

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Humanbiologie

Analyse der Regulation von Kalziumkanälen über den  
 $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKII-Signalweg durch konditionale  
Mutagenese im Mausmodell

Stefanie Fischer

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. M. Klingenspor

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

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

Die Dissertation wurde am 13.11.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.03.2009 angenommen.

*Der Mensch hat dreierlei Wege klug zu handeln:*

*Erstens durch Nachdenken,*

*das ist der edelste;*

*zweitens durch Nachahmen,*

*das ist der leichteste;*

*und drittens durch Erfahrung,*

*das ist der bitterste.*

KONFUZIUS

*Meinen Eltern*

*Inhaltsverzeichnis*..... I  
*Abbildungsverzeichnis*..... V  
*Tabellenverzeichnis*..... VI  
*Abkürzungsverzeichnis*..... VII

## Inhaltsverzeichnis

**1 EINLEITUNG ..... 1**

**1.1 SPANNUNGSABHÄNGIGE KALZIUMKANÄLE ..... 1**

    1.1.1 *L-Typ Kalziumkanäle*..... 2

    1.1.2 *Der Ca<sub>v</sub>1.2-Kanal und seine Bedeutung im Herzen*..... 5

    1.1.3 *Autoregulation von L-Typ Kalziumkanälen*..... 6

        1.1.3.1 *Inaktivierung*..... 6

        1.1.3.2 *Fazilitierung* ..... 7

**1.2 DIE CAM KINASE II ..... 8**

**1.3 TRANSGENE TIERMODELLE ..... 10**

**1.4 GEN TARGETING ..... 11**

**2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG ..... 13**

**3 MATERIAL ..... 14**

**3.1 CHEMIKALIEN ..... 14**

**3.2 ENZYME ..... 15**

**3.3 OLIGONUKLEOTIDE ..... 16**

**3.4 ANTIKÖRPER ..... 18**

**3.5 GERÄTE ..... 18**

**3.6 VERBRAUCHSMATERIAL ..... 19**

**4 METHODEN ..... 20**

**4.1 BAKTERIENKULTUR ..... 20**

    4.1.1 *Verwendeter Bakterienstamm* ..... 20

    4.1.2 *Medien* ..... 20

    4.1.3 *Kultivierung* ..... 21

    4.1.4 *Langzeitlagerung*..... 21

    4.1.5 *Herstellung kompetenter Bakterienzellen*..... 21

**4.2 PLASMIDE ..... 22**

    4.2.1 *Ausgangsplasmide* ..... 22

    4.2.2 *Im Rahmen der Arbeit hergestellte Vektoren*..... 23

**4.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN ..... 24**

    4.3.1 *Isolierung von Nukleinsäuren* ..... 24

4.3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNS.....	24
4.3.1.2	Isolierung von genomischer DNS.....	25
4.3.1.3	Isolierung von mRNA aus Mausgewebe.....	26
4.3.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren</i> .....	27
4.3.3	<i>Enzymatische Modifikation von Nucleinsäuren</i> .....	27
4.3.3.1	Restriktionsverdau.....	27
4.3.3.2	Dephosphorylierung von DNS .....	28
4.3.3.3	Ligation von DNS-Fragmenten.....	29
4.3.4	<i>Reinigung von Nucleinsäuren</i> .....	29
4.3.4.1	Alkoholfällung.....	29
4.3.4.2	Phenol-Chloroform Extraktion.....	30
4.3.5	<i>Transformation von Bakterien</i> .....	31
4.3.6	<i>Agarosegelelektrophorese</i> .....	32
4.3.7	<i>Elektroelution</i> .....	33
4.3.8	<i>Sequenzierung von DNS</i> .....	34
4.3.9	<i>Amplifizierung von DNS mittels Polymerasekettenreaktion</i> .....	36
4.3.9.1	Verwendete Polymerasen .....	36
4.3.9.2	Verwendete Primer .....	38
4.3.9.3	PCR-Anwendungen.....	38
4.3.10	<i>Analyse von DNS durch Southern-Blot</i> .....	40
4.3.10.1	Verwendete Lösungen.....	41
4.3.10.2	Gellauf .....	42
4.3.10.3	Blotting .....	42
4.3.10.4	Southern-Hybridisierung .....	42
<b>4.4</b>	<b>METHODEN ZUR ERZEUGUNG GENETISCH VERÄNDERTER MÄUSE</b> .....	<b>45</b>
4.4.1	<i>Kultivierung embryonaler Stammzellen</i> .....	45
4.4.1.1	Nährmedien und Substanzen .....	46
4.4.1.2	Gefäße für die Zellkultur.....	46
4.4.1.3	Allgemeine Vorgehensweise bei der ES-Zellkultur .....	47
4.4.2	<i>Feederzellen</i> .....	48
4.4.2.1	Gewinnung von Feederzellen .....	48
4.4.2.2	Ernten, Bestrahlen und Einfrieren der Feederzellen .....	48
4.4.2.3	Aussäen von Feederzellen .....	49
4.4.3	<i>Embryonale Stammzellen</i> .....	49
4.4.3.1	Gewinnung Embryonaler Stammzellen .....	49
4.4.3.2	Auftauen und Aussäen Embryonaler Stammzellen .....	49
4.4.3.3	Expandieren in die nächst höhere Zellpassage.....	49
4.4.3.4	Primäres Zell-Targeting.....	50
4.4.3.5	Screening nach dem primären Zell-Targeting.....	52
4.4.3.6	Sekundäres Zell-Targeting .....	52
4.4.4	<i>Blastozysteninjektion</i> .....	53
4.4.5	<i>Testen der Chimären auf Keimbahngängigkeit und Etablierung von knock-in-Mauslinien</i> .....	55

<b>4.5</b>	<b>ANALYSE VON GENETISCH VERÄNDERTEN MÄUSEN .....</b>	<b>56</b>
4.5.1	<i>Genotypisierung durch PCR.....</i>	56
4.5.2	<i>Genotypisierung durch Southern-Blot .....</i>	56
4.5.3	<i>Sequenzanalyse der knock-in-Mäuse .....</i>	56
<b>4.6</b>	<b>BIOCHEMISCHE METHODEN .....</b>	<b>57</b>
4.6.1	<i>Proteingewinnung aus verschiedenen Geweben.....</i>	57
4.6.2	<i>Quantitative Proteinbestimmung.....</i>	57
4.6.3	<i>Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE .....</i>	57
4.6.4	<i>Western-Blot-Analyse.....</i>	59
4.6.5	<i>Membranpräparation .....</i>	60
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>GENERIERUNG UND UNTERSUCHUNG DER <math>Ca_v1.2^{SF}</math>-MAUSLINIE .....</b>	<b>62</b>
5.1.1	<i>Gen-Targeting-Strategie.....</i>	62
5.1.2	<i>Konstruktion des Gen-Targeting-Vektors .....</i>	63
5.1.2.1	<i>Klonierung des kurzen Armes (5'-Arm).....</i>	63
5.1.2.2	<i>Klonierung des langen Armes (3'-Arm).....</i>	64
5.1.2.3	<i>Umklonierung und Fertigstellung des finalen Gen-Targeting-Vektors .....</i>	68
5.1.2.4	<i>Überprüfung des finalen Gen-Targeting-Vektors .....</i>	69
5.1.3	<i>Primäres Zell-Targeting (Erstes Targeting).....</i>	72
5.1.3.1	<i>Nachweis der Homologen Rekombination .....</i>	73
5.1.3.2	<i>Sequenzanalyse der positiven ES-Zell-Klone .....</i>	76
5.1.4	<i>Sekundäres Targeting (Zweites Targeting).....</i>	78
5.1.4.1	<i>Screening.....</i>	78
5.1.5	<i>Blastozysteninjektion .....</i>	80
5.1.6	<i>Untersuchung der <math>Ca_v1.2^{SF}</math>-Mäuse .....</i>	81
5.1.6.1	<i>Genotypisierung .....</i>	81
5.1.6.2	<i>Nachweis der beiden Mutationen .....</i>	83
5.1.6.3	<i>Primäre Grundcharakterisierung.....</i>	84
5.1.6.4	<i>Geburtsstatistik .....</i>	85
5.1.6.5	<i>Expressionsanalyse.....</i>	86
5.1.6.6	<i>Untersuchungen am Herzen.....</i>	87
<b>5.2</b>	<b>GENERIERUNG UND UNTERSUCHUNG DER <math>Ca_v1.2^{EQ}</math>-MAUSLINIE .....</b>	<b>90</b>
5.2.1	<i>Der Gen-Targeting-Vektor.....</i>	90
5.2.2	<i>Primäres Zell-Targeting (Erstes Targeting).....</i>	93
5.2.2.1	<i>Nachweis der homologen Rekombination .....</i>	94
5.2.2.2	<i>Sequenzanalyse der positiven ES-Zell-Klone .....</i>	97
5.2.3	<i>Sekundäres Targeting.....</i>	98
5.2.3.1	<i>Screening.....</i>	98
5.2.4	<i>Blastozysteninjektion .....</i>	100
5.2.5	<i>Untersuchung der <math>Ca_v1.2^{EQ}</math>-Mäuse.....</i>	101

---

5.2.5.1	Genotypisierung .....	101
5.2.5.2	Nachweis der Mutation .....	103
5.2.5.3	Primäre Grundcharakterisierung .....	103
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>104</b>
<b>6.1</b>	<b>GENERIERUNG DER MAUSLINIEN .....</b>	<b>105</b>
6.1.1	Anzucht der $Ca_v1.2^{SF}$ -Mauslinie und Analyse.....	106
6.1.2	Anzucht der $Ca_v1.2^{EQ}$ -Mauslinie und Analyse.....	107
<b>6.2</b>	<b>AUTOREGULATION DER L-TYP KALZIUMKANÄLE .....</b>	<b>108</b>
6.2.1	Inaktivierung .....	108
6.2.2	Fazilitierung.....	110
<b>6.3</b>	<b>PATHOPHYSIOLOGIE IN VERBINDUNG MIT DEM L-TYP KALZIUMKANAL .....</b>	<b>112</b>
6.3.1	Timothy-Syndrom .....	112
6.3.2	Neurotoxische Effekte von Ciclosporin .....	113
6.3.3	Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie .....	114
<b>6.4</b>	<b>BESONDERE BEDEUTUNG DER FORSCHUNG AN L-TYP KALZIUMKANÄLEN.....</b>	<b>118</b>
<b>6.5</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>121</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>123</b>
<b>ANHANG</b>		
<b>DANKSAGUNG</b>		

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1-1	AUFBAU EINES L-TYP KALZIUMKANALS. ....	3
ABBILDUNG 1-2	STRUKTUR DER ALPHA <sub>1</sub> -UNTEREINHEIT EINES CA <sub>v</sub> 1.2-KANALS .....	4
ABBILDUNG 1-3	MECHANISMUS DER ELEKTROMECHANISCHEN KOPPLUNG .....	5
ABBILDUNG 1-4	KALZIUM- UND SPANNUNGSABHÄNGIGE INAKTIVIERUNG VON CA <sub>v</sub> 1.2 IN HERZMUSKELZELLEN.....	7
ABBILDUNG 1-5	MECHANISMEN DER AUTOREGULATION VON L-TYP KALZIUMKANÄLEN .....	8
ABBILDUNG 4-1	PLASMIDKARTE VON PBLUESCRIPT II KS .....	23
ABBILDUNG 4-2	SKIZZE DES PBLUESCRIPT-VEKTORS MIT SELEKTIONSKASSETTE.....	23
ABBILDUNG 4-3	BANDENMUSTER DES VERWENDETEN STANDARD-MARKERS BEI AGAROSE-GELEN .....	33
ABBILDUNG 4-4	AUFBAU DES BLOTTES WÄHREND DES SOUTHERN-BLOTTINGS. ....	42
ABBILDUNG 4-5	DIE WICHTIGEN SCHRITTE WÄHREND DER ES-ZELLKULTUR IM ÜBERBLICK.....	47
ABBILDUNG 4-6	SCHEMA ÜBER DEN ABLAUF DER BLASTOZYSTENINJEKTION .....	54
ABBILDUNG 4-7	BANDENMUSTER DES VERWENDETEN STANDARD-MARKERS BEI PAA-GELEN .....	59
ABBILDUNG 5-1	STRATEGIE ZUR HERSTELLUNG DES 5'-ARMES.....	64
ABBILDUNG 5-2	STRATEGIE ZUR HERSTELLUNG DES (CLA-XHO)-TEILES DES 3'-ARMES .....	66
ABBILDUNG 5-3	STRATEGIE ZUR HERSTELLUNG DES (XHO-KPN)-TEILES DES 3'-ARMES .....	67
ABBILDUNG 5-4	SCHEMATISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER SUBVEKTOREN .....	68
ABBILDUNG 5-5	DER GEN-TARGETING-VEKTOR PBL-LOX-NEOTK-NOT/BAM-S1512/1570A .....	69
ABBILDUNG 5-6	AGAROSE-CHECKGEL ZUR BESTÄTIGUNG DES REKOMBINANTEN PLASMIDS. ....	69
ABBILDUNG 5-7	SEQUENZ DER EXONE 35 BIS 38. ....	71
ABBILDUNG 5-8	FUNKTIONALITÄTSTEST DER LOXP-STELLEN IM GEN-TARGETING-VEKTOR.....	72
ABBILDUNG 5-9	STRATEGIE DES PCR-SCREENINGS .....	73
ABBILDUNG 5-10	ERGEBNIS NACH DEM PCR-SCREENING. ....	74
ABBILDUNG 5-11	STRATEGIE DES SOUTHERN-SCREENINGS.....	75
ABBILDUNG 5-12	ERGEBNIS NACH DEM SOUTHERN-SCREENING. ....	75
ABBILDUNG 5-13	STRATEGIE DES NEO-SOUTHERN-BLOTS .....	76
ABBILDUNG 5-14	ERGEBNIS DES NEO-SOUTHERN-BLOTS.....	76
ABBILDUNG 5-15	STRATEGIE ZUR SEQUENZANALYSE .....	77
ABBILDUNG 5-16	SEQUENZEN DER ALS POSITIV GESCREENTEN KLONE .....	78
ABBILDUNG 5-17	STRATEGIE DES PCR-SCREENINGS NACH DEM ZWEITEN TARGETING .....	79
ABBILDUNG 5-18	ERGEBNIS DER SCREENING-PCR NACH DEM ZWEITEN TARGETING .....	79
ABBILDUNG 5-19	FOTOS DER 9 SF-CHIMÄREN .....	81
ABBILDUNG 5-20	ETABLIERUNG DER SF-MAUSLINIE AUS DEN NACHKOMMEN DER CHIMÄRE *22.07.07 .....	82
ABBILDUNG 5-21	SOUTHERN-BLOT ALS BESTÄTIGUNG DES KNOCK-IN-GENOTYPS .....	82
ABBILDUNG 5-22	NACHWEIS DER BEIDEN MUTATIONEN IN GENOMISCHER DNS.....	83
ABBILDUNG 5-23	NACHWEIS DER BEIDEN MUTATIONEN AUF cDNS-EBENE.....	84
ABBILDUNG 5-24	GEWICHTSSTATISTIK.....	85
ABBILDUNG 5-25	SEMIQUANTITATIVE MRNS-EXPRESSIONSANALYSE.....	86
ABBILDUNG 5-26	MEMBRANPRÄPARATION MIT ANSCHLIEßENDER WESTERNBLOT-ANALYSE .....	87
ABBILDUNG 5-27	VERGLEICH HERZGEWICHT/KÖRPERGEWICHT .....	88
ABBILDUNG 5-28	SEMIQUANTITATIVE MRNS-EXPRESSIONSANALYSE VON ANP UND BNP .....	89
ABBILDUNG 5-29	DARSTELLUNG DES GEN-TARGETING-VEKTORS PBL-LOX-NEOTK-EQ.....	90
ABBILDUNG 5-30	AGAROSE-CHECKGEL ZUR BESTÄTIGUNG DES REKOMBINANTEN PLASMIDS.....	91
ABBILDUNG 5-31	SEQUENZ DER EXONE 40 BIS 44 .....	92
ABBILDUNG 5-32	FUNKTIONALITÄTSTEST DER LOXP-STELLEN IM GEN-TARGETING-VEKTOR.....	93

