine Pipette mit dem entsprechenden Hormon stimuliert (**Abbildung C-1**). Durch diese Stimulation wurden Kalziumtransienten induziert. Nach Absinken des Transienten auf den Basalwert wurde die Messkammer über einen Zeitraum von 5 Minuten mit Tyrode gespült, um das applizierte Hormon wieder zu entfernen. Darauf folgte eine fünfminütige Inkubations- oder Ruhephase, in der die Zellen im Falle der Kontrollexperimente ihre intrazellulären Kalziumspeicher wieder auffüllen konnten bzw. mit den verschiedenen Substanzen (cGMP und cBIMPS) inkubiert wurden. Anschließend wurde ein zweites Mal mit Hormon stimuliert. Während des Waschvorganges und der Inkubations- bzw. Ruhephase wurden die Zellen nicht belichtet, um ein unnötiges Ausbleichen des Farbstoffes Fura-2 zu vermeiden.

Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der Flächen unter den Transienten (AUC für „area under curve“). Dazu wurde die Fläche des zweiten Transienten zu der Fläche des ersten Transienten ins Verhältnis gesetzt. Dadurch waren die Messungen unabhängig von der unterschiedlichen Stimulierbarkeit der einzelnen Zellen und den daraus resultierenden Schwankungen in der Ca^{2+} -Freisetzung.

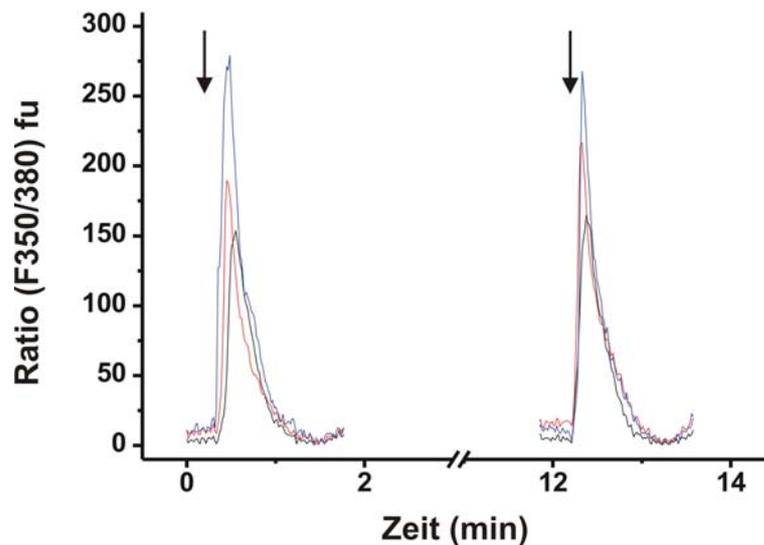


Abbildung C-1: Gezeigt ist hier eine Messung der hormoninduzierten Veränderung in der zytosolischen Kalziumkonzentration von drei unterschiedlichen Gefäßmuskelzellen. Die Pfeile markieren die Applikation von 50 μl einer 0,5 μM Noradrenalinlösung. fu: fluorescence units.

Bei Kontrollexperimenten wie diesem in **Abbildung C-1** war entscheidend, dass der basale Kalziumspiegel nach jedem stimulierten Transienten wieder erreicht wurde. Die beiden nacheinander induzierten Transienten sollten annähernd die gleiche Größe haben, um eine gleichbleibende Stimulierbarkeit der Zellen zu garantieren. Das Verhältnis der Fläche des zweiten Transienten zu der des ersten Transienten ergab in diesen Kontrollexperimenten somit etwa 100%. Vor jedem Experiment, bei dem mit cGMP oder cBIMPS inkubiert wurde, erfolgte ein solches Kontrollexperiment, um die Vitalität der Zellen zu überprüfen.

C.1.2. Kalziummessungen an COS-7 Zellen

Bei COS-7 Zellen handelt es sich um eine von Affennierenzellen abgeleitete Zelllinie (B.4.). In ihrer ursprünglichen Form exprimieren diese Zellen den IP_3 Rezeptor (Hattori et al, 2004) aber nicht IRAG oder cGKI. COS-7 Zellen eignen sich gut zu einer transienten Transfektion rekombinanter Expressionsvektoren und somit für die Expression von IRAG und der cGKI. Sie kamen daher für Untersuchungen der cGMP-abhängigen Regulation der Kalziumkonzentration in Frage. Es wurden zum Einen Kontrollexperimente mit nicht

transfizierten Wildtyp Zellen durchgeführt, zum Anderen mit IRAG-cDNS und cGKI β -cDNS co-transfizierten COS-7 Zellen. Die beiden transfizierten cDNS befanden sich auf unterschiedlichen Trägerplasmiden. Im Fall der cGKI β handelte es sich um einen cGKI β -IRES-eGFP Vektor. Die cGKI β befindet sich hier zusammen mit dem grün fluoreszierenden Protein GFP auf einem bicistronischen Vektor. Zwischen die beiden Proteine wurde eine IRES-Sequenz gesetzt (IRES für „Internal Ribosomal Entry Site“). Diese Sequenz bewirkt bei der Translation nach der cGKI β einen Stop. Es entstehen zwei funktionelle Proteine und kein Fusionsprotein zwischen cGKI β und eGFP. Transfizierte Zellen konnten durch diese Markierung eindeutig identifiziert werden, ohne das cGKI β -Protein durch eine direkte Markierung verändern zu müssen. Sowohl die Wildtyp Zellen als auch die co-transfizierten Zellen wurden hinsichtlich der Effekte von 8-Br-cGMP auf die Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern untersucht. Dazu wurden die Zellen im Laufe einer Messung mit 1 μ M Bradykinin stimuliert, anschließend mit Tyrode gespült, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation mit oder ohne 1 mM 8-Br-cGMP, einem zellmembrangängigen cGMP-Analogen, und anschließend einer zweiten Stimulation mit Bradykinin.

Bradykinin wurde als Hormon zur Stimulation ausgewählt, da COS-7 Zellen Bradykininrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren (Regoli et al, 1998). Dieses Hormon aktiviert durch die Bindung an seinen Rezeptor, ähnlich wie Noradrenalin, die GTP-bindenden Proteine G $_{q/11}$ und somit die Phospholipase C β .

In **Abbildung C-2** sind beispielhaft einige Kalziummessungen an COS-7 Zellen in Gegenwart von 8-Br-cGMP gezeigt.

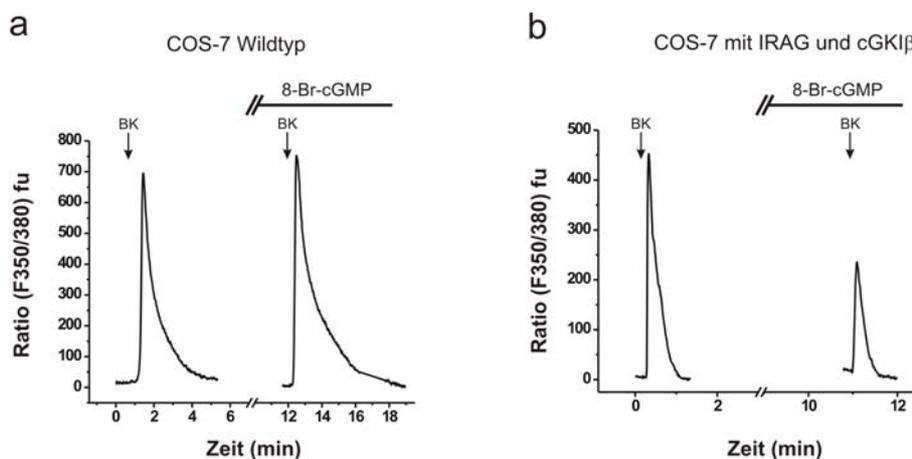


Abbildung C-2: Beispiele für Kalziummessungen in COS-7 Zellen **(a)** Kontrollexperiment einer nicht transfizierten COS-7 Wildtyp Zelle nach Inkubation mit 8-Br-cGMP vor der zweiten Stimulation **(b)** Doppeltransient einer mit IRAG und cGKI β co-transfizierten COS-7 Zelle nach Inkubation mit 8-Br-cGMP vor der zweiten Stimulation. Der schwarze Balken repräsentiert die Inkubationszeit von 1 mM 8-Br-cGMP. BK: Bradykinin.

Die Ergebnisse aller Kalziummessungen an COS-7 Zellen sind in **Abbildung C-3** zusammengefasst.

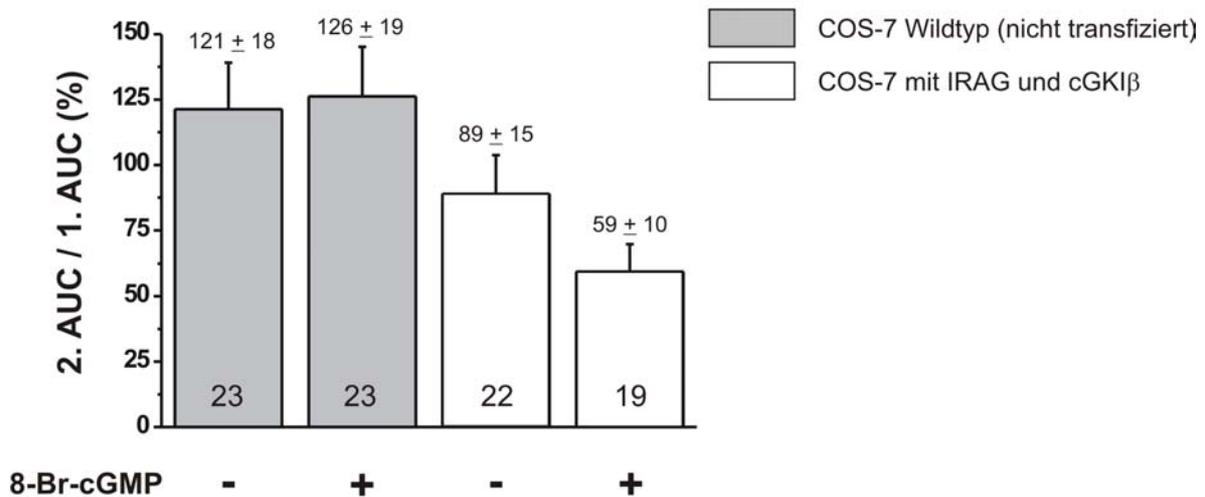


Abbildung C-3: Histogramm der Effekte von 8-Br-cGMP auf Bradykinin-induzierte Kalziumtransienten in COS-7 Wildtyp Zellen und mit IRAG und cGKIβ co-transfizierten COS-7 Zellen. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in den Balken angegeben, der Durchschnittswert mit Fehler darüber. AUC: area under curve.

In den Messungen konnten deutliche Unterschiede zwischen den COS-7 Wildtyp Zellen und den mit IRAG und cGKIβ co-transfizierten Zellen festgestellt werden. Während bei den Wildtyp Zellen eine Inkubation mit cGMP keine Unterdrückung des zweiten Transienten zur Folge hatte, wurde bei den Zellen mit IRAG und cGKIβ eine Verminderung des Kalziumtransienten nach cGMP Einwirkung beobachtet. Schlossmann et al (2000) haben bereits gezeigt, dass bei COS-7 Zellen, die nur mit IRAG oder der cGKIβ transfiziert wurden, keine Reduktion des zweiten Transienten nach Einwirkung von cGMP erfolgt.

Die Effekte in **Abbildung C-3** konnten allerdings nur mit dem cGMP-Analogon 8-Br-cGMP erzielt werden. Eine Inkubation mit 100 μM des cGMP-Analogons 8-pCPT-cGMP hatte sowohl in den Kontrollexperimenten wie in den Experimenten mit co-transfizierten COS-7 Zellen eine Erhöhung des zweiten Transienten zur Folge (Daten nicht gezeigt). Vermutlich kommt es in COS-7 Zellen mit diesem Analogon zu noch nicht bekannten Kreuzreaktionen, eventuell mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase.

C.1.3. Kalziummessungen an glatten Gefäßmuskelzellen

Die Beteiligung von IRAG an der Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration konnte *ex vivo* anhand der im vorigen Kapitel dargestellten Kalziummessungen in COS-7 Zellen gezeigt werden. Eine Bestätigung der physiologischen Rolle von IRAG an der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ *in vivo* sollte anhand von Kalziummessungen an glatten Gefäßmuskelzellen erfolgen. Dazu wurden Primärkulturen von Aorten aus IRAG $^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen und Wildtyp Mäusen (IRAG $^{+/+}$) kultiviert (Geiselhöringer et al, 2004b). Diese Zellen wurden, ähnlich wie die COS-7 Zellen, hinsichtlich der Effekte von 8-Br-cGMP und cBIMPS (ein membrangängiges cAMP-Analogon und damit Aktivator der cAMP-abhängigen Proteinkinase) auf die $[Ca^{2+}]_i$ untersucht.

Die Vorgehensweise zur Kultivierung von glatten Gefäßmuskelzellen, sog. VSMC, ist in B.5. beschrieben. Die Primärkulturen wurden bis zu einer Konfluenz von 60-80% auf Coverslips kultiviert. Je nach Anzahl der ausgesäten Zellen war diese Zelldichte nach 5-8 Tagen erreicht. Bei optimaler Konfluenz wurden die Zellen in serumfreies Kulturmedium überführt. Diese Maßnahme steigert die Erregbarkeit der Zellen bei den Messungen erheblich gegenüber Zellen, die ausschließlich in serumhaltigem Medium kultiviert wurden. In der Regel wurden die Zellen nach 2 Tagen der Kultivierung in serumfreiem Medium gemessen. Im Zuge einer Messung wurden die VSMC zweimal mit je 50 μ l einer 0,5 μ M Noradrenalinlösung stimuliert. Nach der ersten Stimulation wurde die Messkammer mit Tyrode gespült. Anschließend ruhten die Zellen für 5 Minuten (Kontrollexperiment) oder wurden mit 1 mM 8-Br-cGMP bzw. mit 0,1 mM cBIMPS inkubiert. Zuletzt folgte eine zweite Stimulation mit Noradrenalin.

Abbildung C-4 zeigt beispielhaft einige Messungen der hormoninduzierten Kalziumfreisetzung in VSMC.