ABBILDUNG 5-33	STRATEGIE DES PCR-SCREENINGS .....	94
ABBILDUNG 5-34	ERGEBNIS NACH DEM PCR-SCREENING .....	95
ABBILDUNG 5-35	STRATEGIE DES SOUTHERN-SCREENINGS.....	96
ABBILDUNG 5-36	ERGEBNIS NACH DEM SOUTHERN-SCREENING.....	96
ABBILDUNG 5-37	STRATEGIE ZUR SEQUENZANALYSE .....	97
ABBILDUNG 5-38	SEQUENZEN DER ALS POSITIV GESCREENTEN KLONE.....	98
ABBILDUNG 5-39	STRATEGIE DES PCR-SCREENINGS NACH DEM ZWEITEN TARGETING.....	99
ABBILDUNG 5-40	ERGEBNIS DER SCREENING-PCR NACH DEM ZWEITEN TARGETING.....	99
ABBILDUNG 5-41	FOTOS DER VIER EQ-CHIMÄREN .....	101
ABBILDUNG 5-42	ETABLIERUNG DER EQ-MAUSLINIE.....	102
ABBILDUNG 5-43	SOUTHERN-BLOT ALS BESTÄTIGUNG DES KNOCK-IN-GENOTYPS.....	103
ABBILDUNG 5-44	STRATEGIE ZUR SEQUENZANALYSE DER GENOMISCHEN DNS AUS EQ-MÄUSEN .....	103
ABBILDUNG 6-1	EREIGNISSE WÄHREND DER INAKTIVIERUNG VON L-TYP KALZIUMKANÄLEN.....	108
ABBILDUNG 6-2	MECHANISMUS DER CDI .....	110
ABBILDUNG 6-3	MECHANISMUS DER CDF .....	112
ABBILDUNG 6-4	DARSTELLUNG UNTERSCHIEDLICHER THEORIEN ZUR ENTSTEHUNG VON HERZINSUFFIZIENZ .....	115
ABBILDUNG 6-5	MÖGLICHER ZUSAMMENHANG ZWISCHEN HERZINSUFFIZIENZ UND DER CAMKII .....	116
ABBILDUNG 6-6	ZUCHTSTRATEGIE, UM GEWEBSSPEZIFISCHE $Ca_v1.2^{EQ(KI/KI)}$ -MÄUSE ZU ERHALTEN .....	120

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1-1	KLASSIFIZIERUNGSSHEMA DER SPANNUNGSABHÄNGIGEN KALZIUMKANÄLE.....	2
TABELLE 5-1	TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER $Ca_v1.2^{SF}$ -BLASTOZYSTENINJEKTIONEN.....	80
TABELLE 5-2	GEBURTSSTATISTIK DER $Ca_v1.2^{SF}$ -MAUSLINIE .....	85
TABELLE 5-3	TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER $Ca_v1.2^{EQ}$ -BLASTOZYSTENINJEKTIONEN .....	100

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Amp	Ampicillin
APD	Länge des Aktionspotentials (action potential duration)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BTZ	Benzothiazepine
c	Konzentration
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
Ca <sup>2+</sup> /CaM	kalziumgebundenes Calmodulin
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CACNA1C	Gen des Ca <sub>v</sub> 1.2-Kanals
CaM	Calmodulin
CaMKII	kalzium-/calmodulinabhängige Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
Ca <sub>v</sub>	spannungsabhängiger Kalziumkanal
CDF	kalziumabhängige Fazilitierung
CDI	kalziumabhängige Inaktivierung
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestine phosphatase)
d	Tag (day)
DADs	späte Nachdepolarisationen (delayed afterdepolarisations)
DHP	Dihydropyridine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
ddNTP	2',3'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP)
EADs	frühe Nachdepolarisationen (early afterdepolarisations)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF-Zellen	embryonale Fibroblasten, "Feederzellen"
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
F	Farad (Kapazität)
FCS	Fötales Rinderserum (fetal calf serum)
flox	loxP-flankiert
G	Guanin
g	Gramm
G418	Geneticin
h	Stunde (hour)
HVA	bei höherem Potential aktiviert (high voltage activated)
I <sub>Ba</sub>	Bariumeinstrom
I <sub>Ca</sub>	Kalziumeinstrom
IQ	Isoleucin-Glutamin
kb	Kilobasen
KI	knock-in
l	Liter

---

L1, L2	eine oder zwei loxP-Sequenzen
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LVA	bei niedrigem Potential aktiviert (low voltage activated)
loxP	Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
m	Milli ( $10^{-3}$ )
m	Meter
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
min	Minuten
ml	Milliliter
mol	Stoffmenge
mRNS	Messenger-/Boten- Ribonukleinsäure
N	Aminoterminus von Proteinen bzw. Peptiden
N	beliebiges Nukleotid
n	Nano ( $10^{-9}$ )
<i>neo</i>	Neomycin-Resistenzgen
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
p	Plasmid
PAA	Phenylalkylamine
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodinrezeptor
sek	Sekunden
SERCA	Sarko-/Endoplasmatische Retikulum Kalzium-ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSC	Standard Salz-Citrat-Puffer
ssDNS	Einzelstrang DNS (single strand DNA)
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Borat-NaCl-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
<i>tk</i>	Thymidinkinase-Gen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Einheit (unit)
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

Kalzium reguliert als ubiquitär vorkommendes Signaltransduktionsmolekül („second messenger“) in verschiedenen Zelltypen – von Prokaryonten bis zu Eukaryonten – eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferation, Metabolismus und Kommunikation. Physiologische Ereignisse wie die Erregungs-Kontraktionskopplung im Herzmuskel, Skelettmuskel und glatten Muskel sowie die Synthese und Ausschüttung von Neurotransmittern und Hormonen sind ohne Kalziumionen undenkbar. Initiiert werden diese auf Zellebene stattfindenden Prozesse durch einen transienten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ), gefolgt von einem raschen Abfall auf basale Normwerte (Bootman and Berridge, 1995). Dieses reversible, zyklische Geschehen wird durch spannungsabhängige Kalziumkanäle beeinflusst, die Kalziumströme ins Zytosol ermöglichen. Der Öffnungszustand dieser Kanäle wird primär durch Depolarisation der Zellmembran hervorgerufen, wobei an diesem Punkt auch Hormone, Proteinkinasen und –phosphatasen, Toxine und Pharmaka regulatorisch eingreifen (Hofmann *et al.*, 1999; Moosmang *et al.*, 2005). Veränderungen in der Expression und Funktion der Kalziumkanäle führen häufig zu zellulären Fehlfunktionen und somit u.a. zu kardialen Erkrankungen wie Herzinsuffizienz oder Arrhythmien.

## 1.1 Spannungsabhängige Kalziumkanäle

Spannungsabhängige Kalziumkanäle sind multimere Proteinkomplexe, die den kontrollierten Einstrom von Kalziumionen in die Zelle ermöglichen. Sie gehören zur Gruppe der transmembranären Ionenkanäle und werden als die schnellsten Kalzium-Signal-Proteine angesehen. In einer Sekunde können bis zu einer Million Kalzium-Ionen den Kanal passieren und dabei die  $[Ca^{2+}]_i$  um bis zu 20000-fach erhöhen (Clapham, 2007).

Anhand unterschiedlicher elektrophysiologischer Eigenschaften lassen sie sich in zwei Gruppen unterteilen: die HVA und LVA spannungsabhängigen Kalziumkanäle („high voltage activated“ bzw. „low voltage activated“) (Yaari *et al.*, 1987).

Basierend auf biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften erfolgt eine weitere Einteilung in verschiedene Subtypen (siehe Tabelle 1-1).

Zunächst sind hier die L-Typ Kalziumkanäle zu nennen. Sie besitzen eine große Leitfähigkeit (Large conductance), eine lange Öffnungszeit (Long lasting opening) mit Barium als Ladungsträger, sie sind erst bei großer Depolarisation (Large depolarisation) der Zellmembran aktiv und sensitiv gegenüber Dihydropyridinen, Phenylalkylaminen sowie Benzothiazepinen.

Die T-Typ Kalziumkanäle besitzen eine geringere Leitfähigkeit (Tiny), eine flüchtige Öffnung (Transient), sind bei negativeren Membranpotentialen aktiv, jedoch unsensibel gegenüber DHP.

Des Weiteren werden noch N-Typen (weder L- noch (Neither) T-Typ), die sich vorwiegend in Neuronen befinden, und P/Q- und R-Typen unterschieden. Diese Kanäle benötigen ebenfalls starke Depolarisationen, um aktiv zu werden und sind nicht durch die aufgeführten L-Typ Kanal-Antagonisten inhibierbar.

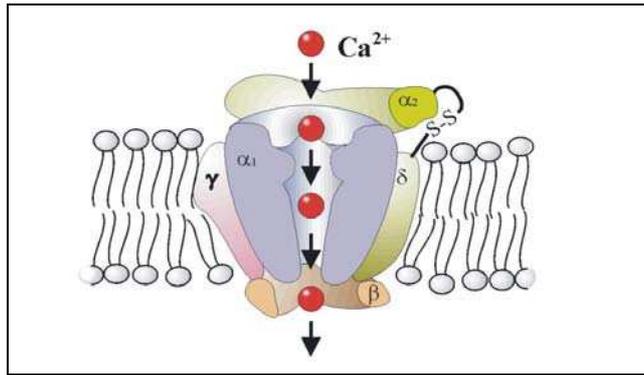
Tabelle 1-1 fasst die verschiedenen Subtypen noch einmal zusammen.

**Tabelle 1-1 Klassifizierungsschema der spannungsabhängigen Kalziumkanäle.** Die beiden Hauptgruppen HVA und LVA können aufgrund von elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften in mehrere Subtypen unterteilt werden.  
DHP (Dihydropyridine), PAA (Phenylalkylamine), BTZ (Benzothiazepine)

Bezeichnungen			Lokalisierung	spez. Antagonisten
LVA	Ca <sub>v</sub> 3.1	T-Typ	Neuronen, Herzmuskelzellen, Glattmuskelzellen	Kurtoxin, Nickel Ni <sup>2+</sup> , (Mibefradil)
	Ca <sub>v</sub> 3.2	T-Typ	Neuronen, Herzmuskelzellen, Glattmuskelzellen	Kurtoxin, Nickel Ni <sup>2+</sup> , (Mibefradil)
	Ca <sub>v</sub> 3.3	T-Typ	Neuronen	Kurtoxin, Nickel Ni <sup>2+</sup> , (Mibefradil)
HVA	Ca <sub>v</sub> 1.1	L-Typ	Skelettmuskelzellen, T-Tubuli	DHP, PAA, BTZ
	Ca <sub>v</sub> 1.2	L-Typ	Herzmuskelzellen, Glattmuskelzellen, endokrine Zellen, Neuronen	DHP, PAA, BTZ
	Ca <sub>v</sub> 1.3	L-Typ	endokrine Zellen, Neuronen, Vorhof-Myozyten, Schrittmacherzellen, Cochleazellen	DHP, PAA, BTZ
	Ca <sub>v</sub> 1.4	L-Typ	Rückenmarkszellen, Retina-Zellen, Mastzellen	D-cis-Diltiazem, (DHP, PAA, BTZ)
	Ca <sub>v</sub> 2.1	P/Q-Typ	Neuronen, neuroendokrine Zellen	ω-Agatoxin IVA
	Ca <sub>v</sub> 2.2	N-Typ	Neuronen, neuroendokrine Zellen	ω-Conotoxin-GVIA
	Ca <sub>v</sub> 2.3	R-Typ	Neuronen	SNX-482

### 1.1.1 L-Typ Kalziumkanäle

Wie andere HVA-Kanäle bestehen L-Typ Kalziumkanäle aus einer ionenleitenden α<sub>1</sub>-Untereinheit und zwei akzessorischen Proteinen, eine β- und eine α<sub>2</sub>δ-Untereinheit (Abbildung 1-1). In Skelettmuskel- und Nervenzellen kommt die γ-Untereinheit hinzu (Letts et al., 1998), deren Funktion nur wenig erforscht ist (Catterall, 2000).

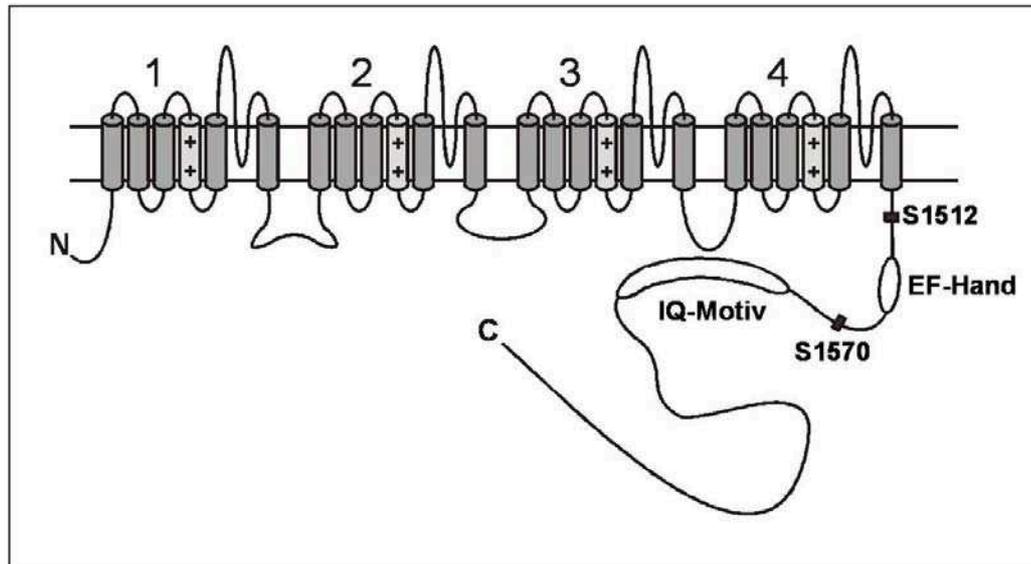


**Abbildung 1-1 Aufbau eines L-Typ Kalziumkanals.** Es soll die Lage aller Untereinheiten in Bezug zur Zellmembran verdeutlicht werden. Der obere Bereich stellt den extrazellulären Raum mit der  $\alpha_2$ -Untereinheit dar, der untere Teil ist der intrazelluläre Raum mit der dort lokalisierten  $\beta$ -Untereinheit. In die Plasmamembran eingelagert sind die  $\alpha_1$ -Untereinheit, sowie  $\delta$  und  $\gamma$ .

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit, die größte und funktionell wichtigste Untereinheit, bestimmt primär die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des Kanals (Catterall, 2000) und kann auch ohne andere Untereinheiten möglicherweise einen eingeschränkt funktionsfähigen Kalziumkanal bilden (Perez-Reyes *et al.*, 1989; Weissgerber *et al.*, 2006). Außerdem trägt diese Untereinheit die Bindungsstellen für Kalziumkanalantagonisten vom Typ der Dihydropyridine, Phenylalkylamine und Benzothiazepine, die als Therapeutika z.B. bei kardiovaskulären Erkrankungen Anwendung finden (Striessnig, 1999).

Die übrigen Untereinheiten  $\beta$  (50-72 kDa, je nach Subtyp),  $\alpha_2\delta$  (125 kDa) und  $\gamma$  (25 kDa) werden als Hilfsuntereinheiten angesehen, da sie die Expression des Kanals, die Kinetik und Amplitude des Kalziumstroms beeinflussen. Außerdem kommt ihnen, besonders der  $\beta$ -Untereinheit, eine wichtige Funktion beim Einbau des Kanalkomplexes in die Zellmembran zu (Gao *et al.*, 1999; Shistik *et al.*, 1995).

Abbildung 1-2 stellt die Struktur der  $\alpha_1$ -Untereinheit von L-Typ-Kanälen dar. Diese setzt sich aus vier homologen transmembranären Domänen (I–IV) zusammen. Sie können in jeweils 6 Segmente (S1-S6) unterteilt werden, welche als  $\alpha$ -Helices die Plasmamembran durchspannen. Die S4 Segmente der jeweiligen Domäne fungieren als Spannungssensor des Kanals. Der Selektivitätsfilter wird aus dem intrazellulären Loop zwischen den Segmenten S5 und S6 gebildet. Allein der Austausch von drei Aminosäuren in dieser Schleife verändert die Selektivität (Feng *et al.*, 2001). Zwischen Domäne 1 und 2 befindet sich die Interaktionsstelle für die  $\beta$ -Untereinheit des Kanals (Hofmann *et al.*, 1999). Am intrazellulären Carboxyterminus, der etwa 700 Aminosäuren umfasst, ist ein Isoleucin-Glutamin (IQ)-Motiv lokalisiert, das in der Lage ist, Calmodulin zu binden. Außerdem findet man in dieser Region ein kalziumbindendes EF-Hand-Motiv und zwei für diese Arbeit bedeutende Phosphorylierungsstellen S1512 und S1570.



**Abbildung 1-2 Struktur der  $\alpha_1$ -Untereinheit eines  $Ca_v1.2$ -Kanals.** Die vier homologen Domänen bilden den Kanal. Jede Domäne besteht aus sechs transmembranären Segmenten. Segment 4 bildet den Spannungssensor und ist hier mit + gekennzeichnet. Zudem sind hier auch das EF-Handmotiv sowie die Serine S1512 und S1570 und das IQ-Motiv dargestellt.