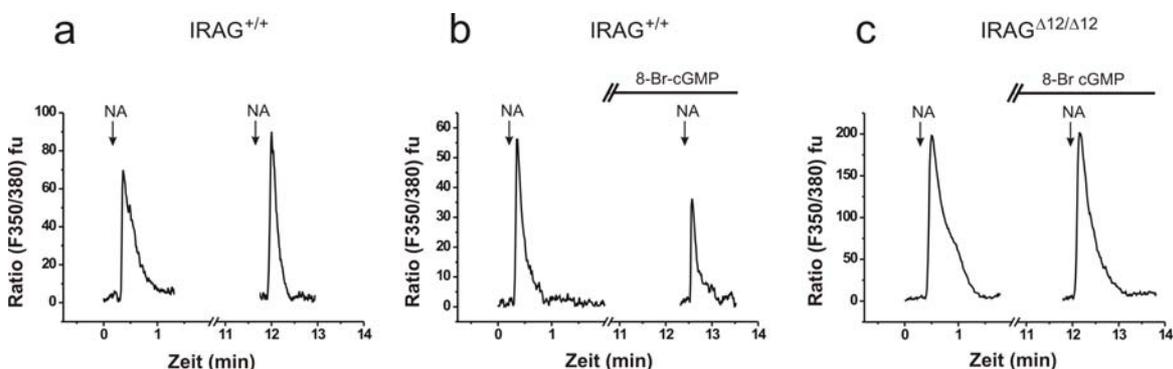


Abbildung C-4: Beispiele für Kalziummessungen in VSMC (a) Kontrollexperiment einer IRAG $^{+/+}$ Zelle (b) Doppeltransient einer IRAG $^{+/+}$ Zelle nach Inkubation mit 8-Br-cGMP vor der zweiten Stimulation (c) Doppeltransient einer IRAG $^{\Delta 12/\Delta 12}$ Zelle nach Inkubation mit von 8-Br-cGMP vor der zweiten Stimulation. Der schwarze Balken repräsentiert die Inkubationszeit von 1 mM 8-Br-cGMP. NA: Noradrenalin.

Ob eine cGMP-abhängige Phosphorylierung von IRAG auf die $[Ca^{2+}]_i$ im glatten Muskel Einfluss nimmt, konnte anhand der Experimente mit dem cGMP-Analogen 8-Br-cGMP analysiert werden. Eine Beteiligung der cAMP-abhängigen Proteinkinase konnte mit Hilfe des cAMP-Analogons cBIMPS untersucht werden.

Eine Zusammenfassung aller durchgeführten Messungen der Noradrenalin-induzierten Kalziumtransienten in VSMC ist in **Abbildung C-5** gezeigt.

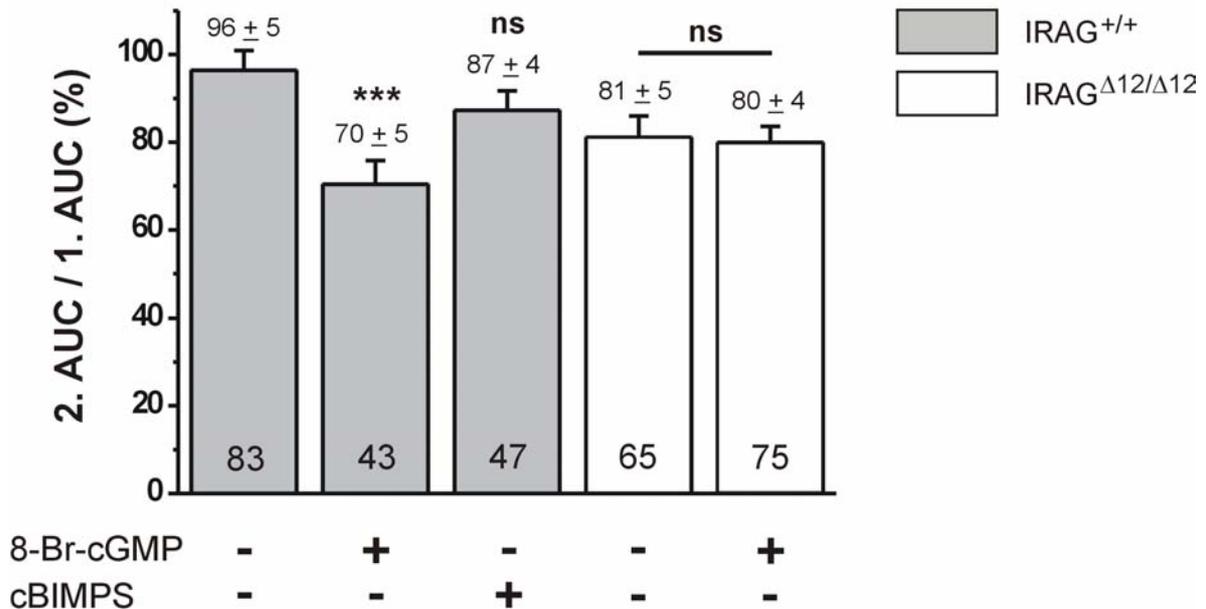


Abbildung C-5: Histogramm aller untersuchten Effekte von 8-Br-cGMP und cBIMPS auf Noradrenalin-induzierte Kalziumtransienten in VSMC von IRAG^{+/+} und IRAG^{Δ12/Δ12}. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in den Balken angegeben, der Durchschnittswert mit Fehler darüber. *** P < 0,001; ns: nicht signifikant.

Die Messungen ergaben eine hoch signifikante Reduktion des Kalziumtransienten nach cGMP-Einwirkung in Wildtyp VSMC. In den glatten Muskelzellen der IRAG^{Δ12/Δ12} Mäuse hatte cGMP dagegen keinen Effekt auf die Noradrenalin-induzierte Kalziumfreisetzung. Das cAMP-Analogen cBIMPS hatte keine Auswirkung auf die Höhe des zweiten Transienten in den Wildtyp VSMC.

Eine Beteiligung von IRAG an der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ *in vivo* über die NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade konnte durch die Kalziummessungen in VSMC in Gegenwart von 8-Br-cGMP bewiesen werden.

C.1.4. Effekt von 8-Br-cGMP auf die Kaliumdepolarisation in VSMC

Mit den folgenden Experimenten sollte der Frage nachgegangen werden, ob IRAG auch an der Depolarisations-induzierten Kalziumregulation beteiligt sein kann. Eine Depolarisation der Zytoplasmamembran, z.B. hervorgerufen durch eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration, führt zu einem gesteigerten Kalziumeinstrom ins Zellinnere, die $[Ca^{2+}]_i$ steigt an.

Für die Depolarisations-induzierten Kalziummessungen wurden wieder glatte Gefäßmuskelzellen von $IRAG^{+/+}$ und $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Mäusen untersucht. Die basale $[Ca^{2+}]_i$ der Primärkulturen von VSMC wurde durch Einwaschen einer 85 mM Kaliumtyrode in die Badlösung erhöht. Nach der Stabilisierung der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgte ein Einwaschen einer 1 mM 8-Br-cGMP Lösung, um den cGMP-Effekt auf die Depolarisations-induzierten Kalziumsignale zu untersuchen.

In **Abbildung C-6** sind beispielhaft einige Experimente gezeigt, bei denen die $[Ca^{2+}]_i$ nach Kaliumdepolarisation an glatten Gefäßmuskelzellen untersucht wurde.

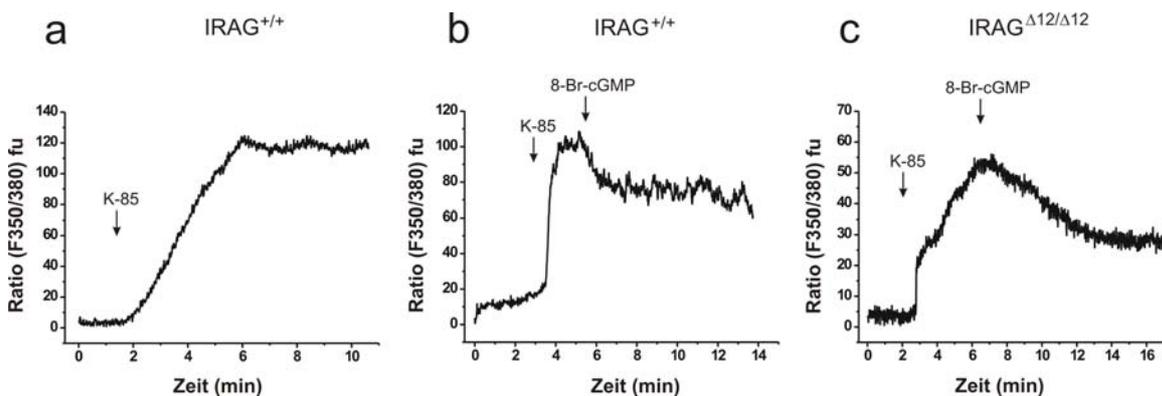


Abbildung C-6: Beispiele für die Effekte von 8-Br-cGMP auf die Kaliumdepolarisations-induzierten Kalziumtransienten in VSMC **(a)** Kalziummessung während der Kaliumdepolarisation einer $IRAG^{+/+}$ Zelle **(b)** Kaliumdepolarisation mit anschließender Inkubation von 8-Br-cGMP einer $IRAG^{+/+}$ Zelle **(c)** Kaliumdepolarisation mit anschließender Inkubation von 8-Br-cGMP einer $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$ Zelle. Die Pfeile markieren den Beginn des Einwaschens der jeweiligen Testsubstanz. K-85: 85 mM Kaliumtyrode.

Der prozentuale Anteil der 8-Br-cGMP induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Abnahme nach stabilisierter Kaliumdepolarisation ist in **Abbildung C-7** zusammengefasst.

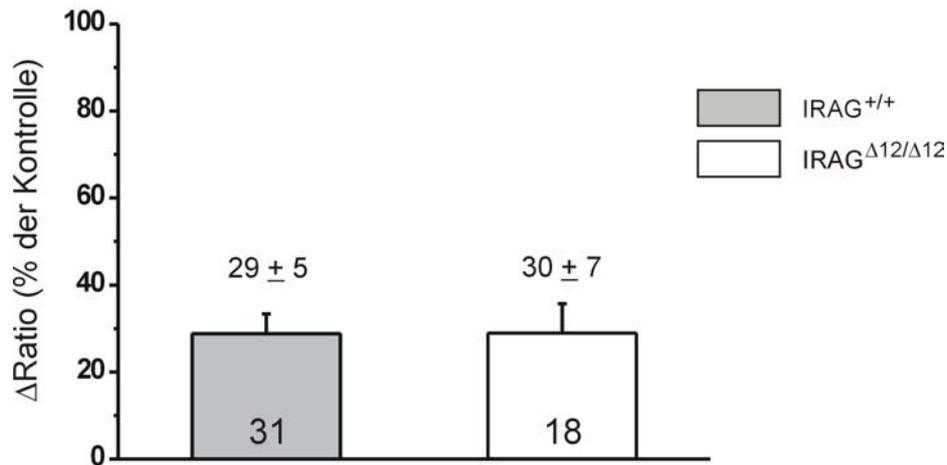


Abbildung C-7: Histogramm der Effekte von 8-Br-cGMP auf die Kaliumdepolarisations-induzierten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in VSMC von IRAG^{+/+} und IRAG^{Δ12/Δ12}. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in den Balken angegeben, der Durchschnittswert mit Fehler darüber.

Die Deletion im *IRAG* Gen und der daraus resultierende Defekt in der Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP₃R haben im glatten Muskel keine Auswirkung auf die Depolarisations-induzierte Kalziumregulation. In VSMC von IRAG^{+/+} und IRAG^{Δ12/Δ12} Mäusen ist die Wirkung von 8-Br-cGMP auf die durch Kaliumdepolarisation induzierte Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ identisch. In beiden Fällen reduziert cGMP den Transienten um etwa 30%. Der Effekt von cGMP, hervorgerufen durch eine Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK), weist darauf hin, dass vermutlich andere Targets dieser Kinase an der Regulation der Depolarisations-induzierten Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ beteiligt sind.

C.2. Generierung einer IRAG Knockout Maus

Im Verlauf dieser Arbeit sollte das Exon 3 des murinen *IRAG* Gens mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems zunächst in ES Zellen und anschließend in der Maus deletiert werden. Dieses Exon kodiert für einen Bereich, der N-terminal zu der Interaktionsstelle von IRAG mit der cGKI β lokalisiert ist (**Abbildung C-8**). Eine Deletion dieses Exons führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zu einem vorzeitigen Translationsstop. Um eine Cre/loxP-vermittelte Deletion zu ermöglichen, musste das Exon 3 von zwei in derselben Orientierung vorliegenden *loxP* Seiten flankiert („gefloxt“) werden (**Abbildung C-8**).

Zunächst musste ein Targeting Vektor konstruiert werden, der die gewünschten Veränderungen im *IRAG* Gen trägt.

C.2.1. Eigenschaften und Konstruktion des Targeting Vektors

Eine Möglichkeit, um Mutationen in das Genom embryonaler Stammzellen einzuführen, erfolgt über homologe Rekombination. Dazu wird ein Targeting Vektor mit der gewünschten Mutation mittels Elektroporation in die ES Zellen eingeschleust. Über eine homologe Rekombination kann die Mutation dann in das Genom integriert werden.

Der Targeting Vektor zur Inaktivierung von IRAG wurde folgendermaßen konstruiert: Um die Deletion des Exons 3 des *IRAG* Gens über die Cre Rekombinase zu ermöglichen, wurde das Exon innerhalb des Vektors von zwei gleichgerichteten *loxP* Seiten flankiert. Die Insertion der beiden *loxP* Seiten erfolgte innerhalb der Introns 5' und 3' des Zielexons um das Exon/Intron Spleißen möglichst nicht zu beeinflussen. Da die Effizienz der homologen Rekombination in eukaryontischen Zellen sehr niedrig ist, wurde in den Targeting Vektor zusätzlich ein Selektionsmarker eingesetzt, über den rekombinante ES Zellklone selektiert werden konnten. In vorliegender Arbeit wurde ein Selektionsmarker verwendet, der ein Neomycinresistenzgen und eine Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus Typ I enthält. Um mögliche Auswirkungen der Expression dieser Selektionsgene auf den Phänotyp der mutierten Maus zu vermeiden, ist das Markergen ebenfalls von zwei gleichgerichteten *loxP* Seiten flankiert. Dadurch war es möglich, den Marker mit Hilfe der Cre Rekombinase später wieder aus dem Genom der ES Zellen zu entfernen (Torres und Kühn, 1997). Der Vektor-Backbone (freundlicherweise von Herrn Dr. Feil zur Verfügung gestellt) enthält demnach eine einzelne *loxP* Seite und den „gefloxten“ Selektionsmarker. Alle 3 *loxP* Seiten befinden sich in der gleichen Orientierung (**Abbildung C-8**). Der homologe 3' Arm, der homologe 5' Arm und das mittlere Fragment, welches zwischen die einzelne *loxP* Seite und den „gefloxten“ Selektionsmarker eingesetzt werden sollte, wurden mittels PCR (B.3.7.) aus einem BAC-Klon (Genome Systems Inc) amplifiziert, mit Hilfe des Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kits subkloniert (B.3.7.4.) und anschließend

sequenziert (B.3.8.). Die verwendeten Primer für die PCR besaßen an den 5` Enden Restriktionsschnittstellen, über welche die Fragmente in den Vektor eingesetzt werden konnten. Zunächst wurde der homologe 5` Arm (2,2 kb) über die Schnittstellen *NotI* und *EagI* in den Vektor eingesetzt, anschließend das mittlere Fragment (0,9 kb) über *BamHI/BgIII*, wodurch beide Schnittstellen zerstört wurden. Zuletzt erfolgte der Einbau des 3` Armes (3,2 kb) über die Schnittstellen *Clal* und *Acc65I*. Der fertige Targeting Vektor hatte eine Größe von 14,1 kb. Die verwendeten Primer und deren Sequenzen sind im Anhang **Tabelle F-1** aufgeführt.

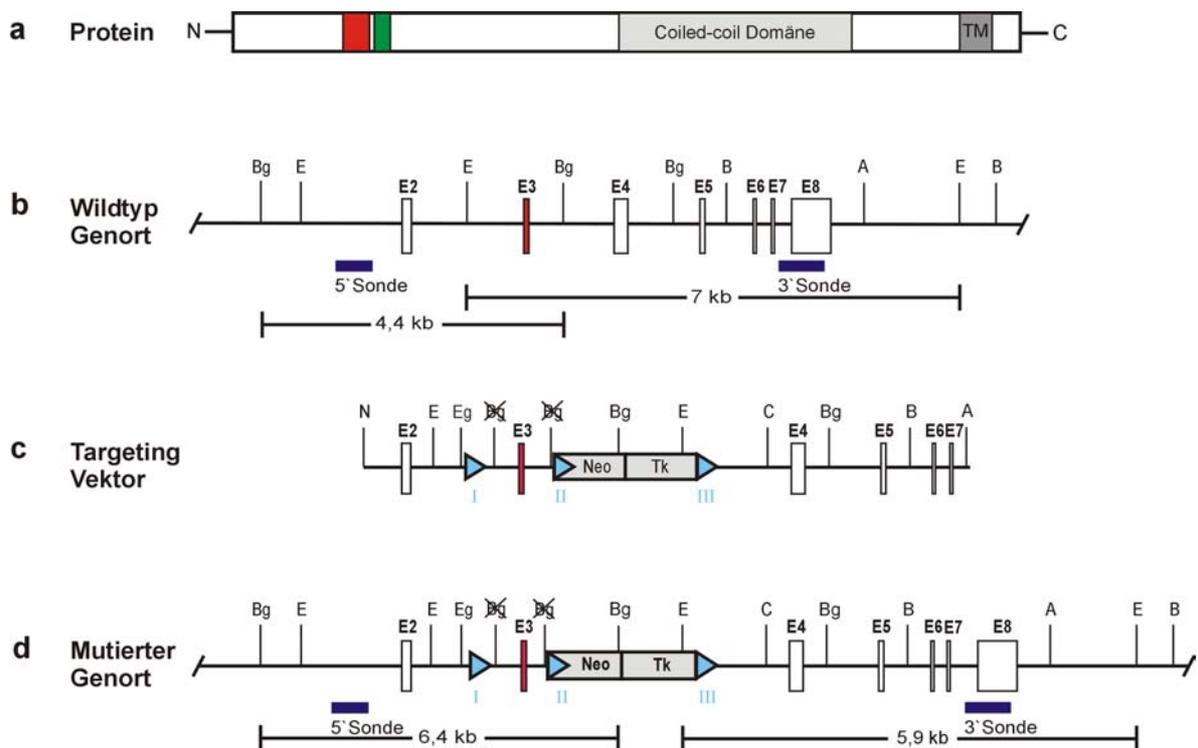


Abbildung C-8: Strategie des Targeting Vektors. **(a)** Primärstruktur des IRAG Proteins mit dem von Exon 3 exprimierten Bereich (rotes Rechteck), der Interaktionsstelle mit der cGKI β (grünes Rechteck), der Coiled-coil Domäne und der Transmembrandomäne (TM); **(b – d)** Wildtyp Genort, Targeting Vektor und mutierter Genort nach erfolgter homologer Rekombination. Blaue Dreiecke: *loxP* Seiten I, II und III, die den Selektionsmarker und das Exon 3 flankieren; weiße Rechtecke: benachbarte Exons; E2-E8: Exon 2 bis Exon 8; blaue Balken: Gensonden zum Nachweis der Modifikationen; A: *Acc65I*; B: *BamHI*; Bg: *BgIII*; C: *Clal*; E: *EcoRV*; Eg: *EagI*; N: *NotI*.

C.2.2. Gensonden zum Nachweis der Mutation im Genom von ES Zellen

Zur eindeutigen Identifizierung der richtigen Integration der Mutationen im Genom der ES Zellen, wurden sowohl für den 5` Bereich als auch für den 3` Bereich Gensonden ausgewählt, die für die Southernblot Hybridisierung verwendet werden konnten (**Abbildung C-8**). Die Gensonden wurden mittels PCR (B.3.7.) amplifiziert und anschließend subkloniert (B.3.7.4.). Bei der 5` Sonde handelt es sich um eine 0,5 kb große intronale Sequenz, die 0,6 kb große 3` Sonde ist eine kombinierte Intron-Exon Sequenz mit Teilen des Exons 8. Beide Sonden befinden sich außerhalb des Targeting Vektors (**Abbildung C-8**). Die für die Sonden verwendeten Primer und Restriktionsenzyme sind im Anhang in den **Tabellen F-1** und **F-2** aufgeführt.

C.2.3. Funktionsanalyse der *loxP* Seiten

Die Funktionalität der drei eingesetzten *loxP* Seiten wurde vor dem Beginn des ES Zell Targetings *in vitro* überprüft. Dazu wurden COS-7 Zellen transient transfiziert (B.4.2.). In einem Kontrollansatz wurde der Targeting Vektor (3 µg) zusammen mit dem Leervektor pBS II (9 µg) transfiziert. In einem zweiten Ansatz wurde der Targeting Vektor (3 µg) zusammen mit dem *Cre*-exprimierenden Plasmid pIC-*Cre* (3 µg) und pBS II (6 µg) transfiziert. Nach Inkubation der COS-7 Zellen über Nacht bei 37°C wurde die DNS, wie unter B.4.2.2. beschrieben, isoliert. Die nach der *Cre*-vermittelten Rekombination stattgefundenen Ereignisse wurden mittels PCR (B.3.7.) analysiert. Die zugrundeliegende PCR-Strategie ist in **Abbildung C-9a** dargestellt. Ein Aliquot jedes PCR Ansatzes wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (**Abbildung C-9b**).

In **Tabelle C-1** sind die verwendeten Primerpaare (siehe auch F.1.) und die zu erwartenden Bandengrößen der PCR Produkte je nach Rekombinationsereignis dargestellt.

Tabelle C-1: Primerpaare zur Funktionsanalyse der *loxP* Seiten

Spur	Primerpaar	Rekombinationsereignis	Größe des PCR Produktes
5	KS34 + KS42	Kein bzw. <i>loxP</i> II + III	279 bp
6	KS36b + KS43b	<i>loxP</i> II + III	250 bp
7	KS34 + KS43b	<i>loxP</i> I + III	256 bp

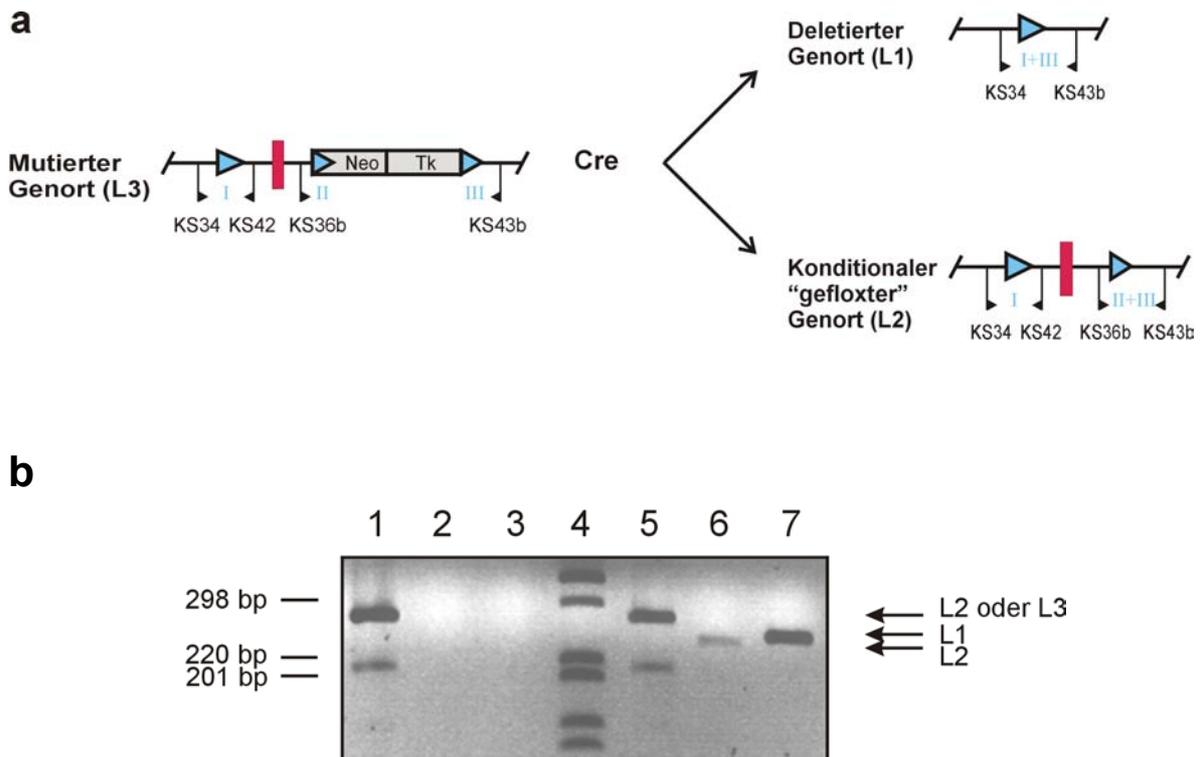


Abbildung C-9: PCR-Strategie zur Detektion der Cre-vermittelten Rekombination **(a)** Mögliche Rekombinationsereignisse. Das Primerpaar KS34 + KS42 detektiert die *loxP* Seite I. Dies ist nur möglich, wenn kein Rekombinationsereignis stattgefunden hat. Das Primerpaar KS36b + KS43b detektiert das Rekombinationsereignis zwischen *loxP* II und III, das Primerpaar KS34 + KS43b das zwischen *loxP* I und III. **(b)** Amplifizierte PCR Banden, die auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. In den Spuren 1-3 sind die Kontrollansätze der Zellen aufgetragen, die nicht mit pIC-Cre transfiziert wurden: Spur 1 (KS34 + KS42), Spur 2 (KS36b + KS43b), Spur 3 (KS34 + KS43b). In Spur 4 wurde kb-Marker aufgetragen. Die Spuren 5-7 zeigen die PCR Ansätze der Zellen, die mit dem Cre-exprimierenden Plasmid pIC-Cre transfiziert wurden. Spur 5 (KS34 + KS42), Spur 6 (KS36b + KS43b), Spur 7 (KS34 + KS43b).

Auf Grund der drei im Targeting Vektor vorhandenen *loxP* Seiten gab es drei mögliche Rekombinationsereignisse. Wie in **Abbildung C-9** gezeigt konnten diese Ereignisse mittels PCR nachgewiesen werden. Das Rekombinationsereignis zwischen den *loxP* Seiten I und II fand hier keine Beachtung, da rekombinante Klone dieser Art mit Hilfe der Thymidinkinase im Laufe des Zweiten Targetings heraus selektioniert wurden. Das Primerpaar KS34 + KS42 bildet nur dann ein PCR Produkt, wenn kein Rekombinationsereignis stattgefunden hat, welches das gefloxtete Exon 3 deletieren würde (*loxP* I + II oder *loxP* I + III). Die obere Bande in Spur 1 (Kontrollansatz) und Spur 5 auf dem Agarosegel entsprach der erwarteten Größe von 279 bp. In diesen beiden Reaktionen mit dem Primerpaar KS34 + KS42 trat noch eine weitere unspezifische Bande auf, die aber mit 210 bp deutlich kleiner war, als das erwartete PCR Produkt. Das Primerpaar KS36b + KS43b führt nur bei einer Rekombination zwischen *loxP* II + III zu einem PCR Produkt.

Bei diesem Rekombinationsereignis wurde der Selektionsmarker deletiert (konditionaler, „gefloxter“ Genort, L2). Die Bande in Spur 6 entsprach der erwarteten Größe von 250 bp. Bei einer Rekombination der *loxP* Seiten I + III werden sowohl der Selektionsmarker, als auch das Exon 3 deletiert (deletierter Genort, L1). Dieses Ereignis ließ sich mit den Primern KS34 + KS43b nachweisen und ergab auch hier eine Bande mit der erwarteten Größe von 256 bp (Spur 7). Die Funktionalität der drei *loxP* Seiten konnte mit diesem Versuch bestätigt werden. Des weiteren war die Nachweisbarkeit der Cre-vermittelten Rekombinationen mittels PCR eine Grundvoraussetzung für die spätere Genotypisierung der Mäuse.