Das IQ-Motiv ist 148 Aminosäuren carboxyterminal vom letzten transmembranen Segment IV S6 lokalisiert (Zuhlke *et al.*, 1999) und besteht aus 12 konservierten Aminosäuren. An diesen Bereich bindet Calmodulin (CaM), ein 17 kDa großes Protein, das zur Familie der EF-Hand-Proteine gehört und eukaryontischen Zellen als Kalziumsensor dient. Diese Calmodulinbindung an das IQ-Motiv hat große Bedeutung für die Autoregulation der  $Ca_v1.2$  Kanäle (Zuhlke *et al.*, 2000) (siehe 1.1.3) und für die Steuerung von Signalkaskaden, die im Zellkern die Transkription von Genen anschalten (Dolmetsch *et al.*, 2001).

Die Klasse der L-Typ Kalziumkanäle kann noch einmal unterteilt werden in  $Ca_v1.1$  bis  $Ca_v1.4$ , wobei sich keine klare Gewebezuordnung aufgrund überlappender Expression definieren lässt.

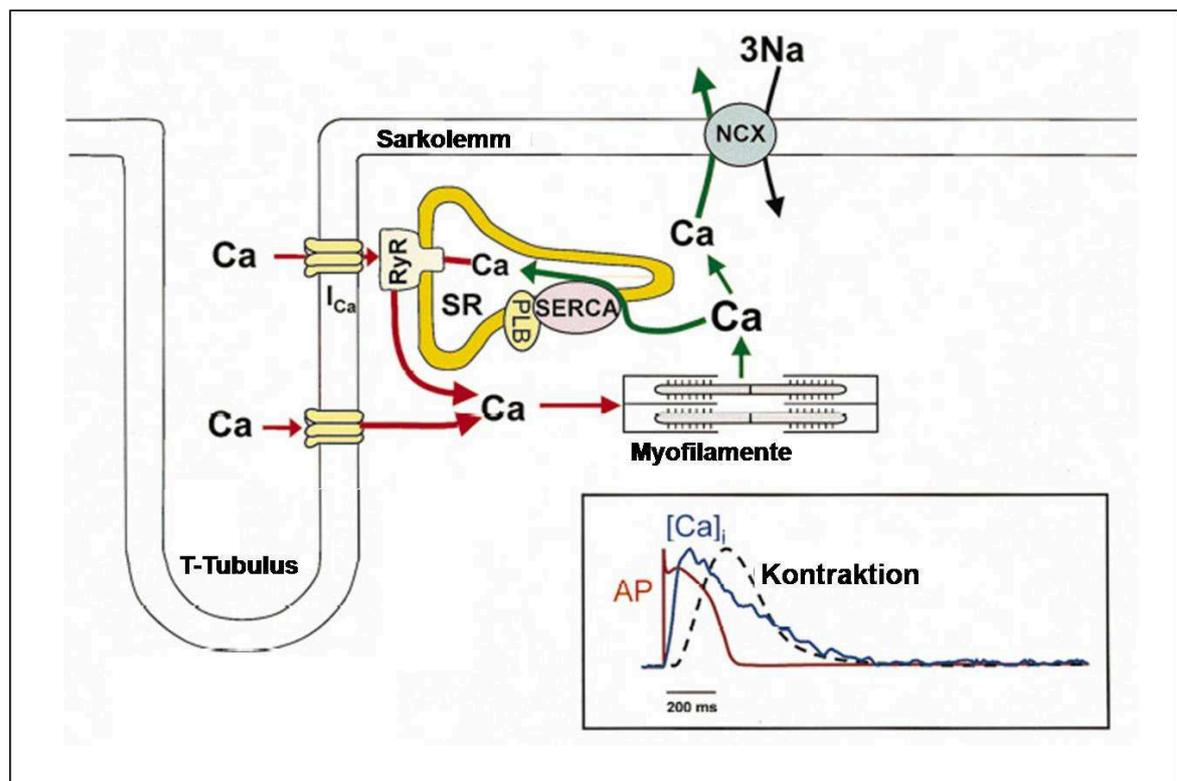
$Ca_v1.1$  wird im Skelettmuskel exprimiert (De Jongh *et al.*, 1991; Tanabe *et al.*, 1987). Dagegen konnte  $Ca_v1.2$  in mehreren Geweben nachgewiesen werden: im Herzen (Bohn *et al.*, 2000), in der glatten Muskulatur (Moosmang *et al.*, 2003), im Pankreas (Schulla *et al.*, 2003), der Nebenniere und dem Gehirn (Hell *et al.*, 1993).  $Ca_v1.3$  wird vor allem im Gehirn exprimiert, allerdings in geringerer Menge als der  $Ca_v1.2$ -Kanal (Hell *et al.*, 1993). Auch in Ovarien, Nieren, Pankreas, Cochlea (Kollmar *et al.*, 1997) und im kardialen Gewebe (Striessnig *et al.*, 2006) einschließlich des Sinusknoten (Bohn *et al.*, 2000) konnte der  $Ca_v1.3$  identifiziert werden.  $Ca_v1.4$  wurde bisher in der Retina (Baumann *et al.*, 2004; Bech-Hansen *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998), in Rückenmarks-Neuronen und im Lymphgewebe (McRory *et al.*, 2004) entdeckt. Je nach Expressionsort unterscheiden sich die Funktionen der

einzelnen Isoformen. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit beziehen sich auf den  $Ca_v1.2$ -Kanal, den sogenannten kardialen Kalziumkanal (Bohn *et al.*, 2000), der sowohl für die Entwicklung des Herzens als auch für seine Kontraktibilität essentiell ist.

### 1.1.2 Der $Ca_v1.2$ -Kanal und seine Bedeutung im Herzen

In Herzmuskelzellen kommen ausschließlich L- und T-Typ Kalziumkanäle vor. Wie oben bereits erwähnt, besitzen die T-Typ Kalziumkanäle nur eine geringe Leitfähigkeit und sind bei sehr negativen Membranpotentialen aktiv.

Für den Kalziumeinstrom ( $I_{Ca}$ ) während des Aktionspotentials können sie vernachlässigt werden, da dieser überwiegend durch L-Typ Kalziumkanäle in den transversalen Tubuli (T-Tubuli) erfolgt.



**Abbildung 1-3 Mechanismus der elektromechanischen Kopplung (Exzitations-Kontraktionskopplung).**  
Erklärung siehe Text. (Abbildung modifiziert, aus Maier and Bers, 2002)

Während der Herzsystole, d.h. der Plateauphase des kardialen Aktionspotentials bleibt die Membran für über 100 ms depolarisiert. Dadurch strömt Kalzium entlang des transmembranären Konzentrationsgefälles über  $Ca_v1.2$  in die Zelle. Dieser Kalziumeinstrom löst eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über Ryanodin-Rezeptoren aus (CIRC) (Bers, 2002). Dieser Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (von 100 nM auf

1  $\mu\text{M}$ ) verursacht kausal die Kontraktion der Zelle. Hier kommt es zu mehreren Anheftungs- und Ablösungszyklen der kontraktilen Proteine (Myofilamente).

Während der diastolischen Relaxationsphase wird das Kalzium aus dem Zytosol über den sarkolemmalen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) nach außen und durch die Kalzium-ATPase des SR (SERCA) in das SR zurückgepumpt (Bers, 2002).

Durch eine *Ca<sub>v</sub>1.2-knock-out*-Mauslinie konnte die bedeutende Rolle dieses Kanals im kardiovaskulären System bestätigt werden. Die Ausschaltung dieses Gens (*CACNA1C*) führte zum Absterben der Embryonen um Tag 13 *p.c.* und zeigte damit, dass dieser Kanal ab Tag 14 *p.c.* für die weitere Entwicklung der Embryonen essentiell ist.

Das Gen des  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals (*CACNA1C*) ist im Anhang dargestellt. Es hat eine Größe von ca. 150 kb und setzt sich aus 44 invarianten und mehr als 6 alternativen Exons zusammen (Soldatov, 1994). Im menschlichen Genom ist es auf Chromosom 12, im Genom der Maus auf Chromosom 6 lokalisiert. Das vollständige Proteinprodukt hat ein Molekulargewicht von etwa 260 kDa.

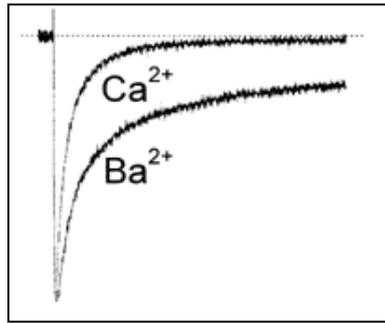
### 1.1.3 Autoregulation von L-Typ Kalziumkanälen

Charakteristisch für L-Typ Kalziumkanäle ist das Phänomen der Autoregulation. Hier steht Calmodulin als zentrales Regulationsmolekül im Vordergrund. Zum Einen hemmt kalziumgebundenes Calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) den L-Typ Kalziumkanal während der sogenannten kalziumabhängigen Inaktivierung (*calcium dependent inactivation*, CDI). Zum Anderen kann dieser  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplex über die Aktivierung der Calmodulinkinase II (CaMKII) zu einer Erhöhung des Kalziumeinstroms durch den L-Typ Kalziumkanal (*calcium dependent facilitation*, CDF) führen (Wu *et al.*, 2004).

#### 1.1.3.1 Inaktivierung

Unter Inaktivierung versteht man, dass der Kalziumeinstrom ( $I_{\text{Ca}}$ ) über den Kanal entweder durch das Membranpotential (*voltage dependent inactivation*, VDI) oder durch Kalzium selbst (CDI) terminiert werden kann.

Als Beweis für die kalziumabhängige Komponente der Inaktivierung dienen Experimente mit Barium ( $\text{Ba}^{2+}$ ) als Ladungsträger, bei denen die Inaktivierung wesentlich langsamer fortschreitet (Abbildung 1-4).

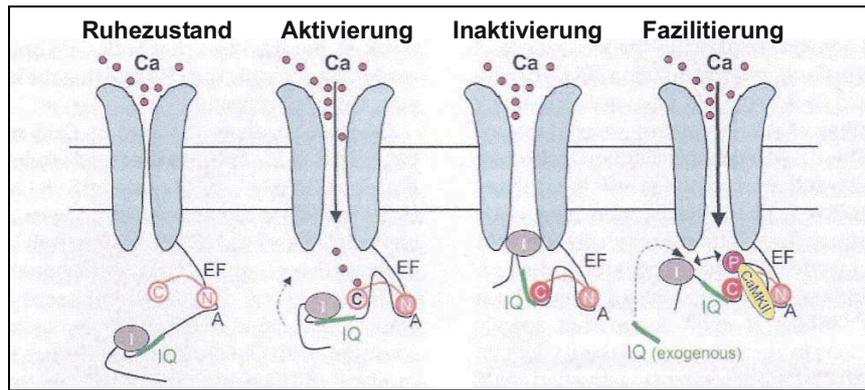


**Abbildung 1-4 Kalzium- und spannungsabhängige Inaktivierung von  $Ca_v1.2$  in Herzmuskelzellen.** Es ist der Verlauf von  $I_{Ca}$  und  $I_{Ba}$  nach Depolarisation der Zellmembran von  $-80$  mV (Haltepotential) auf  $0$  mV gezeigt. (Abbildung aus Findlay, 2002)

Die CDI des L-Typ Kalziumkanals wird durch Calmodulin vermittelt (Zuhlke and Reuter, 1998), das an der sogenannten A-Region zwischen EF-Hand Motiv und der IQ-Domäne des carboxyterminalen Endes des L-Typ Kalziumkanals präassoziiert vorliegt (Kim *et al.*, 2004; Pitt *et al.*, 2001). Kalzium bindet während der CDI mit hoher Affinität an Calmodulin, welches in Folge dessen seine Konformation ändert und mit dem IQ-Motiv interagiert (Peterson *et al.*, 1999). Der Kanal geht in den inaktiven Zustand über und schließt. Es wird angenommen, dass dadurch die Zelle vor einer zu hohen Kalziumkonzentration geschützt wird (Zuhlke and Reuter, 1998). Anhand von Mutationsstudien *in vitro* wurde postuliert, dass das Isoleucin die für die Wechselwirkung mit Calmodulin verantwortliche Aminosäure im IQ-Motiv ist (Zuhlke *et al.*, 2000). Van Petegem konnte diese Interaktion zusätzlich durch Erkenntnisse anhand der Kristallstruktur des Proteinkomplexes aus  $Ca_v1.2$ -Carboxyterminus und  $Ca^{2+}/CaM$  Kristallstruktur bestätigen (Van Petegem *et al.*, 2005).

### 1.1.3.2 Fazilitierung

Neben der CDI als negative Autoregulation existiert die **Fazilitierung** als positiver Feedback-Mechanismus. Nach Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  (*voltage dependend facilitation*, VDF) (Noble and Shimoni, 1981a) oder nach mehreren aufeinanderfolgenden Depolarisationen der Zelle (*calcium dependend facilitation*, CDF) (Gurney *et al.*, 1989; Marban and Tsien, 1982; Noble and Shimoni, 1981b) kommt es hier zu einem veränderten Zustand der L-Typ Kalziumkanäle, der von Dzhura *et al.* als der *mode2*-Zustand benannt wurde (Dzhura *et al.*, 2000). Dieser *mode2* zeichnet sich durch lange Öffnungszeiten und eine hohe Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals aus. Hierbei soll die Phosphorylierung noch nicht genau charakterisierter Targets im  $Ca_v1.2$ -Proteinkomplex durch die CaMKII eine bedeutende Rolle spielen (Anderson *et al.*, 1994; McCarron *et al.*, 1992; Xiao *et al.*, 1994; Yuan and Bers, 1994).



**Abbildung 1-5 Mechanismen der Autoregulation von L-Typ Kalziumkanälen.** Im Ruhezustand ist der Kanal geschlossen und es kann kein Kalzium in die Zelle gelangen. Nach Depolarisation der Zellmembran öffnet sich der Kanal und Kalzium strömt in den Interzellularraum. Bei anhaltender Depolarisation wirkt Kalzium hemmend auf den Öffnungszustand des Kanals, er wird inaktiv und schließt sich. Zusätzlich zur Inaktivierung zeigt sich der Mechanismus der Fazilitierung, die durch Phosphorylierung durch die CaMKII verursacht wird. (Abbildung aus Maier and Bers, 2002)

*In vitro*-Studien unserer Arbeitsgruppe belegen, dass unter den 15 möglichen Phosphorylierungsstellen im Ca<sub>v</sub>1.2-Kanal die im Carboxyterminus lokalisierten Serine S1512 und S1570 von der CaMKII phosphoryliert werden und dies Auswirkungen auf die CDF hat (Lee *et al.*, 2006). Diese Theorie wurde durch unabhängige Arbeiten einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (Erxleben *et al.*, 2006). Zusätzlich zu diesen Phosphorylierungsstellen soll auch die Phosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheit des Kanals eine Rolle für die CDF spielen (Grueter *et al.*, 2006).

Bei S1512A oder S1570A Mutanten ist die CDF vermindert, bei Doppelmutanten sogar völlig beeinträchtigt, während die CDI leicht erhöht ist (Lee *et al.*, 2006). Bis dato wurde die *in vivo*-Bedeutung der beiden Serine S1512 und S1570 und somit die der CDF nicht beschrieben.

Weitere Mutations-Experimente belegen, dass die CDI bei Austausch des Isoleucin gegen Alanin im IQ-Motiv verschwindet, während die CDF unbeeinträchtigt bleibt (Zuhlke *et al.*, 2000). Ersetzt man Isoleucin gegen Glutamat sind beide Mechanismen ausgeschaltet, was den Zusammenhang beider Autoregulationsmechanismen vergegenwärtigt.

Nachfolgende Arbeiten bestätigten diese Erkenntnisse (Erickson *et al.*, 2003; Hudmon *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005). Auch die *in vivo*-Funktion des IQ-Motivs wurde noch nicht charakterisiert.

## 1.2 Die CaM Kinase II

Der Familie der Calmodulin-Kinasen (CaMK) gehören die CaMKI, II und IV, sowie die CaMKIII (auch als eEF2-Kinase bezeichnet) an (Nairn *et al.*, 1985). Von der CaMKII sind vier Subtypen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) bekannt, die jeweils in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (Braun and Schulman, 1995). Während die Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  in Neuronen den

prädominanten Subtyp darstellen, werden die  $\gamma$ - und die  $\delta$ -Isoformen in peripheren Geweben exprimiert (Tobimatsu and Fujisawa, 1989). Die CaMKII  $\delta$  ist die vorherrschende Variante im Herzen (Erickson *et al.*, 2008).