C.2.4. Genetische Modifikation von ES Zellen

Nach der Konstruktion des Targeting Vektors folgt das „Gene Targeting“ in ES Zellen. Dabei wird der Targeting Vektor zunächst durch Elektroporation in die ES Zellen eingebracht und dann die auf dem Vektor befindlichen Mutationen zielgerichtet über homologe Rekombination in das ES Zellgenom integriert. Für einen erfolgreichen Verlauf des Gene Targetings müssen optimale Voraussetzungen gewährleistet sein. Embryonale Stammzellen sind pluripotent, d.h. sie sind noch nicht differenziert. Dieser undifferenzierte Zustand muss für die spätere Keimbahngängigkeit der ES Zellen unbedingt erhalten bleiben. Das wird einerseits durch die Zugabe des Leukämie-inhibierenden Faktor (LIF) ins Nährmedium erreicht (B.7.1.) und andererseits durch einen Zellrasen aus Feederzellen, auf dem die ES Zellen wachsen können. Als Feederzellen wurden embryonale Fibroblasten verwendet, die aus Mausembryos am Tag 14,5 *post coitum* hergestellt worden sind. Die Präparation und Kultivierung der Feederzellen ist unter B.7.2. beschrieben.

C.2.4.1. Homologe Rekombination (Erstes Targeting)

Für die Generierung der Mausmutanten wurden R1 ES Zellen aus dem Mausstamm SV129 eingesetzt. Die Zellen befanden sich zu Beginn des Ersten Targetings in der 15. Passage und wurden zunächst in geeignetem Nährmedium auf einem konfluenten Zellrasen aus Feederzellen kultiviert. Nach zweimaligem Passagieren war eine ausreichende Menge an Zellen vorhanden, um die Elektroporation, wie unter B.7.4.3. beschrieben, durchführen zu können. 50 µg des Targeting Vektors wurden vor der Elektroporation mit *Acc65I* linearisiert und unter sterilen Bedingungen mit Ethanol präzipitiert (B.7.4.1.). 24 Stunden nach der Elektroporation begann die Selektion mit Neomycin. Dem Nährmedium wurde ab diesem Zeitpunkt G418 mit einer finalen Konzentration von 400 µg/ml zugesetzt. Etwa 4 Tage nach der Elektroporation setzte die Selektion ein und die nicht G418 resistenten Klone begannen abzusterben. Vom 6. bis 9. Tag konnten resistente ES Zellklone isoliert werden. Dabei wurde jeder Klon auf zwei Loch einer 96-Loch Platte aufgeteilt und unter

Selektionsdruck kultiviert (B.7.4.5.). Insgesamt wurden etwa 1500 G418 resistente ES Zellklone isoliert. 3 bis 4 Tage nach der Isolierung waren die 96-Loch Platten ausreichend bewachsen, um Gefrierstocks anzulegen (B.7.4.6.) bzw. um für die DNS-Analyse weiter aufgesplittet zu werden.

C.2.4.1.1. Analyse der ES Zellklone durch Southernblot Hybridisierung mittels der 3' Sonde

Die DNS der ES Zellklone wurde aus den 96-Loch Platten isoliert und mittels Restriktionsverdau mit *EcoRV*, Agarosegelelektrophorese und Southernblot Hybridisierung, wie unter B.3.9. beschrieben, analysiert. Für die Hybridisierung der ES Zellklone des Ersten Targetings kam die 3' Sonde zum Einsatz. Im Wildtyp detektiert diese Sonde ein 7 kb großes Fragment des *IRAG* Gens. Nach Integration des Selektionsmarkers und der darin enthaltenen *EcoRV* Schnittstelle verkleinert sich die Bande auf 5,9 kb. Positive ES Zellklone sollten nach der Southernblot Hybridisierung zwei Banden zeigen, eine 7 kb große für das Wildtyp Allel und eine 5,9 kb große für das mutierte Allel (**Abbildung C-10**).

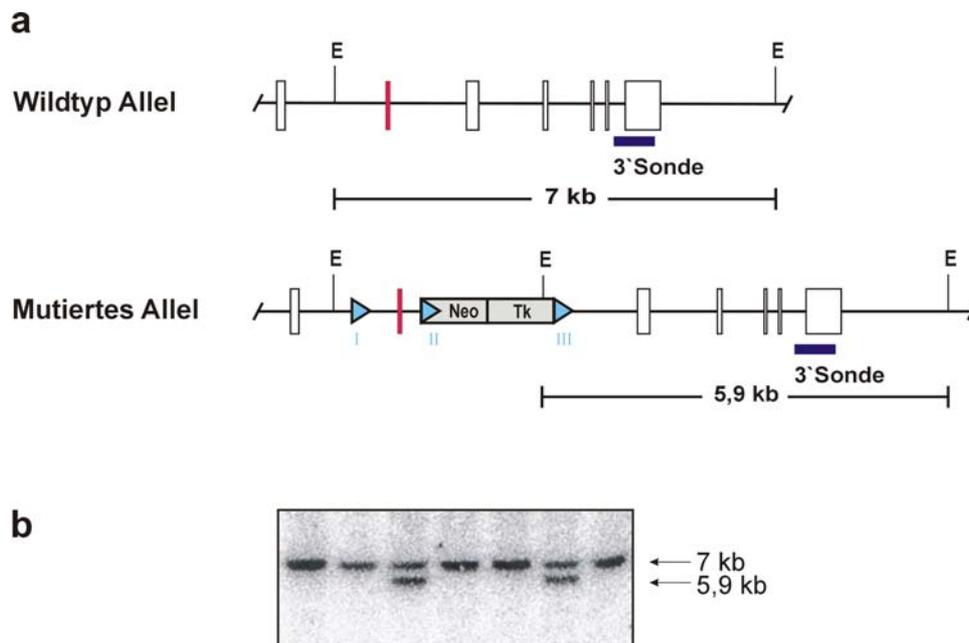


Abbildung C-10: Southernblot Hybridisierung mit der 3' Sonde (a) Strategie der Southernblot Hybridisierung mit der 3' Sonde (b) Southernblot Hybridisierung einiger mit *EcoRV* geschnittener ES Zellklone. Die Bande mit 7 kb entspricht dem Wildtyp Allel, die Bande mit 5,9 kb dem mutierten Genort nach Integration des Selektionsmarkers. E: *EcoRV*.

Es wurden alle 1500 isolierten Klone des Ersten Targetings analysiert. Bei 21 Klonen ergab sich das erwartete Bandenmuster nach Integration des Selektionsmarkers. Diese 21 Klone wurden im Folgenden weiter charakterisiert.

C.2.4.1.2. PCR Analyse zum Nachweis der *loxP* Seite I

Mit Hilfe der Southernblot Analyse konnten 21 ES Zellklone identifiziert werden, die nach homologer Rekombination den Selektionsmarker in ihr Genom integriert hatten. Jedoch konnte damit nicht gezeigt werden, wie groß der integrierte Bereich war und an welchen Stellen das crossing-over statt gefunden hatte. Daher wurden diese 21 Klone mit einer PCR auf das Vorhandensein der *loxP* Seite I hin untersucht, um sicher zu stellen, dass der gesamte erforderliche Bereich ins Genom integriert wurde.

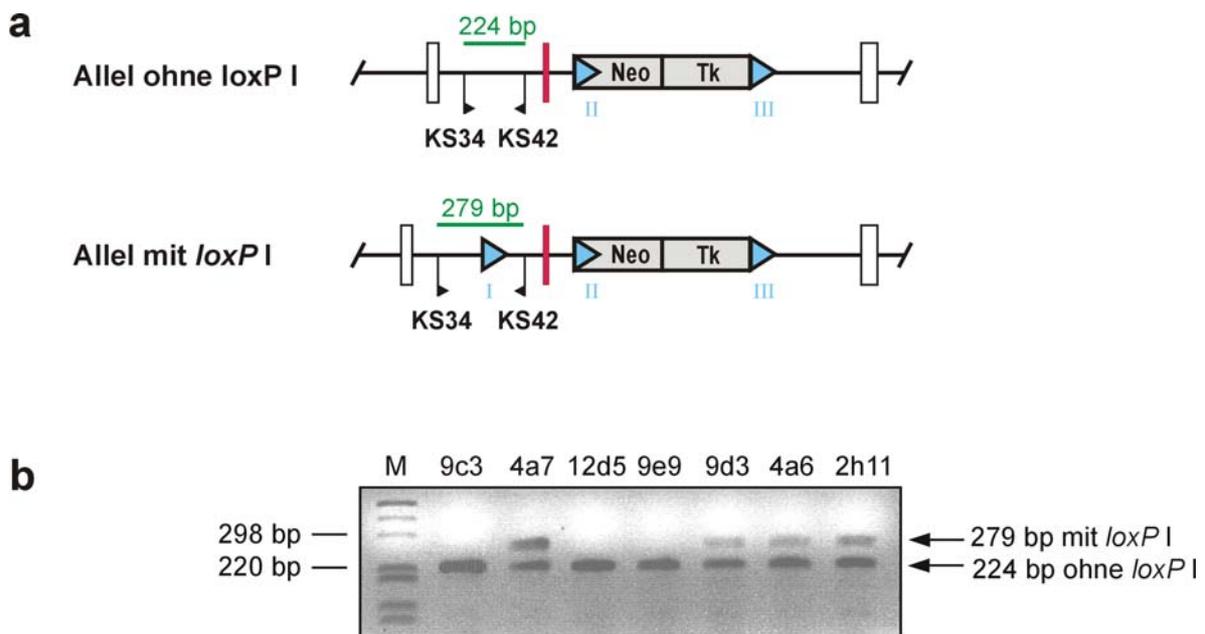


Abbildung C-11: Nachweis der *loxP* Seite I mittels PCR **(a)** PCR Strategie zum Nachweis der *loxP* Seite I. Bei einem Allel ohne *loxP* I ist eine Bande mit 224 bp zu erwarten, mit *loxP* I ein PCR Produkt mit 279 bp **(b)** Agarosegelelektrophorese einiger PCR Reaktionen. Den Spuren wurden die entsprechenden Klone zugeordnet. M: kb-Marker.

Unter den 21 Klonen befanden sich 14 Klone mit integrierter *loxP* I, zu erkennen an den zwei Banden auf dem Agarosegel mit 224 bp und 279 bp. Die beiden Banden repräsentieren die unterschiedlichen Allele. Bei 7 Klonen konnte keine *loxP* I detektiert werden, hier trat im Gelbild nur die kleine Bande mit 224 bp auf. Die beiden Klone 9c3 und 4a7 waren in der Southernblot Hybridisierung negativ und dienten als Kontrollen. Die beiden Banden bei Klon 4a7 resultieren vermutlich aus einer zufälligen Integration des Bereiches der *loxP* I, irgendwo im Genom des ES Zellklons.

C.2.4.1.3. Analyse der ES Zellklone mittels Long-Range PCR

Die Frage, ob das Konstrukt durch homologe Rekombination oder zufällige Integration in das Genom der ES Zellen eingebaut wurde, konnte mit Hilfe einer Long-Range PCR geklärt werden. Dadurch konnte überprüft werden, ob das Konstrukt an der richtigen, homologen Stelle integriert worden ist. Die PCR wurde mit einem Primerpaar durchgeführt, von denen einer außerhalb des Targeting Vektors bindet und einer innerhalb des Konstruktes. KS17 bindet 5' von Exon 2. Dieser Primer wurde außerdem für die Konstruktion der 5' Sonde eingesetzt. Der Primer neo1 bindet innerhalb des Selektionsmarkers im Neomycinresistenzgen (**Abbildung C-12**). Nur im Falle einer homologen Rekombination war ein PCR Amplifikat von 3,9 kb zu erwarten.

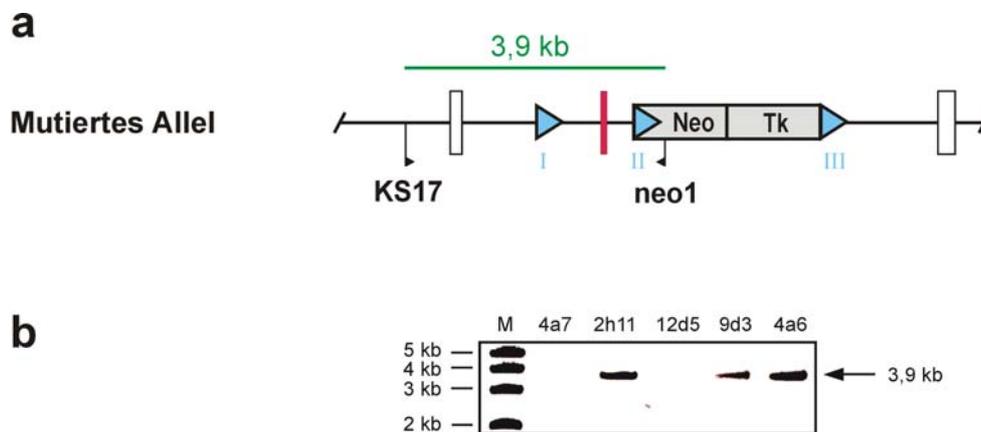


Abbildung C-12: Nachweis der homologen Rekombination durch Long-Range PCR **(a)** PCR Strategie der Long-Range PCR. **(b)** Agarosegelelektrophorese einiger PCR Reaktionen. Den Spuren wurden die entsprechenden Klone zugeordnet. M: kb-Marker.

Das Primerpaar lieferte Amplifikate der erwarteten Größe von 3,9 kb in allen 14 ES Zellklonen, bei denen die *loxP* I Seite nachgewiesen werden konnte. Bei Southernblot negativen Klonen konnte in keinem Fall eine Bande detektiert werden, bei Klonen ohne *loxP* I traten beide Ereignisse auf (siehe Klon 4a7 und 12d5 in **Abbildung C-11** und **C-12** sowie **Tabelle C-2**).

Bei den 14 ES Zellklonen, die sich in allen Punkten als positiv erwiesen haben (Southernblot Hybridisierung, PCR zum Nachweis der *loxP* I und Long-Range PCR), konnte davon ausgegangen werden, dass das Konstrukt vollständig und an der richtigen, homologen Stelle integriert worden ist. Diese Klone konnten im Folgenden für die Cre-vermittelte Reaktion eingesetzt werden.

Tabelle C-2: Charakterisierung der Southernblot positiven ES Zellklone

Southernblot positiver Klon	<i>loxP I</i>	Long-Range PCR	Southernblot positiver Klon	<i>loxP I</i>	Long-Range PCR
2h11	+	+	9e6	+	+
2h12	+	+	9e9	-	-
3e6	+	+	10a8	-	+
4a6	+	+	11b9	+	+
4a10	+	+	12d5	-	-
5c12	-	+	12g6	+	+
6c6	+	+	13c2	-	-
8e1	+	+	14f9	-	+
8g3	+	+	15b1	+	+
9c2	-	+	15h7	+	+
9d3	+	+			

C.2.4.2. Cre-vermittelte Rekombination in ES Zellen (Zweites Targeting)

In einem Zweiten Targeting wurde die Cre-vermittelte Rekombination in ES Zellen durchgeführt. Ziel dieser Sequenz-spezifischen Rekombination war einerseits das Entfernen des Selektionsmarkers, um einen heterozygot, „gefloxten“ *IRAG* Genort zu erhalten und andererseits die Entfernung des Selektionsmarkers zusammen mit dem Exon 3, um Zellklone mit einem heterozygot deletierten *IRAG* Gen zu erhalten. Die 14 aus dem Ersten Targeting positiv hervorgegangenen ES Zellklone (siehe auch **Tabelle C-2**) wurden aufgetaut und wieder in geeignetem Nährmedium auf einem Zellrasen aus Feederzellen in Kultur genommen. Auf Grund ihres morphologisch einwandfreien Aussehens und ihres Wachstumsverhaltens wurden zwei Klone für das Zweite Targeting ausgewählt (Klon 4a10 und 9d3). Die übrigen 12 Klone wurden solange kultiviert, bis jeweils 2 Gefrierkulturen zur Archivierung angelegt werden konnten. Bei den beiden Klonen 4a10 und 9d3 war nach 4-maligem Passagieren eine ausreichende Zellzahl vorhanden, um sie mit dem Cre-exprimierenden Plasmid pIC-*Cre* zu elektroporieren. Die Klone befanden sich zum Zeitpunkt der Elektroporation in Passage 23. Es wurden mit je ca. 1×10^7 Zellen mit $40 \mu\text{g}$ pIC-*Cre*, wie unter B.7.5. beschrieben, elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden von jedem der beiden Ansätze unterschiedliche Zellzahlen auf Petrischalen mit Feederzellen ausplattiert (4×10^6 Zellen, 3×10^6 Zellen, 2×10^6 Zellen, 1×10^6 Zellen, 5×10^5 Zellen, 2×10^5 Zellen). 2 bis 3 Tage nach der Elektroporation, je nach Zelldichte in den Petrischalen, wurde mit der Selektion auf das Thymidinkinasegen begonnen. Dazu wurde dem Medium Ganciclovir in einer finalen Konzentration von $0,2 \mu\text{M}$ zugegeben und die Zellen damit inkubiert. Ganciclovir ist für die Zellen toxisch, welche die

Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Typ I in ihr Genom integriert haben. Das bedeutet, es sterben alle Zellen ab, die nicht mit pIC-*Cre* transfiziert worden waren oder bei denen die Cre-vermittelte Rekombination zwischen den *loxP* Seiten I und II stattgefunden hat, was zur Deletion des Exon 3, nicht aber zur Deletion des Selektionsmarkers geführt hat. Etwa 4 Tage nach der Elektroporation trat die Selektion ein und die ersten ES Zellkolonien begannen abzusterben. Am 8. und 9. Tag nach der Elektroporation konnten Ganciclovir-resistente Klone, wie unter B.7.5. beschrieben, isoliert werden. Von den beiden Ausgangsklonen 4a10 und 9d3 wurden je 150 Klone gepickt, auf zwei Loch einer 96-Loch Platte aufgeteilt und weiter unter Selektionsdruck inkubiert. Nach weiteren 3 bis 4 Tagen waren die 96-Loch Platten ausreichend bewachsen um Gefrierstocks anzulegen (B.7.4.6.) bzw. um für die DNS-Analyse weiter aufgesplittet zu werden.

C.2.4.2.1. Analyse der ES Zellklone durch Southernblot Hybridisierung mittels der 5' Sonde

Um festzustellen, bei welchen ES Zellklonen eines der gewünschten Cre-vermittelten Rekombinationsereignisse stattgefunden hatte, wurden die isolierten Klone erneut mittels Southernblot Hybridisierung untersucht. Dazu wurde, wie auch schon beim Ersten Targeting, die DNS der ES Zellklone aus den 96-Loch Platten isoliert, mit *Bgl*III verdaut und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (B.3.9.). Anschließend erfolgte eine Southernblot Hybridisierung mit der 3' Sonde. Im Wildtyp detektiert diese Sonde ein 4,4 kb großes Fragment des *IRAG* Gens. Im Falle einer Rekombination zwischen den *loxP* Seiten II + III entsteht ein konditionaler Genort mit herausgeschnittenem Selektionsmarker und daraus resultierend eine Southernblot Bande von 6,1 kb. Bei dem deletierten Allel, entstanden aus der Rekombination von *loxP* I + III, verkleinert sich die Bande auf 5,1 kb, da zusätzlich zum Selektionsmarker auch der Bereich um Exon 3 entfernt wurde (**Abbildung C-13**).

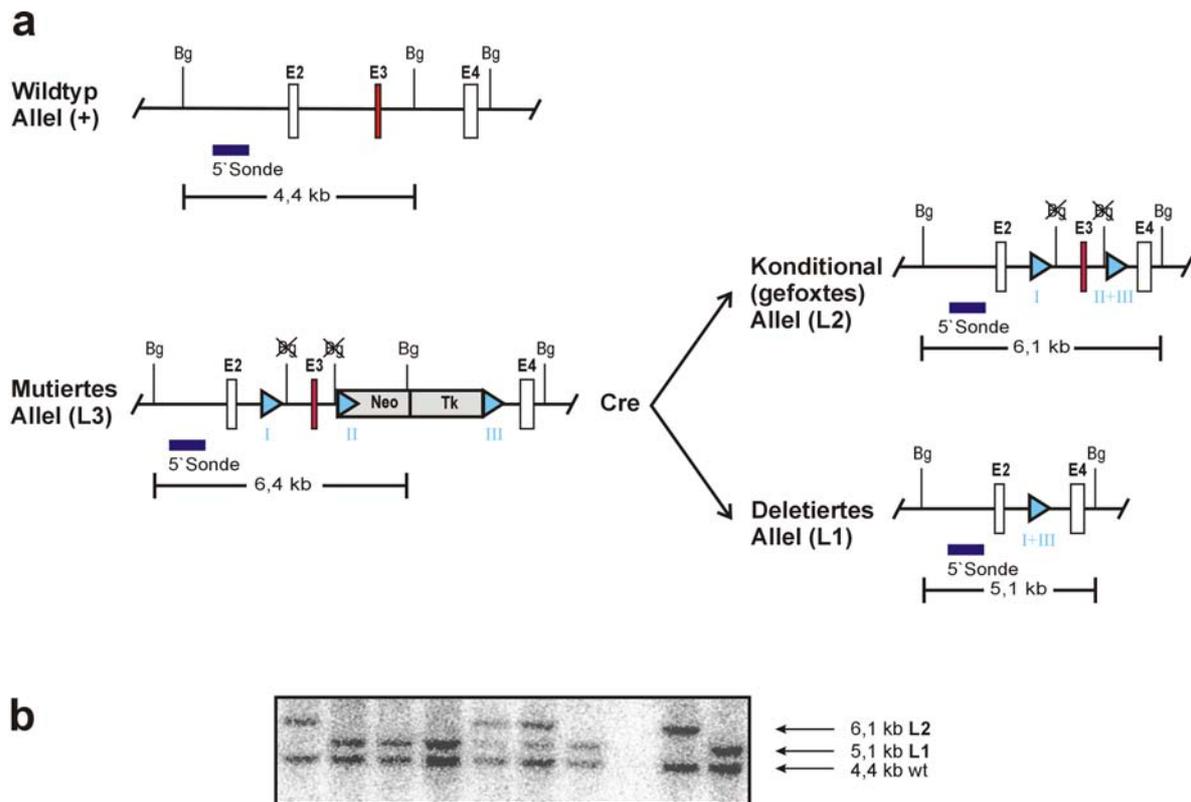


Abbildung C-13: Southernblot Hybridisierung mit der 5' Sonde **(a)** Strategie der Southernblot Hybridisierung mit der 5' Sonde. **(b)** Southernblot Hybridisierung einiger mit *Bg/II* verdauter ES Zellklone. Die Banden mit 4,4 kb entsprechen einem Wildtyp Allel (wt), die Banden bei 6,1 kb einem konditional, gefloxtes Allel (L2). Ein deletiertes Allel (L1) wird durch die Banden mit 5,1 kb repräsentiert. Bg: *Bg/II*.

Die unterschiedlichen Rekombinationsereignisse, vermittelt durch die Cre-Rekombinase, konnten mit Hilfe dieser Southernblot Hybridisierung eindeutig identifiziert werden. Es wurden alle 300 isolierten ES Zellklone des Zweiten Targetings (je 150 von den primären ES Klonen 4a10 und 9d3) untersucht. Dabei konnten zum einen zahlreiche Klone mit einem Wildtyp Allel und einem gefloxtes Allel identifiziert werden, sogenannte +/L2 Klone (L2 für zwei verbleibende *loxP* Seiten im Genort). Zum anderen wurden auch Klone mit einem Wildtyp Allel und einem deletierten Allel, sogenannte +/L1 Klone identifiziert (L1 für eine verbleibende *loxP* Seite im Genort). Bei Klonen, die alle drei Banden im Gel zeigen, handelt es sich um Mischklone, die im weiteren Verlauf nicht mehr zum Einsatz gekommen sind.

C.2.4.3. Injektion der ES Zellklone in Blastozysten

Einige der im Zweiten Targeting identifizierten ES Zellklone wurden wieder in Kultur genommen und für die Injektion in Blastozysten vorbereitet (B.7.6.). Welche Klone dazu verwendet wurden ist in **Tabelle C-3** aufgeführt.

Die Mikroinjektion der genetisch modifizierten ES Zellen in Blastozysten wurde von Frau Dr. Feil durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Injektion befanden sich die ES Zellklone in Passage 26-31. Bei 6 Ammenmüttern wurden Blastozysten mit genetisch modifizierten +/L2 ES Zellen reimplantiert, bei 11 Ammenmüttern Blastozysten mit +/L1. Welcher Mausstamm dabei für welchen Schritt verwendet wurde ist unter B.7.6. beschrieben. Ein Schema zum gesamten Ablauf ist in **Abbildung B-2** dargestellt. Aus den injizierten Blastozysten gingen chimäre Mäuse hervor, die im Weiteren noch auf ihre Keimbahngängigkeit hin untersucht werden müssen.

Tabelle C-3: Übersicht der reimplantierten ES Zellklone

Primärer ES Zellklon	Sekundärer ES Zellklon	Reimplantierte Blastozysten	Nachkommen	Chimären
4a10	1h2 (L1)	16	0	0
4a10	1h6 (L1)	24	0	0
4a10	2b5 (L1)	68	8	10%
4a10	1a4 (L2)	25	6	40%, 10%, 3%
4a10	1c3 (L2)	15	3	40%, 30%
9d3	3f2 (L1)	16	6	0
9d3	4f2 (L1)	14	0	0
9d3	6e2 (L2)	32	8	80%, 60%, 30%, 10%, 5%

D. Diskussion

D.1. Physiologische Bedeutung von IRAG bei der Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration

Die Modulation der zytosolischen Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ spielt bei vielen zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle. Der intrazelluläre Kalziumspiegel beeinflusst unter anderem die Kontraktion und Relaxierung von glatten Muskelzellen und damit den Tonus von Gefäßen und gastrointestinalen Organen. Die cGMP-abhängige Proteinkinase I spielt bei der Ca^{2+} -abhängigen und -unabhängigen Relaxierung der glatten Muskulatur eine entscheidende Rolle. Die relative Bedeutung dieser Mechanismen ist bis heute unklar. Die β -Isoform der cGKI bildet zusammen mit dem IP_3 -Rezeptor I und IRAG einen makromolekularen Komplex, welcher an der Membran des ER lokalisiert ist (Schlossmann et al, 2000; Ammendola et al, 2001). Inwieweit IRAG, ein Substratprotein der cGKI β , an der Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration der glatten Muskulatur beteiligt ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

In den Kalziummessungen an COS-7 Zellen haben sich deutliche Unterschiede der Kalziumregulation von Wildtyp Zellen und mit IRAG/cGKI β co-transfizierten Zellen gezeigt. Während bei den Wildtyp Zellen eine Inkubation mit cGMP keinen Einfluss auf den Hormon-induzierten Transienten hatte, verminderte sich der Kalziumtransient nach cGMP Einwirkung bei den co-transfizierten Zellen erheblich. Eine Expression nur eines dieser Proteine in COS-7 Zellen hatte keine Auswirkung auf die Regulation des Kalziumspiegels (Schlossmann et al, 2000). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass zumindest *ex vivo* im System der COS-7 Zellen eine Beteiligung von IRAG an der cGMP-abhängigen Regulation des intrazellulären Kalziumspiegels unabdingbar ist. Die cGKI β oder IRAG alleine sind nicht in der Lage mit dem endogen exprimierten IP_3RI die Kalziumkonzentration zu modulieren. Erst mit der Expression aller drei Proteine (IP_3RI , cGKI β und IRAG) erfolgt eine Komplexbildung und damit verbunden eine Reduktion des Kalziumausstromes aus dem ER unter Einwirkung von cGMP.