Jede CaMKII-Isoform enthält eine katalytische Domäne, eine zentrale Regulationsdomäne und eine Verbindungsdomäne. In der zentralen Regulationsdomäne überlappen sich die Autoinhibitionsregion und die  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Binderegion. Die Verbindungsdomäne ist verantwortlich für die Oligomerisation der CaMKII, die sich aus 6-12 solcher Untereinheiten zusammensetzt (Braun and Schulman, 1995; Maier and Bers, 2002).

Die Aktivierung der CaMKII während der CDF erfolgt nach Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aufgrund von Kalziumfreisetzung aus dem SR oder durch einströmendes Kalzium (Bartel *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001). Es entsteht der Komplex  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, der schließlich an die Regulationsdomäne bindet, wodurch die Autoinhibitionsdomäne verdeckt wird. Ferner folgt eine Konformationsänderung, so dass das aktive Zentrum der katalytischen Domäne zum Zielsubstrat Zugang hat.

Durch Autophosphorylierung an Threonin (Thr) 286 wird eine autonome Aktivität der CaMKII unabhängig von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM erreicht. Die Autophosphorylierung ist nicht essentiell für die Aktivierung der CaMKII, hat jedoch interessante Konsequenzen. So steigt die Affinität des CaMKII-CaM-Komplexes und Calmodulin wird in der Autophosphorylierungsregion gebunden (Meyer *et al.*, 1992). Dieses hat zur Folge, dass eine längere CaMKII-Aktivität möglich ist (von mehreren Sekunden), obwohl die Kalziumkonzentration bereits wieder auf basale Werte zurückgegangen ist. Die Autophosphorylierung deaktiviert die Autoinhibitionsregion, woraus eine autonome Aktivität von etwa 20-80% resultiert (Lai *et al.*, 1986; Lou *et al.*, 1986; Miller and Kennedy, 1986; Schworer *et al.*, 1986).

Eine vollständige CaMKII-Deaktivierung kann durch Dephosphorylierung mittels der Phosphatasen PP1, PP2A oder PP2C erfolgen (Zhang and Brown, 2004); als organische Inhibitoren der CaMKII werden häufig in Kardiomyozyten KN62 und KN93 eingesetzt (Maier and Bers, 2002). Sie hemmen kompetitiv die CaM-Bindung an der regulatorischen Domäne.

Die CaMKII ist eines der wichtigsten Kalzium-abhängigen Proteine, die an der Modulation der elektromechanischen Kopplung im Herzen beteiligt sind. So können der Kalzium-Einstrom ( $I_{\text{Ca}}$ ), die Kalzium-Ausschüttung aus dem SR und die Kalzium-Wiederaufnahme ins SR beeinflusst werden (Maier and Bers, 2002). Es gibt gute Evidenz, dass dabei verschiedene Proteine phosphoryliert werden, u.A. der L-Typ Kalziumkanal (Maier and Bers, 2002), der Ryanodinrezeptor (Hain *et al.*, 1995; Witcher *et al.*, 1991) und Phospholamban (Davis *et al.*, 1983). Der genaue Ablauf dieser regulatorischen Mechanismen *in vivo* und ihre pathophysiologische Bedeutung sind aber noch weitgehend unklar.

Auch als inaktives Protein, kalziumfrei, kann die CaMKII bereits mit verschiedenen Ionenkanälen und Transportproteinen assoziiert sein (Hudmon and Schulman, 2002).

Zusätzlich zu den akuten Effekten beeinflusst die CaMKII auch längerfristig die Gentranskription, indem es den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element binding protein) phosphoryliert (Hook and Means, 2001). Die genauen Signaltransduktionswege der CaMKII sind jedoch vielfältig und am Myokard noch nicht vollständig bekannt.

### 1.3 Transgene Tiermodelle

Schon lange dienen Tiere in der Medizin als Modellorganismen, an denen die Symptome von Krankheiten, deren Auswirkungen auf den Körper und deren Behandlungsmöglichkeiten untersucht werden. Ziel dabei ist, die gewonnen Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen.

Die rasanten Fortschritte auf dem Gebiet der Gentechnologie erbrachten ihrerseits eine Fülle neuer Anwendungen für die biomedizinische Forschung. Durch den Erfolg von Avery *et al.*, die die Nukleinsäuren 1944 als Träger der Erbinformation erkannten (Avery *et al.*, 1944), wurde ein großer Fortschritt in der Wissenschaft erzielt. So wurde es möglich, durch molekularbiologische Methoden DNS nahezu beliebig zu manipulieren. Mit dem Abschluss des Humangenomprojekts im Jahre 2001 (Venter *et al.*, 2001) und des Mausgenomprojekts 2002 (Waterston *et al.*, 2002) stehen die vollständig sequenzierten Genome dieser beiden Säuger in Online-Datenbanken zur Verfügung. Die Kenntnis der Genomsequenz bildet die Grundlage der systematischen Untersuchung des Erbguts.

Bis dato ist nur bruchstückweise geklärt, welche Aufgabe die einzelnen Gene für den Gesamtorganismus erfüllen. Eine Möglichkeit zum besseren Verständnis ist die gezielte Inaktivierung des jeweiligen Gens durch sogenanntes *Gen Targeting*. Dabei kann das interessierende Gen gezielt ausgeschaltet werden, so dass kein funktionsfähiges Protein mehr gebildet wird (*knock-out*). Wird hingegen eine bestimmte Mutation in das Genom eingeführt, verändert man damit auch das entsprechende Protein an der gewünschten Stelle. In diesem Fall spricht man von *knock-in*.

Das derzeit beste Tiermodell in der biomedizinischen Forschung ist die Maus (*Mus musculus*). Selbst ein Säugetier, ist sie dem Menschen genetisch ähnlicher, als sich auf den ersten Blick vermuten ließe: Die Maus besitzt ebenfalls etwa 30000 Gene. Über 90% davon haben ein entsprechendes orthologes Gen beim Menschen (Waterston *et al.*, 2002).

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

Im Jahre 1987 war es das erste Mal gelungen, in embryonalen Stammzellen der Maus ein erfolgreiches *Gen Targeting* durchzuführen (Thomas and Capecchi, 1987). Seither wurden

diverse knock-out- bzw. knock-in-Mauslinien etabliert. Diese Mauslinien tragen zum besseren Verständnis der molekularen Ursachen von Krankheiten bei und können einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung und Testung neuer, zielgerichteter Medikamente leisten.

## 1.4 Gen Targeting

Für ein erfolgreiches *Gen Targeting* ist zunächst die Herstellung eines entsprechenden Targeting-Konstruktes (Gen-Targeting-Vektor) nötig. Prinzipiell gliedert sich ein Targeting-Konstrukt in vier Bereiche: Der 5'-Arm, das bedeutet der Homologiebereich, der sich 5' des zu verändernden Exons befindet; der Abschnitt, der die Veränderung trägt; einen 3'-gelegenen Homologiebereich und das Vektor-Rückgrat. Beim Vektor-Rückgrat handelt es sich in der Regel um ein Plasmid mit hoher Kopienzahl.

Nach Linearisierung des Targeting-Konstruktes wird es in ES-Zellen eingeschleust. Daraufhin lagern sich die beiden Arme an ihren Zielort an (Heteroduplex-Bildung), worauf es anschließend zum Austausch der entsprechenden DNS-Abschnitte (*crossing over*) kommt (Thomas *et al.*, 1986).

Je länger die homologen Abschnitte sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit der Rekombination (Hasty *et al.*, 1991). Optimale Längen liegen zwischen 5 und 10 kb. Größere Homologiebereiche würden die Rekombinationseffizienz zwar erhöhen, in ihrer Handhabung sind derart lange Fragmente aber nicht praktikabel.

Nur etwa 1 von 1000 Zellen nimmt das Konstrukt auf, und von 1000 transfizierten Zellen kommt es bei nur 1-10 Zellen zur korrekten Homologen Rekombination (Thomas *et al.*, 1986). Ein weiterer Faktor, der die Rekombinationseffizienz beeinflusst, ist unter anderem die Zugänglichkeit des Genortes (Hasty *et al.*, 1991). Ist der anvisierte Zielort im Genom leicht für das Konstrukt zugänglich, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für die korrekte Rekombination. Erstaunlicherweise hat die Anzahl der in die Zelle eingebrachten DNS-Moleküle keinen Einfluss auf die Rekombinationsrate. Daraus resultiert der Schluss, dass die Kapazität der zelleigenen „Rekombinationsmaschinerie“ den limitierenden Schritt für die Häufigkeit des Rekombinationsereignisses darstellt (Thomas *et al.*, 1986).

Zusätzlich zur Homologen Rekombination kommt es sehr häufig auch zur zufälligen Integration in das Genom.

### Das Cre/loxP-System

Für eine erleichterte Suche nach positiven Klonen in der ES-Zellkultur wurden in die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Targeting-Vektoren Resistenzkassetten eingebaut, welche die Gene für Neomycin bzw. Thymidinkinase codieren. Diese NeoTK-Kassetten gilt es, nach erfolgreicher Homologer Rekombination wieder zu eliminieren. Für diesen Schritt

---

macht man sich das Prinzip des Cre/loxP-Systems (Abremski *et al.*, 1983) zunutze. Hierbei handelt es sich um ein Rekombinase-System, bei dem das Enzym Cre-Rekombinase (Cre = causes recombination) eine spezifische Sequenz erkennt, schneidet und die Fragmente neu zusammensetzt. Die Erkennungssequenz wird als loxP-Sequenz (locus of crossing-over (x) des Phagen P1) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine Abfolge von 34 bp. Befinden sich die zwei loxP-Sequenzen in der gleichen Orientierung, wird das, was sich zwischen den beiden Sequenzen befindet aus dem Genom herausgeschnitten, wobei eine loxP-Sequenz erhalten bleibt. Dieser Vorgang geschieht während des Sekundären ES-Zell-Targetings durch transiente Expression der Cre-Rekombinase.

## 2 Fragestellung und Zielsetzung

Ca<sub>v</sub>1.2 spielt, wie schon anfangs erwähnt, im Herzen eine bedeutende Rolle und wird als Vermittler zwischen Erregung und Kontraktion angesehen. Die strenge Regulation der Funktion dieses Kanals ist daher von außerordentlicher physiologischer und pathophysiologischer Bedeutung, weshalb diese Problematik im Zentrum des Interesses vieler Forschergruppen weltweit steht.

Es wird postuliert, dass die Zelle durch kalziumabhängige Inaktivierung (CDI) von Kalziumkanälen vor einer zu hohen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> geschützt wird. Auf der anderen Seite kann physiologisch der Kalziumeinstrom über Ca<sub>v</sub>1.2 kurzzeitig erhöht werden. Man spricht in diesem Falle von kalziumabhängiger Fazilitierung (CDF), einem positiven Feedback-Mechanismus.

Bis heute liegen keine Ergebnisse darüber vor, welche Funktion diese beiden Autoregulationsmechanismen des L-Typ Kalziumkanals, CDI und CDF, *in vivo* haben. Für dies sollte nun in der vorliegenden Arbeit durch Generierung zweier Mauslinien die Grundlage geschaffen werden, nicht zuletzt im Hinblick darauf, durch die Aufklärung der molekularen Mechanismen neue Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln.

Für die Generierung einer transgenen Mauslinie ist es zunächst nötig, einen Gen-Targeting-Vektor herzustellen. Dieser Vektor enthält die gewünscht veränderte DNS-Sequenz. Er kann dann in Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingeschleust werden. Dort wird die Wildtyp-ES-DNS gegen die veränderte Vektor-DNS ausgetauscht (Homologe Rekombination), sodass letztlich ES-Zellen mit mutierter Sequenz vorhanden sind. Der nächste Schritt ist die Injektion der veränderten ES-Zellen in Blastozysten. Dadurch sind nun auch diese ES-Zellen an der Entwicklung des Embryos beteiligt. Sind die Keimzellen aus ihnen entstanden, dann wird die mutierte DNS auch an die Nachkommen weitervererbt und die Mauslinie ist etabliert, die schließlich für *in vivo*-Versuche herangezogen werden kann.

Im ersten Teil dieser Arbeit galt es, eine Mauslinie (im Folgenden als Ca<sub>v</sub>1.2<sup>SF</sup>-Mauslinie bezeichnet) zu generieren, bei der der positive Effekt der CDF nicht mehr auftreten sollte. Durch Mutation der vermuteten CaMKII-Phosphorylierungsstellen S1512 und S1570 zu Alaninen kann der Kanal dort nicht mehr phosphoryliert werden, was vermutlich zur Abschaffung der CDF führen wird.

Im anderen Teil sollte eine Mauslinie erzeugt werden, die Ca<sub>v</sub>1.2<sup>EQ</sup>-Mauslinie, bei der das IQ-Motiv so verändert ist, dass keine Interaktion mehr mit Calmodulin möglich sein wird. Dies sollte mit gezielter Mutagenese des Isoleucins (I1624) zu Glutamat (E) erfolgen, wodurch möglicherweise weder CDI noch CDF stattfinden können.

## 3 Material

### 3.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
6-N-Hexansäure	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Severn, Kidderminster, England
Agar	Oxoid, Hampshire, England
Agarose	Biozym, Oldendorf
Albumin Fraktion (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	SERVA, Heidelberg
Calpain Inhibitor I und II	Roche, Mannheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250 Powder	SERVA, Heidelberg
Deoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
ESGRO LIF	Millipore, Schwalbach
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EthOH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglycol-Tetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Ficoll Typ 400	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum (FCS; Lot 40F2342K)	Gibco-BRL, Karlsruhe
Ganciclovir	Roche, Mannheim
Geneticin (G418-Sulfat)	Gibco-BRL, Karlsruhe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glutathion	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, Hampshire, England
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid(IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Roth, Karlsruhe
N-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka, Buchs, Schweiz
Protease Inhibitor Mixture	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	SERVA, Heidelberg
ssDNA from herring sperm	Sigma-Aldrich, Steinheim
Standardmarker DNA-Extension-ladder	Gibco-BRL, Karlsruhe
Standardmarker Precision Plus Protein Standard	Biorad, München
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
tRNS	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA	Gibco-BRL, Karlsruhe
Trypton	Oxoid, Hampshire, England
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
$\alpha$ - <sup>32</sup> P-dCTP	Hartmann, Braunschweig
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

## 3.2 Enzyme

### Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz (5' → 3')
<i>Afl</i> III	C/TTAAG
<i>Bam</i> HI	G/GATCC
<i>Cl</i> I	AT/CGAT
<i>Eco</i> RI	G/AATTC
<i>Hind</i> III	A/AGCTT
<i>Kpn</i> I	GGTAC/C
<i>Nde</i> I	CATATG
<i>Not</i> I	GC/GGCCGC
<i>Pst</i> I	CTGCA/G
<i>Sal</i> I	G/TCGAC
<i>Xba</i> I	T/CTAGA
<i>Xho</i> I	C/TCGAG

## Andere Enzyme und Kits

Name	Bezugsquelle	Verwendung
<i>Antarctic Phosphatase</i>	NEB, Frankfurt	Dephosphorylierung
<i>Cre-Rekombinase</i>	NEB, Frankfurt	<i>in vitro</i> -Rekombination
<i>Proteinase K</i>	Roche, Mannheim	Zell-Lyse
<i>RNaseA</i>	Roche, Mannheim	RNS-Verdau
<i>RNaseH</i>	Roche, Mannheim	RNS-Verdau
<i>taq</i> -Polymerase	Genscript, New Jersey, USA	PCR
<i>T4 Ligase</i>	NEB, Frankfurt	Ligation
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford, USA	Proteinbestimmung
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Seq Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt	Sequenzierung
ECL Western Blotting System	Pharmacia, Heidelberg	Western-Blot
Expand High-Fidelity Plus PCR System	Roche, Mannheim	PCR
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche, Mannheim	radioaktive Markierung
SuperScript OneStep RT-PCR-System	Invitrogen, Karlsruhe	RT-PCR