In vivo ergaben sich hoch signifikante Unterschiede in der cGMP-vermittelten Kalziumregulation glatter Gefäßmuskelzellen der IRAG $\Delta^{12/\Delta^{12}}$ Deletionsmutante verglichen mit Wildtyp Zellen. Eine Reduktion des Hormon-induzierten Kalziumtransienten nach Vorinkubation von cGMP konnte zwar bei den Wildtyp VSMC beobachtet werden, nicht aber bei den VSMC aus IRAG $\Delta^{12/\Delta^{12}}$ Mäusen mit einer zerstörten Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP_3RI .

Fritsch et al (2004) konnten anhand von Kalziummessungen an humanen Colonzellen die physiologische Bedeutung von IRAG untermauern. In der gastrointestinalen, glatten Muskulatur ist IRAG an der NO/cGMP-abhängigen Signalübertragung beteiligt.

Neuere Ergebnisse in der Maus haben gezeigt, dass eine Inaktivierung der Ca^{2+} -abhängigen cGKI/IRAG-Signalübertragung die cGMP-abhängige Relaxierung der glatten Muskulatur inhibiert (Geiselhöringer et al, 2004b).

Diese Ergebnisse bestätigen die bisherigen Vermutungen, dass die cGKI β den Tonus der glatten Muskulatur tatsächlich über die Modulation der zytosolischen Kalziumkonzentration reguliert. Die cGKI/IRAG-Signalübertragung ist dabei ein entscheidender Mechanismus bei der cGMP-vermittelten Regulation des intrazellulären Kalziums.

Darüber hinaus beeinflussen zahlreiche andere Zielproteine der cGKI die zytosolische Kalziumkonzentration und damit möglicherweise die Kontraktilität der glatten Muskulatur. Phospholamban ist ein kleines, 5 kDa Protein, das in der Membran des ER lokalisiert ist. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass Phospholamban in der glatten Muskulatur von der cGKI phosphoryliert wird (Raeymaekers et al, 1988; Lalli et al, 1999; Koller et al, 2003). Durch die Phosphorylierung von Phospholamban wird dessen inhibitorische Wirkung auf die Ca^{2+} -ATPase aufgehoben. Die Aufnahme von Kalzium in die intrazellulären Speicher des ER über die Ca^{2+} -ATPase wird dadurch erhöht, als Folge sinkt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Tada, 2003; Saucerman and McCulloch, 2004). Im Mausmodell hat eine Deletion von Phospholamban jedoch keinen Einfluss auf die cGMP-abhängige Relaxierung der glatten Muskulatur (Lalli et al, 1999).

Ein weiterer Ca^{2+} -abhängiger Mechanismus der cGKI ist die Phosphorylierung und damit Aktivierung der Kalzium-aktivierten Kaliumkanäle (BK_{Ca}) (Zhou et al, 2001). Durch Phosphorylierung der BK_{Ca} -Kanäle wird deren Offenwahrscheinlichkeit erhöht, das führt zu einer Hyperpolarisation der Membran. Dadurch werden L-Typ Kalziumkanäle geschlossen und es gelangen weniger Ca^{2+} -Ionen ins Zellinnere (Alioua et al, 1998; Fukao et al, 1999; Sausbier et al, 2000). Neuere Studien über die Funktion der BK_{Ca} -Kanäle in der glatten Muskulatur bestätigen deren Bedeutung bei der Regulation des Muskeltonus. Die Abwesenheit funktionierender BK_{Ca} -Kanäle in der glatten Muskulatur der Blase erhöht die basale Kontraktilität der Blasenmuskulatur und führt dadurch zu einer Überfunktion der Blase und Inkontinenz (Meredith et al, 2004).

Der Transport von Ca^{2+} -Ionen über die Zytoplasmamembran ist ein wesentlicher Mechanismus zur Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration. Im Gegensatz zu einer Hyperpolarisation führt eine Depolarisation der Zytoplasmamembran zu einem erhöhten Kalziumeinstrom ins Zellinnere, die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ steigt an. Bezüglich des Effektes von cGMP auf eine Kaliumdepolarisation in VSMC konnten keine Unterschiede zwischen $\text{IRAG}^{\Delta 12/\Delta 12}$ und $\text{IRAG}^{+/+}$ festgestellt werden. In beiden Fällen reduzierte cGMP den Transienten um etwa 30%. Die Mutation im *IRAG* Gen hat demnach keinen Einfluss auf die Depolarisations-induzierte Veränderung in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Diese wird vermutlich von

weiteren cGKI-Targets reguliert, evtl. über eine Phosphorylierung durch die cGKI α (Feil et al, 2002). Mögliche Targets, die für den Effekt der cGKI nach einer Membrandepolarisation verantwortlich sein könnten, sind z.B. L-Typ Kalziumkanäle (Ruiz-Velasco et al, 1998). Die Öffnung dieser Kanäle spielt auch bei der Rezeptor-gesteuerten Kontraktion der glatten Muskulatur eine bedeutende Rolle (Moosmang et al, 2003; Wegener et al, 2004).

Die unterschiedlichen Effekte der Mutation des *IRAG* Gens, sowie die Lokalisierung von IRAG über den trimeren Komplex mit der cGKI β und dem IP₃RI an der Membran des ER deuten darauf hin, dass die cGKI β /IRAG Signalübertragung spezifisch den intrazellulären Kalziumausstrom aus dem ER beeinflusst.

Dennoch können für den Effekt von cGKI/IRAG auf die [Ca²⁺]_i auch andere Mechanismen diskutiert werden, die vermutlich an der Plasmamembran lokalisiert sind. Eine Möglichkeit wäre die Regulation von TRP-Kanälen (TRP für „Transient Receptor Potential“) durch eine Phosphorylierung durch die cGKI (Kwan et al, 2004). TRP-Kanäle fungieren als sog. SOCs (SOC für „Store-operated channels“) in der Zytoplasmamembran von Säugetierzellen (Nilius und Droogmans, 2001; Montell et al, 2002; Plant und Schaefer, 2003). Es handelt sich um Ca²⁺-permeable Kationenkanäle, die über die G-Protein/PLC/IP₃-Signalkaskade geöffnet werden (Inoue et al, 2001; Plant und Schaefer, 2003). Über die Stimulation der PLC werden die intrazellulären Kalziumspeicher des ER entleert. Diese Speicherentleerung aktiviert Signalmoleküle, die den Kalziumeinstrom ins Zellinnere über TRP-Kanäle zur Folge haben. Es besteht eine direkte Kopplung zwischen dem N-Terminus des IP₃R und dem C-Terminus der TRP-Kanäle (Tiruppathi et al, 2003). IRAG könnte daher auch über seine Kopplung an den IP₃R auf den Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum durch TRP-Kanäle Einfluss nehmen.

Eine Beteiligung der cAMP-abhängigen Proteinkinase an der Hemmung Hormon-induzierter Kalziumtransienten konnte ausgeschlossen werden. Das cAMP-Analagon cBIMPS bewirkte keine Veränderungen in der Höhe der Transienten von Wildtyp Zellen. Das lässt die Folgerung zu, dass verschiedene, unabhängige Mechanismen existieren, welche die intrazelluläre [Ca²⁺] und damit den Tonus der glatten Muskulatur modulieren. Sowohl cAMP, wie auch cGMP sind als sekundäre Botenstoffe an der Übertragung intrazellulärer Signale in glatten Muskelzellen beteiligt (Matsumoto et al, 2003). Die cAMP-abhängige Proteinkinase beeinflusst durch die Modulation der Aktivität von L-Typ Kalziumkanälen die zytosolische Kalziumkonzentration (Ruiz-Valesco et al, 1997; Zhou et al, 2001). Dagegen wird die Veränderung der zytosolischen [Ca²⁺] in der glatten Muskulatur über die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern des ER vermutlich im Wesentlichen von der cGKI reguliert.

Neben den Kalziumabhängigen Mechanismen nimmt die cGMP-abhängige Proteinkinase auch über Kalziumunabhängige Mechanismen Einfluss auf den Tonus der glatten Muskulatur. Der wichtigste bisher bekannte Ca^{2+} -unabhängige Weg ist dabei der Rho/Rho-Kinase Signalweg (Somlyo und Somlyo, 2000). Das kleine GTP-bindende Protein Rho aktiviert die Rho-Kinase, diese phosphoryliert daraufhin die regulatorische Untereinheit der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP). Das resultiert in einer verminderten MLCP-Aktivität und führt zu einer erhöhten Phosphorylierung der Myosin-Leichten-Kette (Somlyo und Somlyo, 2000; Webb, 2003). Eine Phosphorylierung von Rho durch die cGKI wirkt dessen inhibitorischer Wirkung auf die MLCP entgegen, als Folge wird die MLC dephosphoryliert und der glatte Muskel relaxiert (Pfitzer, 2001; Münzel et al, 2003). Neuere Studien haben gezeigt, dass Rho in der glatten Muskulatur auch Ca^{2+} -abhängig aktiviert werden kann. Auch diese Aktivierung führt zu einer verminderten MLCP-Aktivität (Brozovich, 2003; Sakurada et al, 2003).

Sowohl die cAK, als auch die cGK sind in der Lage, direkt die regulatorische Untereinheit der MLCP (MBS für „myosin binding site“) zu phosphorylieren. Wooldridge et al (2004) konnten zeigen, dass eine Phosphorylierung der MBS durch die cAK oder die cGK eine weitere Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit durch die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) unterbindet.

Ein weiterer Ca^{2+} -unabhängiger Weg der Regulation des glatten Muskeltonus wird von CPI-17 vermittelt. Das glattemuskelspezifische MLCP-Inhibitor Protein CPI-17 (CPI-17 für „PKC potentiated inhibitor protein-17 kDa“) wird von zahlreichen Kinasen wie z.B. der Proteinkinase C phosphoryliert (Somlyo und Somlyo, 2003). In seiner phosphorylierten Form inhibiert CPI-17 die Aktivität der MLCP um ein Vielfaches und beeinflusst so die Kontraktilität der glatten Muskulatur (Kitazawa et al, 2004). Neuere Studien haben gezeigt, dass cGMP-abhängige Proteinkinasen eine Dephosphorylierung von CPI-17 zur Folge haben können, die inhibitorische Wirkung auf die MLCP kann dadurch rückgängig gemacht werden (Bonnevier und Arner, 2004).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass IRAG durch die Beteiligung an der NO/cGMP/cGKI-Signalübertragung entscheidend an der Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration der glatten Muskulatur und damit des Muskeltonus beteiligt ist. Durch eine Phosphorylierung von IRAG über die cGKI β wird cGMP-abhängig die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ moduliert. Ob IRAG nur über die Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern des ER oder auch über andere Mechanismen auf die zytosolische Kalziumkonzentration Einfluss nimmt, muss noch in weiteren Studien untersucht werden.

Ein mögliches Modell für die Hormon-induzierte Kalziumfreisetzung und die Beteiligung von IRAG am NO/cGMP/cGKI-Signalweg ist in **Abbildung D-1** gezeigt.

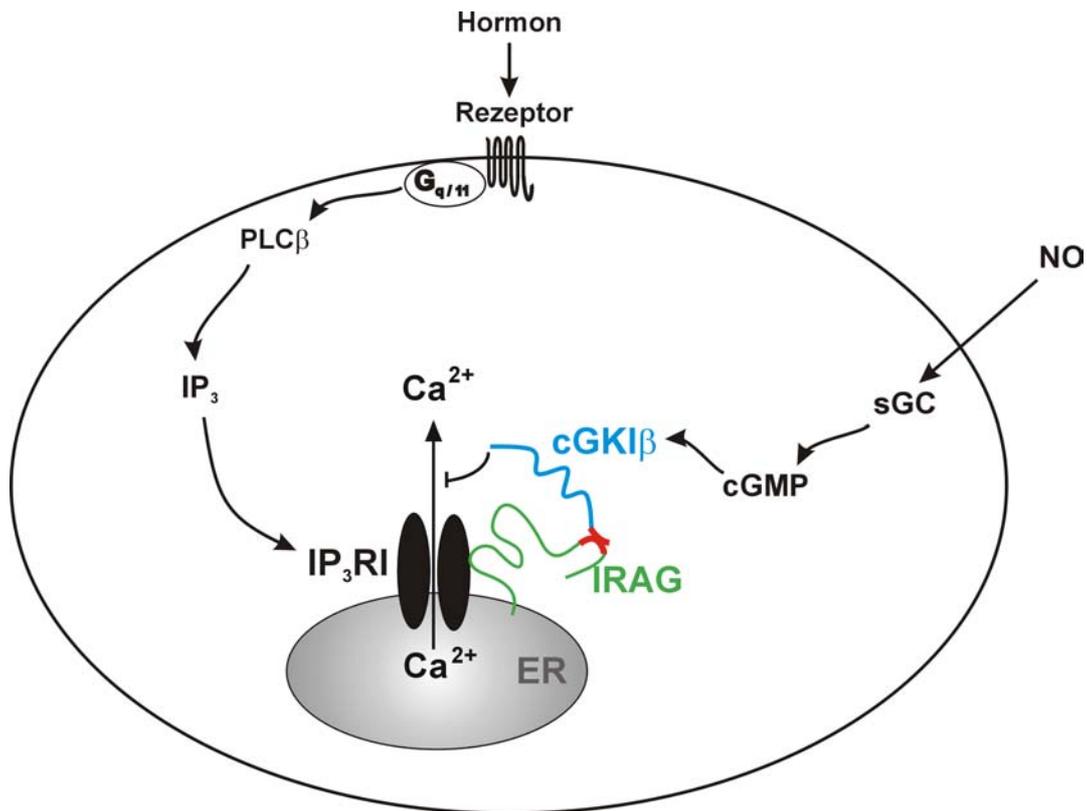


Abbildung D-1: Modell für die Beteiligung von IRAG an der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade im glatten Muskel. Durch die Interaktion von IRAG mit der cGKIβ kommt es zur perinukleären Lokalisierung der Kinase am ER und somit zur Formierung des trimeren Komplexes aus IP₃RI, IRAG und cGKIβ. Durch die Phosphorylierung von IRAG durch die cGKIβ wird die IP₃-induzierte Kalziumfreisetzung aus dem ER gehemmt.

D.2. Genetische Modifikation von IRAG mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems

Die Einführung genetischer Modifikationen in das Genom von Mäusen hat in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Eine Vielzahl von Mausmodellen mit definierten Veränderungen haben wesentlich zu unserem Verständnis der Funktionen von Genen und deren Proteine beigetragen. Mit Hilfe des Gene Targetings können Gene zielgerichtet innerhalb des Genoms embryonaler Stammzellen modifiziert werden (Jaenisch, 1988; Capecchi, 1989).