## 3.3 Oligonukleotide

### Für PCR

Primer	Sequenz in 5' - 3' - Richtung	Verwendung
<i>5'_NotI_for</i>	5'-P – GCGCTCGCGGCCGCTCTCAAAGTCACAGACCAAAGT – 3'	Herstellung des 5'-Armes
<i>5'_BamHI_rev</i>	5'-P – CCCAGAGGATCCCTTGTCTAGTGTAGTTACTGACTGG – 3'	
<i>3'_1_ClaI_for</i>	5'-P – GCGCTCATCGATGTGTGCTCTCACTTTTTCTGG – 3'	Herstellung des 3-1'-Armes
<i>3'_1_XhoI_rev</i>	5'-P – CCCAGACTCGAGTCTGAGCTCATCAGGATTCT – 3'	
<i>3'_2_XhoI_for</i>	5'-P – GCGCTCCTCGAGAAGACTGGGGAAAAAGATAGC – 3'	Herstellung des 3-2'-Armes
<i>3'_2_KpnI_rev</i>	5'-P – CCCAGAGGTACCCATTTGTTTACATGACAACGCACG – 3'	
<i>OL_S1512A_for</i>	5'-P – ATTGGCTATCCTCGGTCCCAT – 3'	Mutagenese S1512A
<i>OL_S1512A_rev</i>	5'-P – ATGGGGACCGAGGATAGCCAAT – 3'	
<i>OL_S1570A_for</i>	5'-P – CGCCTGGTGCCATGAACA – 3'	Mutagenese S1570A
<i>OL_S1570A_rev</i>	5'-P – TGTTTCATGGCCACCAGGCG – 3'	
<i>SF-Genotyp_for</i>	5'-P – CTTCGAGGTGCAGATTAGTG – 3'	<i>in vitro</i> -Rekombinationstest; Screening 2. Targeting; Genotypisierung
<i>SF-Genotyp_rev</i>	5'-P – CTCACAGGGACTTTACCCAC – 3'	
<i>RE2_rev</i>	5'-P – GAATTGACCTGCAGGGGCCCT – 3'	<i>in vitro</i> -Rekombinationstest; Screening 1. und 2. Targeting
<i>Screen1_for</i>	5'-P – TCCAGTTGTGACTTGCGCA – 3'	Screening 1. Targeting
<i>Son1_Not_for</i>	5'-P – CGCTGAACAACACTCAAGAATA – 3'	Herstellung der 5'-Sonde für Southern-Blot
<i>Son1_Kpn_rev</i>	5'-P – TGCCAAAGCCACATTTTCAGC – 3'	
<i>KI1512_for</i>	5'-P – TGCAGATCATCAACCTCTTT – 3'	PCR über 1512-knock-in- Bereich
<i>KI1512_rev</i>	5'-P – CTCAACCATAATGTCCTAGG – 3'	
<i>KI1570_for</i>	5'-P – GGCCACCAGTATTCTATCATCTC – 3'	PCR über 1570-knock-in- Bereich
<i>KI1570_rev</i>	5'-P – AGGGTAGCATTGAACATGACT – 3'	

<i>cDNA-PCR_seq_for</i>	5'-P-TGATTGGGATGCAGGTGTTTGG-3'	cDNA-PCR über die beiden Mutationen
<i>cDNA-PCR_seq_rev</i>	5'-P-GCTCTAGGTTCCCTTCTGTTTT-3'	
<i>VS9</i>	5'-P-CTGAAACACAGTGAGGAGAGACT-3'	Ca <sub>v</sub> 1.2-Nachweis
<i>VS18</i>	5'-P-TCCTACTGAATGTGTCTTGGCCA-3'	
<i>GAPDH_for</i>	5'-P-CGGCAAATTCAACGGCACAGTCA-3'	GAPDH-Nachweis
<i>GAPDH_rev</i>	5'-P-GGTTTCTCCAGGCGGCACGTCA-3'	
<i>ANP_for</i>	5'-P-TGCCGGTAGAAGATGAGGTC-3'	ANP-Nachweis
<i>ANP_rev</i>	5'-P-ACACACCACAAGGGCTTAGG-3'	
<i>BNP_for</i>	5'-P-TCCTAGCCAGTCTCCAGAGC-3'	BNP-Nachweis
<i>BNP_rev</i>	5'-P-AGACCCAGGCAGAGTCAGAA-3'	
<i>EQ-Genotyp_for</i>	5'-P-CTTCGAGGTGCAGATTAGTG-3'	<i>in vitro</i> -Rekombinationstest; Screening 2. Targeting; Genotypisierung
<i>EQ-Genotyp_rev</i>	5'-P-CTCACAGGGACTTTACCCAC-3'	
<i>RE2_rev</i>	5'-P-GAATTGACCTGCAGGGGCCCT-3'	<i>in vitro</i> -Rekombinationstest; Screening 1. und 2. Targeting
<i>Scr11_for</i>	5'-P-GGGAGGTTTTCAATGTGCAC-3'	Screening 1. Targeting
<i>Check2_for</i>	5'-P-GCCTGAAGAACGAGATCAGCA-3'	PCR über EQ-Bereich
<i>Sc4_rev</i>	5'-P-AGAATCTATCCATCTTTCTAG-3'	
<i>Check1_for</i>	5'-P-TAGGTCCCTCGAAGCTTA-3'	

### **Für Sequenzierung**

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
<i>pBlue_for</i>	5'-P-GTAAAACGGCCAGT-3'	SF-/EQ-Targeting-Vektor
<i>SF_E35_for</i>	5'-P-GCCATACAGATAAAAGACAACG-3'	SF-Targeting-Vektor
<i>SF_E36_for</i>	5'-P-GAAGGAAGCTGTTCTGTCTA-3'	
<i>SF_E37_for</i>	5'-P-GCATCACTAATGTCCATTCTACC-3'	
<i>SF_E38_for</i>	5'-P-TGTAGGGGTACAAGAGTGTT-3'	
<i>KI_1512_for</i>	5'-P-TGCAGATCATCAACCTCTTT-3'	
<i>KI_1570_rev</i>	5'-P-AGGGTAGCATTGAACATGACT-3'	Mutationsnachweis A1570 in ES-Zellen bzw. SF-Maus
<i>SF_cDNA-seq2_for</i>	5'-P-AAGTGTGCCCCAGAGTCTGA-3'	Mutationsnachweis A1512 u. A1570 in cDNS von SF-Maus
<i>EQ_E40_for</i>	5'-P-TGTACAGACAGGAACAAGCA-3'	EQ-Targeting-Vektor
<i>EQ_E41_for</i>	5'-P-TCTAGGATGATGGGG-3'	
<i>EQ_E42_for</i>	5'-P-ATGTGTCCAGAGTGTGGTAGAGG-3'	
<i>EQ_E43_for</i>	5'-P-ATCATCAGAACCCGTGGA-3'	
<i>EQ_E44_for</i>	5'-P-GTAGATACTAATGGGCCTCGCC-3'	
<i>EQ_E40_for</i>	5'-P-TGTACAGACAGGAACAAGCA-3'	Mutationsnachweis EQ in ES-Zellen bzw. EQ-Maus

### 3.4 Antikörper

#### Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Herkunft
anti-Ca <sub>v</sub> 1.2 alpha	Kaninchen	Moosmang <i>et al.</i> , 2003
MAPK	Kaninchen	Cell Signaling

#### Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Herkunft
GAR-HRP	Ziege	Dianova

### 3.5 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
ABI Prism 310 Sequence Analyser	Applied Biosystems, Weiterstadt
Akku-Pipettierhilfe Rota-Filter 3000	Roth, Karlsruhe
Anoden/Kathodenplatte V20-SDB	Techne AG, Jahnsdorf
Bio-Imaging Analyser BAS-1500	Fujifilm, Düsseldorf
Brutschrank HERAcell	Heraeus, Hanau
CertomatR (Bakterienkulturschüttler)	Braun, Melsungen
Curix60-Entwicklermaschine	Agfa, Düsseldorf
Gel Doc 2000 (für Entwicklung von Agarosegelen)	Biorad, München
Gene Pulser™ (zur Elektroporation)	Biorad, München
MilliQ-UF Plus (Wasseraufbereitungsanlage)	Millipore, Schwalbach
Mini-PROTEAN 3 Cell Gelkammer	Biorad, München
Multi TempII (Wasserbad)	Pharmacia, Freiburg
NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
PCR-Maschine Uno II-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Pipettierhilfe (10, 20, 200, 1000, 8-Kanal)	Gilson, Limburg
Ready Sub-Cell GT (Agarosegelkammer)	Biometra, Göttingen
Spannungsquelle bei Elektroelution Desatronix 1000/200	Desaga, Heidelberg
Standard Powerpack P25 (Spannungsquelle für Gelelektrophorese)	Biometra, Göttingen
Sterilbank LaminAir HB 2448	Heraeus, Hanau
Szintillationsmessgerät Tri-Carb 2100 TR	Packard, Meriden, USA
Taumelmischer	NeoLab, Heidelberg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Titertek Multiskan MCC/340	Friedrich Bartolomey, Rheinbach
Transilluminator 4000	Stratagene, Amsterdam
Trockenschrank Heraeus	Heraeus, Hanau

Ultraturrax Polytron PT 1200	Kinematica AG, Luzern
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Amsterdam
Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Vortex-Mixer	NeoLab, Heidelberg
Potter Typ RM4	Janke Kunkel KG, Staufen
Zentrifugen	
Eppendorf Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
J2-HS Centrifuge (Rotor: JA-10; JS-13.1)	Beckmann, München
L-80 Ultracentrifuge	Beckmann, München
Sigma 202MK	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tischzentrifuge	NeoLab, Heidelberg

### 3.6 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
BAS MP2025	Fujifilm, Düsseldorf
Centrisep zur Aufreinigung der Sequenzierreaktion	EMP-Biotech, Berlin
Chromatographiesäulen Nick™ Column	GE Healthcare, München
Einmalstripetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Elektroporationsküvetten	
für Bakterien (2 mm)	Peqlab, Erlangen
für ES-Zellen (4 mm)	Peqlab, Erlangen
Filterpapier-Whatman	GE Healthcare, München
Hyperfilm ECL	Millipore, Schwalbach
Immobilon-P (für Western)	Millipore, Schwalbach
Kryoröhrchen	Nunc, Langenselbold
Kulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Kulturschalen (10 cm, 6-well, 24-well, 96-well)	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Nylon-Membran Highbond N+	GE Healthcare, München
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Petrischalen 10 cm, unbeschichtet	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen gestopft (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson, Limburg
Pipettenspitzen ungestopft (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	
1,0 ml (PCR)	Peqlab, Erlangen
1,5 ml	Fisher Scientific, Schwerte
2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
50 ml	Renner, Dannstadt
Retransferpipetten (115-124 µm)	Biomedical Instruments, Zöllnitz
Retransferpipetten (125-134 µm)	Biomedical Instruments, Zöllnitz
Schlauchfolie	Neolab, Heidelberg
Transfer Tips (Injektionskapillare)	Eppendorf, Hamburg
Vacu Tips (Haltekapillare)	Eppendorf, Hamburg

## 4 Methoden

### 4.1 Bakterienkultur

#### 4.1.1 Verwendeter Bakterienstamm

Bei den Klonierungs- und Transformationsversuchen wurde als Wirtsorganismus der *E.coli*-Stamm XL1-Blue MRF<sup>'</sup> der Firma Stratagene verwendet. Dieser Stamm wird mit folgendem Genotyp beschrieben:  $\Delta(mcrA)183\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173endA1supE44thi-1recA1gyrA96relA\textit{lac}$  [F<sup>'</sup>*proAB lac<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>R</sup>)].

#### 4.1.2 Medien

LB (Luria-Bertani)	SOC (-)	2x YTA
Trypton 10 g	Trypton 2 g	Trypton 16 g
Hefeextrakt 5 g	Hefeextrakt 0,5 g	Hefeextrakt 10 g
NaCl 5 g	5 M NaCl 0,2 ml	NaCl 5 g
Glucose 1 g	1M KCl 0,25 ml	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	(autoklaviert)
(autoklaviert)	(autoklaviert)	bei RT gelagert
bei RT gelagert	bei -20°C gelagert	
Festmedium für Agarplatten	SOC (+)	
Agar 13,5 g	Soc (-) 4,8 ml	
LB-Medium ad 1 l	1 M MgCl <sub>2</sub> 0,05 ml	
	1 M MgSO <sub>4</sub> 0,05 ml	
	20% Glucose 0,1 ml	
	(Lösung sterilfiltriert)	
	bei -20°C gelagert	

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte in Vollmedium Luria-Bertani (LB-Medium) (plus Antibiotikum, z.B. Ampicillin). Als Festmedium diente das oben genannte LB-Medium mit beigefügtem Agar, dem ebenfalls Antibiotikum zugefügt wurde.

Die frisch transformierten Bakterien wurden nach Elektroporation in einem weiteren Medium, dem SOC(+)-Medium resuspendiert.

LB-Medium, sowie auch SOC(-)-Medium und 2x YTA-Medium, wurden zur Sterilisierung 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Die temperaturempfindlichen Zusätze des SOC(+)-Mediums sind sterilfiltriert worden.

Zur Selektion plasmidtragender Bakterien wurde das Medium vor Inokulation mit sterilfiltriertem Antibiotikum in einer Endkonzentration von 100 µg/ml (für Ampicillin) versetzt. Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium 15 g/l Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt und mit dem entsprechenden Antibiotikum mit der Endkonzentration von 50 µg/ml versehen. Diese Lösung wurde anschließend in sterile Petrischalen mit dem Durchmesser von 92 mm gegossen. Die erkalteten Platten wurden bei 4°C gelagert.

### 4.1.3 Kultivierung

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte aerob in LB-Medium. Flüssigkulturen wurden in Glasröhrchen mit Schraubverschluss (7 ml-Kulturen für Plasmidisolierung im kleinen Maßstab) oder in Erlenmeyerkolben (300 ml-Kulturen für Plasmidisolierung im großen Maßstab) herangezogen (bei 37°C).

Für die Herstellung der 7 ml-Kulturen wurden nachmittags Einzelkolonien von den entsprechenden Platten der Transformation in 7 ml Medium überimpft und üN geschüttelt.

Die 300 ml-Kulturen wurden mit ca. 3 ml dieser Flüssig-Vorkultur angeimpft und ebenfalls üN geschüttelt.

Nach einer Transformation können die Einzelkolonien kurzfristig aufbewahrt werden, indem sie auf Agarplatten ausgestrichen, üN inkubiert und anschließend bei 4°C unter Selektionsdruck bis zu 8 Wochen gelagert werden.

### 4.1.4 Langzeitlagerung

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterien können Glycerolkulturen angelegt werden. Dazu versetzt man eine 300 µl Bakteriensuspension, die sich im logarithmischen Wachstum befindet, mit 600 µl Glycerol. Diese Kulturen können bei -80°C über mehrere Jahre aufbewahrt werden.

### 4.1.5 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen verwendete man 300 ml XL-1-Blue MRF'-Kultur, die bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 (logarithmische Wachstumsphase) wuchs. Nach

Zentrifugation der Kultur wurde das Zellpellet mehrmals mit H<sub>2</sub>O (4°C) und 10% Glycerol gewaschen, dann in 10% Glycerol resuspendiert und als 50 µl-Aliquots bei -80°C gelagert.

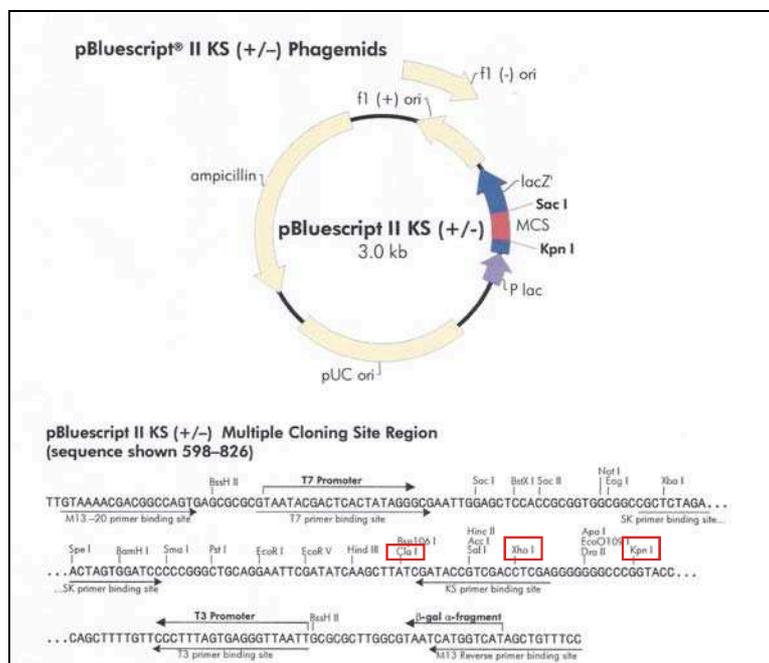
## 4.2 Plasmide

Als Plasmid bezeichnet man ein ringförmiges, doppelsträngiges DNS-Molekül, welches neben dem bakteriellen Genom innerhalb eines Bakteriums vorliegt und sich dort vermehren kann.

### 4.2.1 Ausgangsplasmide

#### pBluescript II KS+ (Stratagene)

Dieses Plasmid fand bei den verschiedenen Subklonierungen von DNS-Fragmenten Verwendung. Neben einem Resistenzgen für Ampicillin besitzt es eine multiple Klonierungsstelle (MCS) mit einer großen Auswahl an Restriktionsschnittstellen. Außerdem trägt es den *pUC ori* Replikationsursprung, der für eine hohe Kopienzahl sorgt, da das Plasmid autonom repliziert werden kann.

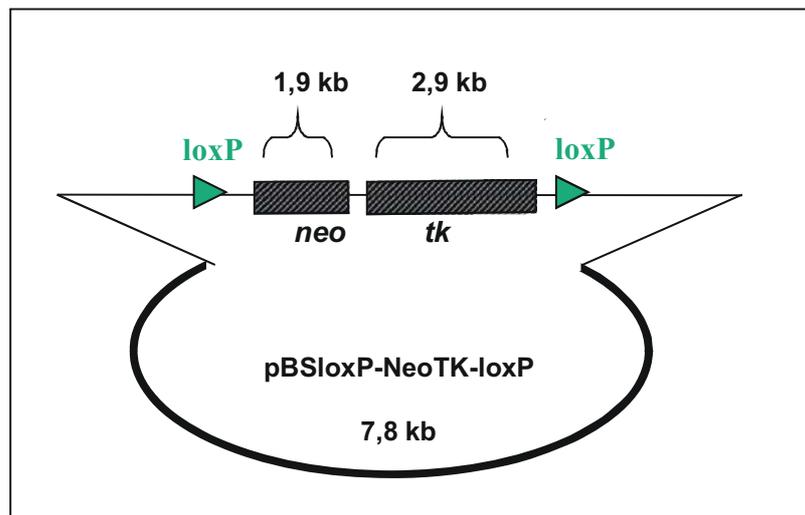


**Abbildung 4-1 Plasmidkarte von pBluescript II KS.** Unten ist die MCS dargestellt: die Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierungen herangezogen wurden, sind rot umrandet.

### pBSloxP-NeoTK-loxP (Dr. Sven Moosmang)

Das Plasmid stammt von pBluescript II KS+ ab und enthält innerhalb der MCS zusätzlich eine NeoTK-Resistenzkassette, das heißt ein Resistenzgen für Neomycin (*neo*) und das Thymidinkinasegen (*tk*) aus dem Herpes simplex Virus I.

Begrenzt wird die NeoTK-Kassette von zwei loxP-Sequenzen, die für die spätere Entfernung der Selektionskassette durch die Cre-Rekombinase benötigt werden.



**Abbildung 4-2** Skizze des pBluescript-Vektors, der die 4,8 kb große Selektionskassette trägt. Diese Selektionskassette enthält ein Neomycin-Resistenzgen (*neo*) und ein Thymidinkinasegen (*tk*) und wird begrenzt von zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen (je 34 bp).

### pIC-Cre (Gu et al., 1993)

Dieses Plasmid wurde pMC1neo Poly A erzeugt, in dessen MCS das Gen für die Cre-Rekombinase codiert ist. Diese Cre-Rekombinase ist für die Rekombination der loxP-Sequenzen und damit für die Eliminierung der NeoTK-Kassette während des Sekundären Targetings verantwortlich. Zudem ist ein Ampicillin-Resistenzgen auf dem Plasmid vorhanden.

## 4.2.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Vektoren

### pBI(Not-BamH) (enthält den 5'-Arm des Targeting-Konstrukts)

Mit Hilfe der Primerkombination *5'\_NotI\_for* + *5'\_BamHI\_rev* wurde ein ca. 1,2 kb großes DNS-Fragment aus dem *CACNA1C*-Bereich (nt 13194–14430) amplifiziert. Durch die genannten Primer erhält das Produkt zusätzlich die Schnittstellen für *NotI* und *BamHI*, mit denen der Abschnitt in pBluescript subkloniert werden konnte.

**pBI(Cla-Xho)S1512A (enthält den aminoterminalen Teil des 3'-Armes)**

Für die Herstellung des einen Teiles des 3'-Armes wurde um das Codon von S1512 ein ca. 3,3 kb großes DNS-Stück (nt 14433–17720) mit den Primern *3'1\_ClaI\_for* + *3'1\_XhoI\_rev* amplifiziert und gleichzeitig die Schnittstellen für die Endonukleasen *ClaI* und *XhoI* eingeführt. Über diese Restriktionsschnittstellen wurde der *CACNA1C*-Abschnitt, der die Exone 35, 36 und 37 enthält, in pBluescript zwischenkloniert.

Es konnte anschließend mit Hilfe des *QuickChange® Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) das Codon für Serin 1512 zu Alanin mutiert werden. Hier fanden die mutationstragenden Primer *OL\_S1512A\_for* und *OL\_S1512A\_rev* Gebrauch.

**pBI(Xho-Kpn)S1570A (enthält den carboxyterminalen Teil des 3'-Armes)**

Dieser Subvektor enthält den *CACNA1C*-Abschnitt um das Codon für S1570 (nt 17721–21139). Die Subklonierung erfolgte mit Hilfe der Schnittstellen *XhoI* und *KpnI*, die durch die Primer *3'2\_XhoI\_for* und *3'2\_KpnI\_rev* in die DNS eingeführt wurden. Das mutierte Codon für Alanin 1570 erhielt man nach der Durchführung einer Overlap-PCR mit den Primern *OL\_S1570A\_for* und *OL\_S1570A\_rev*.

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 4.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNS

Die Isolierung von Plasmid-DNS basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979). Dazu werden die Bakterien in einem ersten Schritt alkalisch mit NaOH/SDS lysiert. Es kommt zur Denaturierung von DNS, RNS und Proteinen. Durch zugefügte RNase A kommt es zum Verdau der RNS.

Im zweiten Schritt, der Neutralisation mit Kaliumacetat, bleibt die jetzt renaturierte kleine Plasmid-DNS in Lösung, während die große genomische Bakterien-DNS denaturiert bleibt und zusammen mit Proteinen, präzipitierten Zellbestandteilen und SDS abgetrennt werden kann.

Für die schnelle Analyse einzelner Zellklone nach einer Transformation wurde eine Minipräparation durchgeführt. Für die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab wurde das Maxi-Präparations-Kit der Firma Qiagen verwendet.

### Minipräparation von Plasmid-DNS

Am Vorabend der Isolierung wurden 7 ml LB-Medium mit 14 µl Ampicillin (50 mg/ml) versetzt und mit einem Zellklon angeimpft. Diese 7 ml-Kultur schüttelte üN bei 37°C und 225 rpm. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur abzentrifugiert (5 min, 6000x g, 4°C). Das dabei entstandene Bakterienpellet wurde in 250 µl MP1 resuspendiert, nach Zugabe von 250 µl MP2 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit 250 µl MP3 auf Eis stehen gelassen.

Nach Zentrifugation (15 min, 20000 x g, 4°C) wurde die DNS im Überstand mit 100% Isopropanol gefällt, das gewaschene Pellet 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und letztlich in der gewünschten Menge H<sub>2</sub>O bei 50°C gelöst.

MP 1 (pH 8,0)		MP 2		MP 3	
Tris	6,06 g	NaOH	8 g	Kaliumacetat	294,5 g
EDTA (2H <sub>2</sub> O)	3,72 g	10% SDS	100 ml	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
RNase A	0,1 g	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	pH 5,5 mit Eisessig eingestellt	
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml				

### Maxipräparation von Plasmid-DNS

Einzelkolonien wurden für ca. 8 h in 3 ml ampicillinhaltigem LB-Medium angezogen, die Minikultur anschließend in 300 ml antibiotikahaltigen LB-Medium überführt und üN bei 37°C und 225 rpm kultiviert.

Die anschließende Maxipräparation wurde nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

#### 4.3.1.2 Isolierung von genomischer DNS

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

Der Lysepuffer enthält ein Detergens (N-Laurylsarcosin), um die Zellmembran zu solubilisieren. Weiterhin werden Proteine denaturiert und durch den Zusatz von Proteinase K abgebaut. EDTA komplexiert mehrwertige Kationen und unterbindet dadurch die Aktivität der vorhandenen DNasen. Anschließend wird die DNS über Alkoholfällung aufgereinigt.

Lysepuffer	
NaCl	0,3 g
0,5 M Tris-HCl pH 7,5	10 ml
EDTA	1,86 g
N-Laurylsarcosin	2,5 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml
(autoklavieren)	
kurz vor Gebrauch 0,25 mg/ml Proteinase K zugeben	

### Isolierung von genomischer DNS aus ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden in 96-well-Platten bis zur Konfluenz herangezogen und dann zweimal mit PBS gewaschen. Für die Lyse der Zellen wurden pro Well 50 µl Lysepuffer (plus 0,25 mg/ml Proteinase K) zugegeben und üN bei 59°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die genomische DNS mit einem Ethanol/NaCl-Gemisch (75 mM NaCl in 100% Ethanol) gefällt, getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O gelöst. So konnten 96-well-Platten bei -20°C bis zur weiteren Verwendung (z.B. Screening) gelagert werden.

### Isolierung von genomischer DNS aus Mausgewebe

Für Genotypisierungen (4.5.1) oder Sequenzanalysen (4.5.3) junger Mäuse wurde genomische DNS aus Gewebebiopsien (aus Schwanzspitze) isoliert. Dazu wurde zum Gewebe 89 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 10x *taq*-Puffer und 1 µl Proteinase K (20 mg/ml) gegeben und üN bei 55°C geschüttelt. Für die Inaktivierung der Proteinase K wurde der Ansatz im Anschluss für 15 min auf 95°C erhitzt. Bei der anschließenden PCR-Reaktion (4.3.9.3) war 1 µl dieser Lösung als Matrize ausreichend.

Für einen Southern-Blot (4.5.2) wurden ca. 5 mm von der Spitze eines Mäuseschwanzes mit 500 µl Lysepuffer üN bei 59°C und 700 rpm versehen. Am folgenden Tag wurde die Lösung mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation (10 min, 14000x g) wurde das zuvor getrocknete Pellet in 400 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Diese DNS-Lösung wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion (4.3.4.2) unterzogen, gefällt und in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

#### 4.3.1.3 Isolierung von mRNA aus Mausgewebe

Die gesamte RNS des Gewebes setzt sich zusammen aus tRNS, rRNS und mRNA. Im Unterschied zu anderen RNS-Formen besitzt mRNA einen „Poly-A<sup>+</sup>-Schwanz“, eine Sequenz von 100–200 Adenin-Nukleotiden, die 3' an das Ende eukaryotischer oder viraler mRNA angeknüpft wird. So lässt sich die mRNA selektiv von den anderen Formen abtrennen.

Der Abbau von RNS-Molekülen durch Ribonukleasen (RNasen) während der RNS-Präparation ist eine unerwünschte Begleitreaktion. Daher galt es zunächst, die Zellen zu

lysieren und dabei die RNasen durch die vorherrschenden Bedingungen zu denaturieren. Die RNS wurde dann durch saure Phenolextraktion von anderen Makromolekülen abgetrennt. Zunächst wurde das gewünschte Gewebe entnommen, in Flüssigstickstoff schockgefroren und mittels eines Mörsers zerkleinert. Pro 100 mg Gewebe setzte man 750 µl Trizol (Invitrogen) hinzu, durch vorsichtiges Resuspendieren auf Eis homogenisierte das Gemisch und wurde 5 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden 200 µl Chloroform (Merck) zugegeben, gemischt und für weitere 2-15 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 10000 rpm, 4 °C) überführte man die obere Phase in ein neues Gefäß und fällte die darin enthaltene RNS mit 500 µl Isopropanol. Das durch Zentrifugation (15 min, 14000x g, 4°C) entstandene Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und schließlich in etwa 20 µl RNase-freiem DEPC-Wasser (0,2%) gelöst.

### 4.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der wässrigen Nukleinsäurelösungen wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem *Nanodrop Spectrophotometer* (PepLab) bestimmt.

Das Verhältnis  $OD_{260/280}$  erlaubt zudem eine Aussage über die Reinheit der Lösung. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 ist die Proteinverunreinigung der Lösung als gering anzusehen.

### 4.3.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

#### 4.3.3.1 Restriktionsverdau

Bei Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzymen) handelt es sich um bakterielle Enzyme, die spezifische Basensequenzen in doppelsträngiger DNS erkennen und schneiden (Sambrook *et al.*, 1989). Im Rahmen der Arbeit wurden Restriktionsenzyme vom Typ II verwendet. Charakteristischerweise spalten diese ihr DNS-Substrat innerhalb oder unmittelbar neben der meist palindromischen Erkennungssequenz. Durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zwischen zwei benachbarten Basen entstehen DNS-Fragmente mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxyl-Ende. Dies ermöglicht später eine enzymvermittelte Neuverknüpfung kompatibler Enden. Die Enden sind je nach Enzym entweder glatt („blunt ends“) oder einander komplementär und 5'- bzw. 3'- überhängend („sticky ends“).

Die Aktivität von Enzymen wird in Einheiten (Units, U) angegeben. 1 U entspricht der Enzymmenge, die nötig ist, um 1 µg definierter DNS unter optimalen Bedingungen in einer

Stunde vollständig zu verdauen. In der Regel wurden für den Restriktionsverdau von Plasmiden und DNS-Fragmenten 2-5 U Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNS eingesetzt. Dabei sollte die Enzymmenge wegen des Glycerolgehalts nicht mehr als 10% des Ansatzvolumens betragen, da sonst die Restriktions-Effizienz beeinträchtigt werden kann.

Der Restriktionsverdau wurde bei der Überprüfung von Restriktionsschnittstellen oder bei der Vorbereitung von DNS-Fragmenten und Plasmiden für eine Ligation angewandt.

Ansatz für Standardverdau	
DNS-Lösung	x $\mu\text{l}$
10x NEB-Puffer	5 $\mu\text{l}$
10x BSA	5 $\mu\text{l}$
Enzym	2-5 U
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu\text{l}$

Es fanden Restriktionsenzyme der Firma NEB mit den entsprechenden Puffern und optional BSA (mit einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Verwendung (Auflistung siehe unter 3.2).

Der Ansatz wurde zwischen 1 h (analytischer Ansatz) und 3-8 h (präparativer Ansatz) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C) verdaut. Der Verdau von genomischer DNS erfolgte über Nacht.

#### 4.3.3.2 Dephosphorylierung von DNS

Um nun die Effizienz der Klonierung von Fremd-DNS zu erhöhen und eine Religation zu vermeiden, wurde die Vektor-DNS mit der *Antarctic Phosphatase* (5 U/ $\mu\text{l}$ ) (NEB) und dem mitgelieferten Puffersystem behandelt, welche 5'-Phosphat-Gruppen abspalten kann und somit die Selbstligation verhindert. Die für eine erfolgreiche Ligation nötigen Phosphat-Gruppen liefert jetzt allein das zu klonierende DNS-Fragment.

Ansatz zur Dephosphorylierung von verdauten Plasmiden	
Plasmid-DNS (Restriktionsansatz)	50 $\mu\text{l}$
10x NEB-Puffer	6 $\mu\text{l}$
<i>Antarctic Phosphatase</i> (5 U/ml)	2 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	ad 60 $\mu\text{l}$

Im Anschluss an den Restriktionsverdau des Vektors wurde jeweils 1 U der Phosphatase plus Puffer dem Ansatz zugegeben und bei 37°C für 15 min inkubiert. Nach

Hitzeinaktivierung (65°C, 5 min) wurde der gesamte Ansatz mit Hilfe eines Agarosegels aufgereinigt. Schließlich konnte die Vektor-DNS für die Ligation eingesetzt werden.

#### 4.3.3.3 Ligation von DNS-Fragmenten

Während einer Ligation erfolgt eine Verknüpfung des 5'-Phosphats mit den 3'-OH-Gruppen von doppelsträngiger DNS zu Phosphodiesterbindungen mit Hilfe einer ATP-abhängigen Ligase. Diese verwendet sowohl DNS mit überhängenden, als auch mit glatten Enden als Substrat.

In den Versuchen wurde die *T4 DNA Ligase* (NEB) eingesetzt, um Fremd-DNS mit linearisiertem, dephosphoryliertem Vektor kovalent zu rekombinanter Plasmid-DNS zu verknüpfen. Sowohl Vektor-DNS als auch Insert-DNS wurden zuvor über Gel-Extraktion (4.3.6) aufgereinigt und anschließend durch Elektroelution (4.3.7) isoliert.

Ligationen wurden in einem Volumen von 20 µl in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem bei RT für 5 min durchgeführt. Für die Ligation wurde meist ein Vektor:Insert-Massenverhältnis von 1:3 gewählt, wobei ca. 10 ng pBluescript eingesetzt wurden. Die Menge an Insert-DNS konnte mittels nachstehender Gleichung berechnet werden.