Bei der klassischen Geninaktivierung wird in der Regel ein Selektionsmarkergen in das Zielgen eingesetzt. Man erzielt dadurch eine permanente Modifikation in der Keimbahn der Maus, d.h. es sind alle Zellen des Tieres während der prä- und postnatalen Entwicklung davon betroffen (Rajewsky et al, 1996). Ein klassischer Knockout hat allerdings einige Einschränkungen. Das Verbleiben des Selektionsmarkers im mutierten Gen, der für die

Selektion rekombinanter ES Zellklone eingesetzt wurde, könnte Einfluss auf den Phänotyp der Mausmutante haben. Weiter kann die Veränderung von essentiell lebenswichtigen Genen, oder solchen, die an der Embryonalentwicklung beteiligt sind, zu embryonal letalen Mausmutanten, oder Tieren mit schweren Defekten und einer eingeschränkten Lebensfähigkeit führen. Die Folgen eines Gendefektes können in solchen Fällen nur schwer untersucht werden. Gewebe- oder zeitspezifische Untersuchungen der Genfunktionen sind mit einem konventionellen Knockout grundsätzlich nicht möglich.

Eine hilfreiche Weiterentwicklung der klassischen Geninaktivierung ist ein konditionaler Knockout. Bei der konditionalen Mutagenese mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystem wird das Zielgen räumlich und zeitlich kontrolliert inaktiviert (Metzger und Feil, 1999). Bei dieser Methode werden *loxP* Sequenzen durch homologe Rekombination in die Introns des Zielgens eingebracht, der zu deletierende Bereich wird dadurch „gefloxt“ (siehe **Abbildung C-13**). Nun kann durch eine Cre-vermittelte Rekombination in ES Zellen (*in vitro*) oder durch Verpaarung mit einer „Cre-deleter“ Maus (*in vivo*) eine Deletion bereits in der Keimbahn und somit in allen Zellen der Tiere erzeugt werden. Durch eine Verpaarung der konditionalen, „geflochten“ Maus mit einer Maus, welche die Cre-Rekombinase nur unter einem gewebespezifischen Promotor exprimiert, kann eine gewebespezifische oder somatische Deletion erzeugt werden. Durch die Verwendung eines „geflochten“ Selektionsmarkers kann auch dieser Cre-vermittelt wieder entfernt werden. So können mögliche, störende Auswirkungen, bedingt durch die Selektionsmarkergene, unterbunden werden.

In vorliegender Arbeit wurden mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystem und der homologen Rekombination in ES Zellen der Maus verschiedene, genetische Modifikationen innerhalb des *IRAG* Gens erzeugt. Ziel ist es, genetisch veränderte Mauslinien zu erhalten, um die physiologische Rolle von IRAG näher untersuchen zu können. Im Gegensatz zu der bereits etablierten Deletionsmutante $IRAG^{\Delta 12/\Delta 12}$, bei der nur der N-terminale Bereich der Coiled-coil Domäne deletiert wurde, sollte hier die Voraussetzung geschaffen werden, das *IRAG* Gen in der Maus komplett auszuschalten, vor allem aber die Interaktionsstelle mit der cGKI β . IRAG konnte als ein Substratprotein der cGMP-abhängigen Proteinkinase I identifiziert werden (Schlossmann et al, 2000). Das 125 kDa Protein liegt zusammen mit dem IP₃-Rezeptor Typ I und der β -Isoform der cGKI als trimerer Komplex vor und konnte in vielen glattmuskulären Geweben nachgewiesen werden (Ammendola et al, 2001). Die Rolle von IRAG bei der Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration und den damit verbundenen Signalkaskaden *in vivo* kann mit oben genannten Mauslinien näher analysiert werden.

Bei der Einführung der genetischen Modifikation in das *IRAG* Gen von ES Zellen wurden zwei konkrete Ziele verfolgt. Das *IRAG* Gen sollte konventionell deletiert werden und gleichzeitig der miteingeführte Selektionsmarker entfernt werden. Weiter sollte ein

konditionaler Knockout des *IRAG* Gens vorbereitet werden. Hier wurde mit Hilfe der Cre-Rekombinase nur der Selektionsmarker deletiert, das Exon 3 bleibt „gefloxt“ im Genom. Aus der Injektion und Reimplantation der ES Zellklone gingen chimäre Mäuse beider Strategien hervor. Diese Tiere stellen die Grundvoraussetzung für die zu etablierenden Mauslinien dar. Sollten sich nur die Chimären aus den +/L2 ES Zellklonen als keimbahngängig erweisen, kann über ein Einkreuzen der „gefloxten“ Mäuse mit einer sog. „Cre-deleter“ Maus das *IRAG* Gen nachträglich *in vivo* modifiziert werden. Die Deletion kann so bereits in der Keimbahn und damit in allen Geweben und Zellen der Tiere erzeugt werden.

Durch Verpaarung der konditionalen, „gefloxten“ Maus mit einer Maus, die aufgrund eines gewebespezifischen Promotors die Cre Rekombinase nur in einem ganz bestimmten Gewebe exprimiert, lässt sich eine gewebespezifische oder somatische Deletion von *IRAG* erzeugen. Eine zusätzliche Weiterentwicklung des Rekombinationssystems lässt nicht nur eine gewebespezifische, sondern auch eine Liganden-gesteuerte und somit zeitlich kontrollierbare Modifikation des Zielgens zu (Danielian, 1998; Metzger und Feil, 1999; Kühbandner et al, 2000b). Die hierbei verwendete gewebespezifisch exprimierte Cre Rekombinase ist ein chimäres Enzym, welches erst nach Bindung eines synthetischen Liganden, wie z.B. Tamoxifen, selektiv aktiviert wird und somit erst dann die Rekombination erfolgt (Kühbandner et al, 2000).

Insbesondere aus der konditionalen Mauslinie eröffnen sich daher weitreichende Möglichkeiten, die physiologische Rolle von *IRAG* sowohl organspezifisch, also auch auf zellulärer Ebene noch gezielter zu untersuchen.

E. Zusammenfassung

Die NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade spielt in vielen physiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle, wie z.B. bei der Regulation des glatten Muskeltonus oder der Thrombozytenaktivität. Die cGKI beeinflusst durch die Modulation der zytosolischen Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ die Kontraktilität des glatten Muskels. IRAG, ein Substratprotein der cGKI, liegt zusammen mit der cGKI β und dem IP₃RI als trimerer Komplex am ER glatter Muskelzellen vor. Inwieweit IRAG an der Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration der glatten Muskulatur beteiligt ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Die Beteiligung von IRAG an der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade konnte anhand von Messungen der Veränderungen in der $[Ca^{2+}]_i$ sowohl *ex vivo* im System der COS-7 Zellen, als auch *in vivo* in glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden. Dazu wurde die Kalziumregulation in VSMC von Wildtyp Mäusen mit denen von IRAG ^{$\Delta 12/\Delta 12$} Mäusen verglichen. In den IRAG ^{$\Delta 12/\Delta 12$} Mäusen wurde das Exon 12 des *IRAG* Gens deletiert, welches für den N-terminalen Bereich der Coiled-coil Domäne codiert. Dadurch wurde die Interaktionsstelle von IRAG mit dem IP₃RI zerstört. Im Gegensatz zu VSMC von Wildtyp Mäusen werden Hormon-induzierte Kalziumtransienten von IRAG ^{$\Delta 12/\Delta 12$} VSMC durch cGMP nicht reduziert. Die IRAG Mutation führte jedoch nicht zu einer Veränderung in der cGMP-vermittelten Verminderung Depolarisations-induzierter Kalziumsignale.

Die unterschiedlichen Effekte von IRAG auf die cGMP-vermittelte Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ weisen darauf hin, dass die cGKI β /IRAG Signalübertragung spezifisch die Hormon-induzierte, intrazelluläre Kalziumfreisetzung beeinflusst. Interessanter Weise werden durch die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase die Kalziumtransienten in VSMC nicht beeinflusst.

Diese Ergebnisse zeigen, dass IRAG entscheidend an der Regulation des intrazellulären Kalziums durch die NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade beteiligt ist. Das lässt vermuten, dass die cGKI/IRAG-Signalübertragung an der Regulation des glatten Muskeltonus beteiligt sein könnte.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Grundlagen für eine konventionelle und konditionale Inaktivierung des *IRAG* Gens in der Maus zu schaffen. Mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems wurde das *IRAG* Gen genetisch modifiziert. Über eine homologe Rekombination in ES Zellen wurde das Exon 3 mit zwei *loxP* Seiten flankiert. Dieses Exon kodiert für einen Bereich N-terminal zu der Interaktionsstelle von IRAG mit der cGKI. Der so veränderte („gefloxte“) Genort bildet die Voraussetzung zur Erzeugung von Mauslinien mit konventionell (+/L1) oder konditional (+/L2) deletierten IRAG Proteinen.

Mit Hilfe einer Cre-vermittelten Rekombination in den ES Zellen konnten ES Zellklone beider Genotypen generiert werden. Aus diesen +/L1 und +/L2 Klonen gingen nach erfolgreicher Injektion in Blastozysten und Reimplantation in Ammenmäuse chimäre Tiere hervor. Die Keimbahngängigkeit dieser Mäuse wird derzeit getestet.

Nach der Etablierung dieser Mauslinien werden diese einen wichtigen Beitrag leisten, die physiologische Rolle von IRAG, insbesondere dessen Bedeutung bei der cGKI β -vermittelten Signalübertragung, weiter analysieren zu können.

F. Anhang

F.1. Verwendete Oligonukleotide

Alle Primer der folgenden Tabelle wurden von der Firma MWG Biotech bezogen. Die Arbeitslösungen der PCR-Primer waren auf 25 pmol/μl, die der Sequenzierprimer auf 0,8 pmol/μl eingestellt. „f“ steht für „forward“ und „r“ für „reverse“. Synthetische Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und „fett“ angegeben.

Tabelle F-1: Verwendete Oligonukleotide (Primer)

Primer	Sequenz in 5' - 3' Richtung	Bemerkung
KS3f	GTC TGA ACT CTA GCT TGT TTC	3'-Sonde
KS4r	GCT GCA CTT GTA TCT GGA AGT	3'-Sonde
KS17f	GTA GAT CCA TAG AGA TGG GT	5'-Sonde; LR-PCR
KS20r	AAG CAT AAA AAT TCG GAG CT	5'-Sonde
KS21f	<u>GAT ATC</u> <u>GCG GCC GCC</u> AAG AGT CAC ACG TGA GCA A	5'-Arm
KS22r	<u>GAT ATC</u> <u>CGG CCG</u> CAT ACA TGG GGG GTC TGG TA	5'-Arm
KS23f	<u>GAT ATC</u> <u>AGA TCT</u> TTT GGT AAG GCT CCC ACA AG	mittleres Fragment
KS24r	<u>GAT ATC</u> AGA TCT TTC ATG AAG GCC AT	mittleres Fragment
KS25f	<u>GAT ATC</u> <u>ATC GAT</u> TAG GAA GCC AAG GTA AGA AG	3'-Arm
KS26r	<u>GAT ATC</u> <u>GGT ACC</u> GAG AAG ACT CAG ACC TTA AC	3'-Arm
KS32r	CCC AGG TTC ATG TTT CTG CA	IRAG Intron E1/2
KS33f	ATG TCC CCA ACT CAG CCC AG	IRAG Intron E1/2
KS34f	AAG GAG CTC CGT GTT TTG CA	IRAG Intron E2/3; PCR-Strategie
KS35f	GTC CAT CTC TGA GTA GTA TT	IRAG Intron E2/3
KS36bf	CTT TAT AAG GAG GTT GGG AAA TG	IRAG Intron E3/4; PCR-Strategie
KS37f	CGT GAA AAT GAA GAG CTA CTT	IRAG Intron E3/4
KS38f	TTG CAT AAT CTC GCA TGA CA	IRAG Intron E4/5
KS40f	ACA AGC AGG GCA CTA GGC AG	IRAG Intron E5/6
KS41f	CAG GAC CTG GAT GTG AGT AG	IRAG Intron E7/8
KS42r	CAC TAC GCC ATT CTG CTG CC	IRAG Intron E2/3; PCR-Strategie
KS43br	GTG AAA CTC AAA TAC CAC TTC CT	IRAG Intron E3/4; PCR-Strategie
KS44r	CTT GCA CTC AGG AAG AAG AA	IRAG Intron E4/5
KS45f	CAA GGC AGT CTC GGT TCC CA	IRAG Intron E4/5
KS46r	CAC CTA AGT CCT ATC CTC GCT	IRAG Intron E5/6
neo1r	GGA CGT AAA CTC CTC TTC AGA C	Neomycin- resistenzgen
tk1f	GCG GTC GAC TAG AGC TTG CGG A	Thymidinkinasegen

F.2. Restriktionsenzyme

Alle in der folgenden Tabelle aufgeführten Restriktionsenzyme wurden von der Firma MWG Biotech bezogen. Die optimale Inkubationstemperatur betrug für alle Enzyme 37°C.