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

Ansatz für Standardligation	
Plasmid-DNS (10 ng)	x µl
Insert-DNS	(siehe Gleichung)
10x <i>T4 Ligase</i> -Puffer	2 µl
<i>T4 Ligase</i>	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

#### 4.3.4 Reinigung von Nukleinsäuren

##### 4.3.4.1 Alkoholfällung

DNS ist als schwache Säure in leicht alkalisch gepufferten Lösungen besser löslich, als im Sauren oder in reinem Wasser. Bei pH ~8 liegen die Phosphatgruppen deprotoniert und die DNS als gut lösliches Säure-Anion vor. Verschiedene enzymatische Reaktionen (Restriktionsverdau, Ligation, PCR) erfordern jedoch definierte, für das jeweilige Enzym

optimale Reaktionsbedingungen. Daher ist es gelegentlich nötig, die DNS von den enthaltenen Salzen zu reinigen und in Wasser zu lösen. Als schonende Methode eignet sich dazu die Präzipitation der DNS in Ethanol oder Isopropanol. Die Tatsache, dass DNS schlecht in organischen Lösungsmitteln löslich ist, wird bei der Alkoholfällung ausgenutzt. Durch Anwesenheit einwertiger Ionen wird dieser Effekt noch verstärkt. Bei Zugabe von NaCl werden die negativ geladenen Phosphat-Gruppen durch die Na<sup>+</sup>-Ionen abgefangen, wodurch die DNS (jetzt ungeladen) schwerer löslich ist. Der zugefügte Alkohol entzieht dem Molekül Wasser, so dass die DNS letztendlich ausfällt, während die störenden Salze im Überstand gelöst bleiben. Nach Waschen mit 70% Ethanol, Zentrifugation und Trocknen bei RT kann das DNS-Pellet in H<sub>2</sub>O aufgenommen und für anschließende Reaktionen verwendet werden.

### **Ethanolfällung**

Bei der Fällung mit Ethanol wurde die wässrige DNS-Lösung mit 1/10 Volumenteilen NaCl (5 M) oder Na-Acetat (3,2 M) und 2,5 Volumenteilen konzentriertem Ethanol versetzt, 15 min bei -80°C stehen gelassen und anschließend zentrifugiert (15 min, 14000x g, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet zweimal mit 70% Ethanol (4°C) gewaschen, getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst.

Diese Präzipitation wurde zur DNS-Fällung vor allem nach Elektroelution (4.3.7) und Phenol/Chloroform-Extraktion (4.3.4.2) angewandt.

### **Isopropanolfällung**

Für die Fällung mit Isopropanol wurden 0,7 Volumenteile Isopropanol zugefügt, gut gemischt und für 30 min bei 14000x g zentrifugiert. Das Pellet musste anschließend zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich in H<sub>2</sub>O aufgenommen werden.

### **Fällung eines Ligationsansatzes vor Elektroporation**

Vor einer Elektroporation war es nötig, den Salzgehalt des Ligationsansatzes zu verringern. Hierfür wurde dieser zusammen mit 5 µg tRNS durch Zugabe von 0,5 Volumenteilen Ammoniumacetat und 2 Volumenteilen konzentriertem Ethanol gefällt, 30 min bei 14000x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet gewaschen, getrocknet und in 4 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **4.3.4.2 Phenol-Chloroform Extraktion**

Eine weitere Form, DNS von unerwünschten Begleitstoffen wie Proteinen zu reinigen, ist die Extraktion der wässrigen Phase mit Phenol und Chloroform. Beide Substanzen sind nicht mit H<sub>2</sub>O mischbar. Bei der Ausschüttelung denaturieren die Verunreinigungen und sammeln sich in der organischen Phase bzw. bilden eine Interphase an der Grenzschicht. Die beiden

Phasen können jetzt separiert und die DNS aus der wässrigen Phase über eine Alkoholfällung (4.3.4.1) präzipitiert werden.

Die wässrige DNS-Lösung wurde mit einem Volumenanteil einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, Roth) versetzt und gemischt. Im anschließenden Zentrifugationsschritt (5 min, 5000x g, 4°C) bildeten sich zwei Phasen; die obere, wässrige Phase, in der die DNS gelöst war, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNS anschließend durch Ethanolpräzipitation gefällt.

#### 4.3.5 Transformation von Bakterien

Als Transformation oder auch Transfektion bezeichnet man das Einschleusen von Fremd-DNS in eine Wirtszelle. Bakterienzellen werden mit Plasmiden transfiziert, die dort neben dem Bakteriengenom vermehrt werden. Hierfür ist es nötig, die Zellen für die exogene DNS leichter durchgängig („kompetent“) zu machen. Dies geschieht durch die Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO).

Die Transformationseffizienz ist hierbei u.a. von der Plasmidgröße abhängig. Große Plasmide lassen sich generell schwieriger transformieren, als kleine.

Für die Klonierungsarbeiten wurden elektrokompente *E.coli* Zellen (XL-1-Blue MRF', Stratagene) verwendet. Nach Transformation dieser kompetenten Zellen kann durch Aufzucht auf antibiotikahaltigen Medien eine stabile Weitergabe des Plasmids auf Tochterzellen erreicht werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass alle resistenten Bakterienzellen, die in diesen antibiotikahaltigen Medien überleben, ein geschlossenes, intaktes Plasmid enthalten.

Innerhalb dieser Arbeit durchgeführte Transformationen wurden mittels Elektroporation erreicht. Bei dieser Transformationstechnik wird durch einen kurzen Hochspannungsimpuls eine lokale Perforation der Zellhülle erreicht, die ein Einschleusen der DNS in die Zelle ermöglicht. Vor der Elektroporation musste der Salzgehalt des Ligationsansatzes verringert werden, was durch eine Fällung (4.3.4.1) erreicht wurde.

Bei der Transformation mittels Elektroporation wurde wie folgt vorgegangen. 50 µl der elektrokompenten XL-1-Blue MRF'-Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut, darauf der gereinigte Ligationsansatz mit ca. 100-500 ng DNS gegeben und dieses 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend überführte man dieses Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Peqlab) und nahm die Elektroporation mit folgenden Geräteeinstellungen des *Gene Pulser*<sup>TM</sup> (BioRad) vor: Spannung 2,5 kV, Kapazität 25 µF und Widerstand 200 Ω, durchschnittliche Zeitkonstante 4,6 ms. Sofort folgte die Zugabe von SOC(+)-Medium auf die Zellen. Nach einer Erholung von 1 h bei 37°C und 225 rpm wurden

200 µl dieser Kultur auf ampicillinhaltige Agarplatten ausplattiert und üN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die erhaltenen Klone konnten mittels DNS-Isolierung und entsprechender Restriktionsanalyse auf Anwesenheit des rekombinanten Plasmids überprüft werden.

#### 4.3.6 Agarosegelelektrophorese

Aufgrund der negativen Ladung des Ribose-Phosphat-Rückgrats von Nukleinsäuren können diese im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Der notwendige Elektrophoresepuffer ermöglicht die Ladungswanderung und hält einen pH-Wert von 8. In Abhängigkeit von Masse und Konformation (linear, offenzirkulär oder superhelikal) wandern die einzelnen Fragmente unterschiedlich schnell in Richtung Anode. Dabei sinkt die Wanderungsgeschwindigkeit mit zunehmender Masse. Zur Kontrolle des Elektrophoreseverlaufs enthält der Ladepuffer, mit welchem die DNS-Proben versetzt und in die Taschen gefüllt wurden, zwei Farbmarker. Bromphenolblau wandert etwa in Höhe von DNS-Fragmenten mit einer Länge von 10-100 bp und markiert somit die Elektrophoresefront. Xylencyanol wandert dagegen mit DNS-Fragmenten der Größe von ca. 5 kb.

Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid zwischen die Basen der Nukleinsäuren können die aufgetrennten Fragmente im UV-Licht (254 nm) als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wird parallel zu den Proben in einer Gelspur ein Größenmarker (*1 kb DNA-Extension-ladder*, Gibco-BRL) aufgetragen, der DNS-Bruchstücke definierter Länge enthält. Durch Vergleich der Banden kann die DNS-Größe bestimmt werden.

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten im Größenbereich 1-15 kb (z.B. DNS-Fragmente der Restriktionsspaltungen, PCR-Produkte oder Ligationen) wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet.

Für analytische Zwecke wurde je nach Größe der zu trennenden Fragmente 0,5–2% (g/v) Agarose (Biozym) in 1x TBE in der Mikrowelle bei 600 Watt kurz aufgeköcht und gelöst, bis eine klare und homogene Lösung entstand. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) der flüssigen Gellösung in einer Endkonzentration von 0,8 µg/ml zugesetzt. Anschließend wurde der 50 ml-Ansatz blasenfrei in einen geeigneten Gelschlitten gegossen. Für die gewünschte Anzahl an Probentaschen wurde vorsichtig ein Kamm in den Gelschlitten eingesetzt.

Das feste Agarosegel wurde in die horizontale Elektrophorese-Kammer gelegt, mit 1x TBE bedeckt und der Kamm vorsichtig entfernt. Das DNS-Auftragepuffer-Gemisch (5:1) konnte so in die Taschen gegeben werden und nach Auftragen des Standardmarkers wurde der

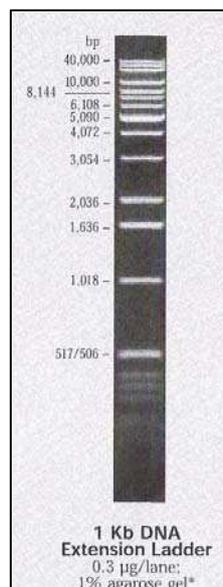
Gellauf gestartet. Das Einlaufen der Proben geschah bei einer Spannung von 50 V, danach bei 100 V.

Nach Abschluss der Elektrophorese musste das Gel aus der Kammer entfernt und am *GelDoc2000* (Biorad) analysiert und fotografiert werden.

Für präparative Zwecke wurde die Gelelektrophorese wie oben beschrieben durchgeführt und die interessierende Bande mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Im Anschluss folgte die Elution des DNS-Fragments aus dem Gel (4.3.7).

10x Tris-Borat-EDTA (TBE)	
Tris-HCl	540 g
Borsäure	275 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	200 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

6x Auftragepuffer	
Ficoll	18 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	1 ml
10x TBE	60 ml
Bromphenolblau (50 mg/ml)	3 ml
Xylenxyanol FF (50 mg/ml)	3 ml
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml



**Abbildung 4-3** Bandenmuster des verwendeten Standard-Markers bei Agarose-Gelen (1 kb DNA-Extension-ladder, Gibco-BRL)

### 4.3.7 Elektroelution

Zur Gewinnung von DNS-Fragmenten bestimmter Größe wurden diese im Anschluss an PCR oder Restriktionsverdau durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Durch Elektroelution (4.3.7) konnten diese DNS-Fragmente aus dem Gel isoliert werden.

Die Gelstücke wurden mit 300 µl 1x TBE in einen Dialyseschlauch (Sigma) überführt und anschließend in eine horizontale, mit 1x TBE befüllten, Elektrophoresekammer gelegt. Bei

145 mA wanderten die DNS-Moleküle aus dem Gel in die 1x TBE-Pufferlösung im Dialyseschlauch. Nach ca. 2 h konnte das DNS-Puffergemisch aus dem Schlauch in ein Reaktionsgefäß überführt und einer Ethanol-Fällung (4.3.4.1) unterzogen werden.

### 4.3.8 Sequenzierung von DNS

Die Sequenzanalyse rekombinanter Plasmid-DNS erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Dabei synthetisiert eine thermostabile Polymerase in einer Amplifizierungs-Reaktion einen zum Zielfragment komplementären Strang. Der Reaktionsansatz enthält neben den vier 2'-Desoxynukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) noch 2', 3'-Dideoxynukleotide (ddNTPs), die aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe die Kettenverlängerung verhindern („Terminator Cycle Sequencing“). Das richtige Verhältnis zwischen dNTPs und ddNTPs führt nach Ablauf der PCR-Reaktion zu einer Mischung sämtlicher Fragmentlängen. Da jedes ddNTP mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, kann die Sequenz automatisch durch Kapillarelektrophorese mit dem *ABI Prism™ 310 Sequence Analyser* (Applied Biosystems) bestimmt werden. Die markierten ddNTPs werden dabei durch Laser-Bestrahlung angeregt und emittieren Licht in vier verschiedenen Wellenlängen (ddGTP: 540 nm; ddATP: 570 nm; ddTTP: 600 nm; ddCTP: 630 nm). Nach Detektion dieser emittierten Strahlung kann durch geeignete Software (*ABI Prism™*) aus den Rohdaten die DNS-Sequenz bestimmt werden.

Verwendete Primer: Pro Sequenzierreaktion können ca. 500 Basen identifiziert werden. Bei Sequenzierung von längeren DNS-Fragmenten muss deshalb bei der Primerwahl darauf geachtet werden, dass sich die entstehenden Fragmente überlappen. Alle für die Sequenzierreaktionen verwendeten Primer sind unter 3.3 aufgeführt. Am Rand des Zielfragments (Insert) erfolgte die Sequenzanalyse mit Primern des pBluescript. Für die Sequenzierung innerhalb des Fragments wurden Primer mit der Computersoftware *Dnaman* erstellt, bei MWG-Biotech bestellt und zu einer Endkonzentration von 0,8 µM in H<sub>2</sub>O gelöst.

Sequenzier-PCR: Zur Synthese der unterschiedlich langen, fluoreszierenden DNS-Fragmente wurde das *ABI prism BigDye Terminator Cycle sequencing ready reaction Kit* (Applied Biosystems) verwendet.

Ansatz für Sequenzierreaktion	
DNS	30-500 ng
Primer (0,8 µM)	4 µl
<i>Ready Reaction Mix</i>	4 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Der gebrauchsfertige *Ready Reaction Mix* enthält die DNS-Polymerase, dNTPs und fluoreszenzmarkierte ddNTPs. Es wurde bei -20°C gelagert und nur auf Eis aufgetaut.

Von DNS-Lösungen, die in kleinem Maßstab gewonnen wurden, musste 1 µl für die Sequenzierreaktion eingesetzt werden. Die optimale Einsatzmenge an DNS aus Präparationen im großen Maßstab sollte im Bereich von 0,5 µg liegen.

Die Reaktion wurde im *Uno II-Thermoblock* (Biometra) durchgeführt. Ähnlich wie bei einer normalen PCR kam es hier nach einer fünfminütigen Denaturierungsphase bei 95°C zu 35 aufeinanderfolgenden Zyklen aus Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphasen.

Protokoll der Sequenzierreaktion	
95°C	5 min
95°C	40 sek
50°C	40 sek
60°C	4 min
x 35	
20°C	5 min

Im Gegensatz zur exponentiellen Amplifikation in einer normalen PCR, kommt es in dieser Reaktion jedoch nur zu einer linearen Vermehrung. Grund dafür liegt in der Tatsache, dass nur ein Primer je Sequenzieransatz enthalten war. Die unterschiedlichen Temperaturen wurden langsam über einen Temperaturgradienten von 1°C pro Sekunde eingestellt.

Reinigung des Sequenzierproduktes: Vor der eigentlichen Sequenzierung im *ABI Prism™ 310 Sequence Analyser* (Applied Biosystems) musste das Sequenzierprodukt mittels einer Säule von kleineren Fragmenten (unter 16 bp), Salzen und nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt werden. Auf die Säule (*Centi Sep Spin Columns*) wurden zunächst 800 µl H<sub>2</sub>O gegeben, gründlich gevortext, von Luftblasen befreit und mindestens 2 h bei RT inkubiert, so dass das Säulenmaterial in dieser Zeit gut quellen konnte. Im Anschluss wurde das H<sub>2</sub>O aus der Säule mittels Zentrifugation (2 min, 750x g, RT) entfernt und die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Es folgte das Auftragen des Sequenzierreaktionsproduktes und erneute Zentrifugation (2 min, 750x g, RT). Das Eluat enthielt die gereinigte DNS und wurde 15–30 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das nicht-sichtbare Pellet konnte durch starkes Vortexen in 20 µl *Template Suppression Reagent* (Perkin Elmer) gelöst und in ein *Abi Prism*-Reaktionsgefäß überführt werden. Nach Denaturierung der Proben für 2 min bei 95°C wurden diese direkt für die Sequenzierung herangezogen oder bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

### 4.3.9 Amplifizierung von DNS mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine enzymatische Methode zur *in vitro*-Amplifizierung von bestimmten DNS-Fragmenten aus einem Gemisch von Nukleinsäuren (Mullis and Faloona, 1987).