Tabelle F-2: Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Puffer
<i>Acc65I</i>	5`-G/GTACC-3`	3
<i>BamHI</i>	5`-G/GATCC-3`	2
<i>BglII</i>	5`-A/GATCT-3`	3
<i>Clal</i>	5`-AT/CGAT-3`	4
<i>EagI</i>	5`-C/GGCCG-3`	3
<i>EcoRI</i>	5`-G/AATTC-3`	1 – 4
<i>EcoRV</i>	5`-GAT/ATC-3`	3
<i>HindIII</i>	5`-A/AGCTT-3`	2
<i>NotI</i>	5`-GC/GGCCGC-3`	3
<i>PstI</i>	5`-CTGCA/G-3`	3
<i>XbaI</i>	5`-T/CTAGA-3`	2

G. Literaturverzeichnis

G.1. Zitierte Veröffentlichungen

- Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P. & Toro, L. (1998). The large conductance, voltage-dependent and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem*, **273**, 32950-6.
- Ammendola, A., Geiselhöringer, A., Hofmann, F. & Schlossmann, J. (2001). Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J Biol Chem*, **276**, 24153-9.
- Bachmann, B.J. & Low, K.B. (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, 8th ed. *Microbiol Rev*, **54**, 130-197.
- Berridge, M.J. (1993). Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-325.
- Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 11-21.
- Biel, M., Sautter, A., Ludwig, A., Hofmann, F. & Zong, X. (1998). Cyclic nucleotide-gated channels-mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **358**, 140-4.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res*, **7**, 1513-23.
- Bonnevier, J. & Arner, A. (2004). Actions Downstream of Cyclic GMP/Protein Kinase G Can Reverse Protein Kinase C-mediated Phosphorylation of CPI-17 and Ca²⁺ Sensitization in Smooth Muscle. *J Biol Chem*, **279**, 28998-29003.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., Ciccolini, F. & Lipp, P. (2001). Calcium signalling-an overview. *Cell & Develop Biol*, **12**, 3-10
- Brozovich, F.V. (2003). Rho Signaling. Agonist Stimulation and Depolarization Come Together. *Circ Res*, **93**, 481-483.
- Capecchi, M.R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244**, 1288-92.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, **7**, 2745-52.
- Danielian, P.S., Muccino, D., Rowitch, D.H., Michael, S.K., & McMahon, A.P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol*, **8**, 1323-6.

- Feil, R., Gappa, G., Rutz, M., Schlossmann, J., Rose, C.R., Konnerth, A., Brummer, S., Kühbandner, S., & Hofmann, F. (2002). Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms. *Circ Res*, **90**, 1080-6.
- Feil, R., Lohmann, S.M., de Jonge, H., Walter, U. & Hofmann, F. (2003). Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res*, **93**, 907-916.
- Friebe, A. & Koesling, D. (2003). Regulation of nitric oxid-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res*, **93**, 96-105.
- Fritsch, R.M., Saur, D., Kurjak, M., Oesterle, D., Schlossmann, J., Geiselhöriner, A., Hofmann, F. & Allescher, H.-D. (2004). InsP₃R-associated cGMP Kinase Substrate (IRAG) Is Essential for Nitric Oxide-induced Inhibition of Calcium Signaling in Human Colonic Smooth Muscle. *J Biol Chem*, **279**, 12551-59.
- Fukao, M., Mason, H.S., Britton, F.C., Kenyon, J.L., Horowitz, B. & Keef, K.D. (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BK_{Ca} channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem*, **274**, 10927-35.
- Geiselhöringer, A., Gaisa, M., Hofmann, F. & Schlossmann, J. (2004a). Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Letter in press online August 16*.
- Geiselhöriner, A., Werner, M., Sigl, K., Smital, P., Wörner, R., Acheo, L., Stieber, J., Weinmeister, P., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F. & Schlossmann, J. (2004b). IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP Kinase. *EMBO in press*.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985). A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.
- Gu, H., Zou, Y.R. & Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell*, **73**, 1155-64.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-80.
- Hattori, M., Suzuki, A.Z., Higo, T., Miyauchi, H., Michikawa, T., Nakamura, T., Inoue, T. & Mikoshiba, K. (2004). Distinct Roles of Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor Types 1 and 3 in Ca²⁺ Signalling. *J Biol Chem*, **279**, 11967-75.
- Hepler, J.R. (1999). Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 376-382.
- Hofmann, F., Ammendola, A. & Schlossmann, J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, **113**, 1671-6.
- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F. & Lacy, E. (1994). Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual (second edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

- Horstrup, K., Jablonka, B., Honig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K. & Walter, U. (1994). Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem*, **225**, 21-7.
- Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y. & Mori, Y. (2001). The Transient Receptor Potential Protein Homologue TRP6 Is the Essential Component of Vascular α_1 -Adrenoceptor-Activated Ca^{2+} -Permeable Cation Channel. *Circ Res.*, **88**, 325-332.
- Jaenisch, R. (1988). Transgenic animals. *Science*, **240**, 1468-74.
- Keilbach, A., Ruth, P. & Hofmann, F. (1992). Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem*, **208**, 467-73.
- Kitazawa, T., Polzin, A.N. & Eto, M. (2004). CPI-17-deficient smooth muscle of chicken. *J Physiol*, **557**, 515-528.
- Koller, A., Schlossmann, J., Ashman, K., Uttenweiler-Joseph, S., Ruth, P. & Hofmann, F. (2003). Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex. *Biochem Biophys Res Commun*, **300**, 155-160.
- Kühbandner, S. (2001). Induzierbare Cre-vermittelte Rekombination im glatten Muskel der Maus. Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München.
- Kühbänder, S., Brummer, S., Metzger, D., Chambon, P., Hofmann F., & Feil, R. (2000). Temporally Controlled Somatic Mutagenesis in Smooth Muscle. *Genesis*, **28**, 15-22.
- Kühbänder, S., Brummer, S., Hofmann F., & Feil, R. (2000b). Conditional gene targeting in smooth muscle of mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol*, **361**.
- Kuhn, M. (2003). Structure, regulation and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res*, **93**, 700-9.
- Kwan, H.-Y., Huang, Y. & Yoa, X. (2004). Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *PNAS*, **101**, 2625-30.
- Lalli, M.J., Shimizu, S., Sutliff, R.L., Kranias, E.G. & Paul, R.J. (1999). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice. *Am J Physiol*, **277**, H963-70.
- Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U. & De Jonge, H.R. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci*, **22**, 307-312.
- Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci*, **22**, 375-82.
- Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F. & Hofmann, F. (1999). Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med*, **189**, 1255-64.

- Matsumoto, T., Kobayashi, T. & Kamata, K. (2003). Phosphodiesterases in the Vascular System. *J Smooth Muscle Res*, **39**, 67-86.
- Meredith, A.L., Thorneloe, K.S., Werner, M.E., Nelson, M.T. & Aldrich, R.W. (2004). Overactive Bladder and Incontinence in the Absence of the BK Large Conductance Ca^{2+} -activated K^{+} Channel. *J Biol Chem*, **279**, 36746-52.
- Metzger, D. & Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol*, **10**, 470-6.
- Montell, C., Birnbaumer, L. & Flockerzi, V. (2002). The TRP channels, a remarkable functional family. *Cell*, **108**, 595-598.
- Moore, E.D.W., Becker, P.L., Fogarty, K.E., Williams, D.A. & Fay, F.S. (1990). Ca^{2+} imaging in single living cells: Theoretical and practical issues. *Cell Calcium*, **11**, 157-179.
- Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J.W., Hofmann, F. & Klugbauer, N. (2003). Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel $\text{Ca}_v1.2$ for blood pressure regulation. *EMBO J*, **22**, 6027-34.
- Münzel, T., Feil, R., Mülsch, A., Lohmann, S., Hofmann, F. & Walter, U. (2003). Physiology and Pathophysiology of Vascular Signaling Controlled by Cyclic Guanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Circulation*, **108**, 2172-83.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. & Roder, J.C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8424-8.
- Nilius, B. & Droogmans, G. (2001). Ion Channels and their role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.*, **81**, 1415-59.
- Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F. & Fassler, R. (1996). Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*, **274**, 2082-6.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G.X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K.E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R. & Hofmann, F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J*, **17**, 3045-51.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. & Hofmann, F. (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **135**, 105-49.
- Pfister, G. (2001). Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol*, **91**, 497-503.
- Plant, T.D. & Schaefer, M. (2003). TRPC4 and TRPC5: receptor-operated Ca^{2+} -permeable nonselective cation channels. *Cell Calcium*, **33**, 441-450.

- Raeymaekers, L., Hofmann, F. & Casteels, R. (1988). Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates Phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J*, **252**, 269-73.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U.A., Muller, W., Roes, J. & Schwenk, F. (1996). Conditional gene targeting. *J Clin Invest*, **98**, 600-3.
- Regoli, D., Geppetti, P., Hess, J.F., Marceau, F., Muller-Esterl, W. & Schoelkens, B.A. (1998). Bradykinin Receptors. *The IUPHAR Receptor Compendium*, 88-93.
- Ruiz-Velasco, V., Zhong, J., Hume, J.R. & Keef, K.D. (1998). Modulation of Ca²⁺ channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res*, **82**, 557-565.
- Ruth, P. (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. *Pharmacol Ther*, **82**, 355-72.
- Ruth, P., Wang, G.X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H. & Hofmann, F. (1993). Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2623-7.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Sakurada, S., Takuwa, N., Sugimoto, N., Wang, Y., Seto, M., Sasaki, Y. & Takuwa, Y. (2003). Ca²⁺-Dependent Activation of Rho and Rho Kinase in Membrane Depolarization-Induced and Receptor Stimulation-Induced Vascular Smooth Muscle Contraction. *Circ Res*, **93**, 548-556.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Saucerman, J.J. & McCulloch, A.D. (2004). Mechanistic systems models of cell signalling networks: a case study of myocyte adrenergic regulation. *Prog Biophys mol Biol*, **85**, 261-278.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*, **14**, 381-92.
- Sausbier, M., Schubert, R., Voigt, V., Hirneiss, C., Pfeifer, A., Korth, M., Kleppisch, T., Ruth, P. & Hofmann, F. (2000). Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res*, **87**, 825-30.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.X., Allescher, H.D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. & Ruth, P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase I β . *Nature*, **404**, 197-201.

- Somlyo, A.P. & Somlyo, A.V. (2000). Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein Phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, **522**, 177-185.
- Somlyo, A.P. & Somlyo, A.V. (2003). Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev*, **83**, 1325-58.
- Sonnenburg, W.K. & Beavo, J.A. (1994). Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol*, **26**, 87-114.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-17.
- Strachan, T. & Read, A.P. (1996). Molekulare Humangenetik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Tada, M. (2003). Calcium Cycling Proteins of the Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *Circ J*, **67**, 729-737.
- Tang, M., Wang, G., Lu, P., Karas, R.H., Aronovitz, M., Heximer, S.P., Kaltenbronn, K.M., Blumer, K.J., Siderovski, D.P., Zhu, Y. & Mendelshon, M.E. (2003). Regulator of G-protein signalling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med*, **9**, 1506-12.
- Tiruppathi, C., Minshall, R.D., Piria, B.C., Vogel, S.M. & Malik, A.B. (2003). Role of Ca²⁺ signalling in the regulation of endothelial permeability. *Vascular Pharmacology*, **39**, 173-185.
- Torres, R.M. & Kühn, R. (1997). Laboratory protocols for conditional gene targeting. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Tsien, J.Z., Chen, D.F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E.H., Anderson, D.J., Mayford, M., Kandel, E.R. & Tonegawa, S. (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knock-out in mouse brain. *Cell*, **87**, 1317-26.
- Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Tilly, B.C., Houtsmuller, A.B., Ehlert, E.M., Bot, A.G., Edixhoven, M., Boomaars, W.E., Lohmann, S.M. & de Jonge, H.R. (1998). Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CF channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1466-71.
- Webb, R.C. (2003). Smooth Muscle Contraction and Relaxation. *Adv Physiol Educ*, **27**, 201-206.
- Wegener, J.W., Schulla, V., Lee, T.-S., Koller, A., Feil, S., Feil, R., Kleppisch, T., Klugbauer, N., Moosmang, S., Welling, A. & Hofmann, F. (2004). An essential role of Ca_v1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function. *FASEB J*, **18**, 1159-61.

- Wooldridge, A.A., MacDonald, J.A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M.A., Hatshorne, D.J. & Haystead, T.A.J. (2004). Smooth Muscle Phosphatase Is Regulated in Vivo by Exclusion of Phosphorylation of Threonine 696 of MYPT1 by Phosphorylation of Serine 695 in Response to Cyclic Nucleotides. *J Biol Chem*, **279**, 34496-504.
- Xia, C., Bao, Z., Sanborn, B.M. & Liu, M. (2001). Phosphorylation and regulation of G-protein-activated Phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, **276**, 19770-77.
- Zhou, X.-B., Arntz, C., Kamm, S., Motejlek, K., Sausbier, U., Wang, G.-X., Ruth, P. & Korth, M. (2001). A Molecular Switch for Specific Stimulation of BK_{Ca} Channel by cGMP and cAMP Kinase. *J Biol Chem*, **276**, 43239-45.

G.2. Eigene Veröffentlichungen

- Geiselhöriner, A., Werner, M., Sigl, K., Smital, P., Wörner, R., Acheo, L., Stieber, J., Weinmeister, P., Feil, R., Feil, S., Wegener, J., Hofmann, F. & Schlossmann, J. (2004). IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP Kinase. *EMBO in press*.
- Steidle, A., Sigl, K., Schuegger, R., Ihring, A., Schmid, M., Gantner, S., Riedel, K., Givskov, M., Hartmann, A., Langebartels, C. & Eberl, L. (2001). Visualization of N-acylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 5761-70.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlichst bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann gilt mein besonderer Dank für die Aufnahme an seinem Institut, für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die zahlreichen theoretischen wie praktischen Hilfestellungen bei der Lösung kleinerer und größerer Probleme.

PD. Dr. Jens Schlossmann für die Betreuung dieser Arbeit, seine fachliche Unterstützung und sein Engagement.

Herrn Prof. Dr. Walter Staudenbauer bedanke ich mich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit.

Allen meinen Kollegen vom Keller bis zum dritten Stock für das wirklich tolle Arbeitsklima an unserem Institut, den regen Austausch von Erfahrungen auch mit den Mitgliedern anderer Arbeitsgruppen und für die vielen Feiern, die mir den Laboralltag so sehr versüßt haben.

Meinen Mädels: Angela, Geli und Silke für ihre Hilfe in allen Lebenslagen, vor allem aber eine Dankeschön an die Meli, die so tapfer die letzten 9 Jahre mit mir durchgestanden hat.

Meiner Familie für ihre Geduld, Unterstützung und den guten Zuspruch in jeder Phase meines Studiums und meiner Doktorarbeit, Mama und Papa, was wäre ich ohne euch!

Und zu guter Letzt gilt mein ganz besonderer Dank meinem Freund Thomas Burkert für sein Verständnis und den Rückhalt in den vergangenen Jahren, Wochen und Tagen, für das viele Mutmachen, die Durchhalteparolen und das Korrekturlesen bis spät in die Nacht! Jetzt ist es endlich geschafft.

- Danke -