Bei 95°C wird die doppelsträngige DNS-Matrize zunächst aufgeschmolzen (**Denaturierung**). An diese Einzelstränge können sich spezifische Oligonukleotid-Primer anlagern (**Annealing**). Sie binden in entgegengesetzter Richtung sowohl an den codierenden als auch an den nicht-codierenden DNS-Strang und stellen mit ihren kurzen, doppelsträngigen Bereichen die Startpunkte für thermostabile Polymerasen dar. Solche Polymerasen sind in der Lage, die Lücken zwischen den Primern zu füllen, indem sie den komplementären, fehlenden Einzelstrang in 5' - → 3'-Richtung synthetisieren (**Elongation**).

Dieser Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird mehrere Male wiederholt. Im Idealfall verdoppelt sich dabei jedes Mal die Anzahl der DNS-Fragmente. Theoretisch entstehen bei n Zyklen  $2^{n-1}$  amplifizierte Moleküle.

Die in der PCR-Reaktion verwendete Annealingtemperatur ist von den Primern abhängig. Diese Temperatur liegt ca. 5°C unterhalb der primerspezifischen Schmelztemperatur, welche durch die G/C- und A/T-Regel bestimmt werden kann. Diese Regel besagt, dass man je G/C-Paar 4°C und je A/T-Paar 2°C einrechnet. Durch Addition erhält man dann die theoretische Schmelztemperatur.

Die Temperatur für die Elongation hängt von der jeweiligen Polymerase ab, die Elongationszeit wird durch die Länge des zu amplifizierenden Zielfragmentes bestimmt.

In dieser Arbeit wurde die PCR angewandt, um DNS-Fragmente aufgrund ihrer Größe zu identifizieren, Plasmide zu konstruieren, die konstruierten Vektoren zu charakterisieren und ES-Zellen und Mäuse zu genotypisieren.

#### 4.3.9.1 Verwendete Polymerasen

##### **Taq-Polymerase (Genscript)**

Die *Taq*-Polymerase ist ein Enzym mit hoher DNS-Syntheserate. Dem Vorteil der hohen Effizienz steht der Nachteil der großen Fehlerrate gegenüber. So wird eine Base bei 1000 Nukleotiden falsch eingebaut.

Die *Taq*-Polymerase wurde bei Überprüfung von Plasmiden und Genotypisierungen nach unten aufgeführtem Protokoll herangezogen.

Ansatz für Standard-Amplifizierung	
DNS	10-500 ng
Primer for (10 pmol/μl)	1,25 μl
Primer rev (10 pmol/μ)	1,25 μl
dNTPs 1,25 mM	4 μl
10x <i>Taq</i> -Puffer	2,5 μl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,25 μl
H <sub>2</sub> O	ad 25 μl

Protokoll für Standard-Amplifizierung	
95°C	5 min
95°C	30 sek
56°C	40 sek
72°C	1 min
x 35	
20°C	10 min

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

Dieses System enthält ein Gemisch aus der thermostabilen *Taq*-Polymerase und der ebenfalls thermostabilen *Pfu*-DNA-Polymerase, die eine 3'5'-Exonukleaseaktivität besitzt. Dadurch wird eine Korrektur falsch eingebauter Nukleotide erlaubt (*proofreading*), wodurch die Fehlerrate bei der Amplifizierung deutlich gesenkt wird. Dies war der Grund, wieso diese Polymerase bei solchen Amplifikationen Gebrauch fand, bei denen eine niedrige Fehlerrate essentiell war, wie bei der Konstruktion der verschiedenen Fragmente des Targeting-Vektors, bei der Sonden-Herstellung für den Southern-Blot und für den Mutationsnachweis in ES-Zellen sowie in transgenen Mäusen.

Ansatz für Standard-Amplifizierung	
DNS	10-500 ng
Primer for (10 pmol/μl)	2 μl
Primer rev (10 pmol/μ)	2 μl
dNTPs 1,25 mM	8 μl
5x <i>High-Fidelity</i> -Puffer	10 μl
<i>High-Fidelity</i> -Polymerase	0,5 μl
H <sub>2</sub> O	ad 50 μl

Es wurde ein *hot-start* durchgeführt, d.h. erst nach einem initialen Denaturierungsschritt wurde die Polymerase zugegeben. Dies sollte Primer-Dimerbildungen oder Fehlhybridisierungen vorbeugen.

Protokoll für Standard-Amplifizierung			
95°C	2 min		
95°C	30 sek	dT -1°C	x 10
65°C	30 sek		
68°C	4 min		
95°C	30 sek	dt +10 s	x 30
65°C	30 sek		
68°C	4 min		
68°C	7 min		

#### 4.3.9.2 Verwendete Primer

Die verwendeten Primer, also Oligonukleotide mit einer Länge von jeweils 18–30 bp, wurden mit Hilfe des Computerprogramms *DNAMAN, Version 5.0* entworfen und über die Firma MWG Biotech bezogen. Der Vorwärtsprimer liegt 5', der Rückwärtsprimer 3' der zu amplifizierenden Sequenz. Die Primer wurden so ausgewählt, dass die Schmelztemperaturen bei 50–60°C lagen und der Guanosin+Cytosin-Anteil etwa 40–60% betrug. Weiter wurden die Primer auf Selbstannealing und Ausbildung von Haarnadelstrukturen überprüft.

Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in einer entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O gelöst, so dass die Konzentration 10 µM betrug. Die Auflistung der verwendeten Primer ist unter 3.3 zu finden.

#### 4.3.9.3 PCR-Anwendungen

##### Overlap-PCR

Dies ist eine geeignete PCR-Methode, um Punktmutationen in ein Zielfragment einzuführen und somit artifizielle Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme zu erzeugen bzw. zu zerstören oder die Aminosäuresequenz und somit funktionelle Eigenschaften des codierten Proteins zu verändern.

Um eine Mutation mit Hilfe der Overlap-PCR in ein DNS-Fragment einzuführen, sind drei Schritte nötig. Zunächst wird das zu mutierende Fragment in zwei Teilfragmente amplifiziert. Der eine Teil erstreckt sich von der Mutation aus bis hin zum 3'-Fragmentende; der andere von der Mutation bis hin zum 5'-Ende. In der dritten Reaktion werden diese Teilfragmente zu dem gewünschten, mutierten Fragment zusammengeführt.

Für die Mutagenese des Serin 1570 in Subvektor pBI(Xho-Kpn)S1570 wurde diese PCR-Methode angewandt.

### Screening-PCR

Das Screenen mittels PCR nach Erstem und Zweitem Targeting geschah mit der *Taq*-Polymerase und dem dafür beschriebenen Standard-Protokoll (4.3.9.1) sowie den unter 3.3 aufgeführten Primern.

### QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit

Für die Einführung der Punktmutation S1512A in Subvektor pBI(Cla-Xho)S1512 wurde dieses Mutagenese-Kit verwendet. Hier können Mutationen in plasmidischer DNS direkt erzeugt werden. Das Prinzip basiert auf dem Einsatz von zwei synthetischen Oligonukleotid-Primern, die zueinander komplementär sind und in ihrer Sequenz die gewünschte Mutation beinhalten. Beide Primer werden zusammen mit der *Pfu*-Polymerase und einem Template-Plasmid in einer PCR eingesetzt. Die *Pfu*-Polymerase, die aufgrund einer 3'→5'-Exonuklease-Aktivität eine geringe Fehlerrate bei der DNS-Synthese aufweist, verlängert, ausgehend von den beiden Primern, das komplette Plasmid und generiert dabei die entsprechende Mutation. Die methylierte, parentale DNS wird im Anschluss mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *DpnI* verdaut, während die nicht-methylierte, PCR-amplifizierte Plasmid-DNS in elektrokompente Zellen transformiert (4.3.5) wird.

Ansatz zur Synthese mutierter Plasmide	
pBI(Cla-Xho)S1512A	100 ng
<i>OL_S1512A_for</i> (10 pmol/μl)	1,5 μl
<i>OL_S1512A_rev</i> (10 pmol/μl)	1,5 μl
dNTP-Mix	1 μl
10x Puffer	5 μl
<i>PfuUltra</i> Polymerase (2,5 U/μl)	1 μl
H <sub>2</sub> O	ad 50 μl

Protokoll für Mutagenese-Programm		
95°C	30 sek	
95°C	30 sek	x 12
55°C	30 sek	
68°C	6 min	
20°C	10 min	

In den Mutagenese-Ansatz wurden als DNS-Matrize 100 ng des Subvektors pBI(Cla-Xho)S1512 eingesetzt. Anschließend wurde das modifizierte Plasmid durch das vorgegebene Programm im Thermocycler synthetisiert. Dabei wurden durch die *PfuUltra* HFDNA-Polymerase mit Hilfe der Primer *OL\_S1512A\_for* und *OL\_S1512A\_rev* neue Plasmide in linearen Zyklen synthetisiert. Diese Plasmide waren bis auf die Punktmutation T/G an der Stelle 16326 identisch zum Ausgangsplasmid.

Zum Schluss mussten die parentalen Ausgangsplasmide eliminiert werden. Durch Verdau (1h bei 37°C) mit *DpnI* (10 U/μl) wurden diese zerschnitten; nur die neu-synthetisierten,

mutationstragenden Plasmide konnten anschließend durch Elektroporation transformiert werden.

Für die Identifizierung der gewünschten Klone wurden die Transformanten durch Sequenzierung auf die Punktmutation hin untersucht.

### **Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

Retroviren sind in der Lage, mit Hilfe der *Reversen Transkriptase* (RT) den Informationsfluss von mRNA in Richtung DNS zu ermöglichen. Bei RT-PCR wird zunächst aus RNS cDNA synthetisiert (reverse Transkription) und diese im nächsten Schritt über PCR amplifiziert. Das benötigte Enzym, die *Reverse Transkriptase*, ermöglicht es, RNS als Matrize für die Synthese eines komplementären einzelnen DNS-Stranges zu verwenden. Diese als „erster Strang“ („first-strand“) bezeichnete cDNS dient nun als Template für die anschließende PCR. In der vorliegenden Arbeit wurde mRNA aus Maus-Gehirn bzw. –Herz zunächst isoliert (siehe 4.3.1.3) und als Template verwendet. Die Reaktion wurde nach Vorschrift des *SuperScript OneStep RT-PCR-Systems* (Invitrogen) durchgeführt.

Zunächst wurde die zuvor isolierte RNS (4.3.1.3) mit den Random-Primern (2,5 µM) gemischt, zum Aufschmelzen von Sekundärstrukturen für 10 min bei 70 °C inkubiert und dann zur Hybridisierung mit den Primern für 10 min bei RT stehen gelassen. Nach Zugabe von 5x *First Strandbuffer*, Dithiothreitol (DTT) (1 mM) und dNTPs (10mM) wurde der Ansatz bis zur Zugabe von 1 µl *Superscript II* weiter bei 42°C für 10 min inkubiert. Danach erfolgte die reverse Transkription im Thermocycler für 1 h und 42°C. Um das Enzym zu inaktivieren und um DNS-RNS-Hybride aufzuschmelzen, erhitzte man den Reaktionsansatz für 10 min auf 95°C. Nach weiteren 10 min auf Eis kam es nun zum Abbau der eingesetzten RNS durch RNase H (10 mg/ml) (30 min, 37°C).

Die so gewonnene cDNS wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **4.3.10 Analyse von DNS durch Southern-Blot**

Die nach ihrem Erfinder Ed Southern (Southern, 1975) benannte Methode findet in der Analyse von genomischer DNS Gebrauch. Zunächst wird die gesamte genomische DNS nach einer Gelelektrophorese auf eine Membran übertragen (Southern-Blot) und das gesuchte DNS-Fragment mit einer radioaktiv markierten DNS-Sonde aufgespürt (Southern-Hybridisierung).

Zu Beginn zerschneidet man die gesamte genomische DNS mittels einem oder mehreren Enzymen. Dies erscheint bei der Auftrennung durch das Agarosegel als „Schmier“ über den gesamten Größenbereich. Um auf das Vorhandensein eines Fragments bestimmter Länge zu prüfen, wird die DNS im Gel in Einzelstränge denaturiert und dann während des Blottings

auf einer Nylon-Membran fixiert. Die radioaktiv markierte Sonde kann spezifisch mit der immobilisierten DNS auf der Membran hybridisieren und schließlich aufgrund ihrer Strahlung auf einer Phosphoimagerplatte sichtbar gemacht werden.

#### 4.3.10.1 Verwendete Lösungen

Depurinierungslösung	
HCl (37%)	40 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Denaturierungslösung	
NaOH	40 g
NaCl	175,3 g
H <sub>2</sub> O	ad 2000 ml

Neutralisierungslösung (pH 7,5)	
Tris	121 g
NaCl	351 g
H <sub>2</sub> O	ad 2000 ml

20x SSC	
NaCl	175 g
Na <sub>3</sub> Citrat * 2 H <sub>2</sub> O	88 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

20% SDS	
SDS	100 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

10x TE	
1 M Tris pH 8,0	50 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	10 ml
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	178 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	156 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

0,5 M EDTA (pH 8,0)	
Na <sub>2</sub> EDTA*2 H <sub>2</sub> O	93,95 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

Hybridisierungspuffer (Church-Puffer)	
BSA	40 g
1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	193,5 ml
1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	56,5 ml
20% SDS	175 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	1 ml
ssDNS (10 mg/ml)	5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

1 M Tris (pH 8,0)	
Tris	60,5 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

ssDNS (10 mg/ml)	
DNA from herring sperm (Sigma)	0,5 g
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml
vor Gebrauch denaturiert	

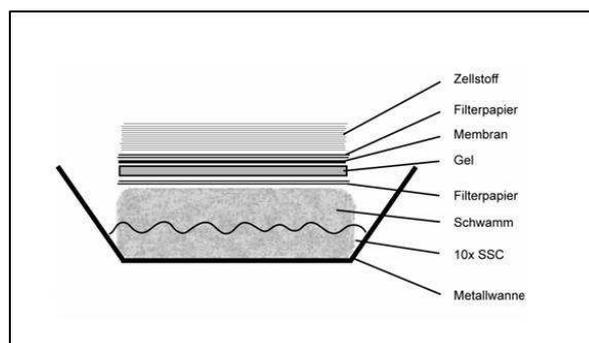
#### 4.3.10.2 Gellauf

Die zu untersuchende genomische DNS (aus ES-Zellen oder Mausgewebe) wurde bei 37°C üN mit 20 U des entsprechenden Restriktionsenzym verdaut und anschließend auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt (4.3.6). Das Gel wurde unter UV-Licht mit angelegtem Lineal fotografiert. Zur Depurinierung wurde das Gel 15 min in 0,4 M HCl geschwenkt. Nach 30 minütiger Denaturierung wurde es 45 min in der Neutralisierungslösung inkubiert.

#### 4.3.10.3 Blotting

Ein mit 10x SSC-Puffer getränktes Filterpapier wurde blasenfrei auf den vollgesogenen Schwamm aufgelegt. Das Gel kam nun mit der Oberseite nach unten auf das Filterpapier. Die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Nylon-Membran (*Nylon-Membran Highbond N+*, GE Healthcare) wurde ebenfalls in 10x SSC getränkt und ohne Luftblasen auf das Gel transferiert. Darüber wurden weitere drei Filterpapiere, ein Stapel Papiertücher und ein Gewicht zum Beschweren geschichtet (Abbildung 4-4). Über Kapillarkräfte wird der Hochsalzpuffer kontinuierlich aus der Wanne in die Papiertücher gesaugt, wobei die DNS aus dem Gel mitwandert und an der Membran haften bleibt.

Am darauffolgenden Tag wurde der Blot abgebaut, die Geltaschen auf dem Blot mit Bleistift markiert und die DNS durch Bestrahlung mit UV-Licht im UV-Stratalinker 1800 (Stratagene) kovalent an die Membran gebunden (*cross-linking*). Zusätzliche Fixierung erfolgte durch Backen im Vakuumofen (2h bei 80°C).



**Abbildung 4-4 Aufbau des Blottes während des Southern-Blottings.** Es ist darauf zu achten, dass die DNS von unten nach oben wandert und die Nylon-Membran daher über dem Gel platziert wird.

#### 4.3.10.4 Southern-Hybridisierung

Die radioaktive Markierung der DNS-Sonden beruht auf dem Prinzip der DNS-Verlängerung von zufällig an den Einzelstrang gebundenen Oligomer-Primern (hier Hexanukleotide) mit

Hilfe des *Klenow*-Fragments (Feinberg and Vogelstein, 1984). Das *Klenow*-Fragment ist die größere Untereinheit der DNS-Polymerase I aus *E.coli* und besitzt eine 5'-3'-Polymeraseaktivität (Auffüllen von Komplementärsträngen) und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Abbau von überstehenden 3'-Enden). Die Hexanukleotide binden zufällig an den DNS-Einzelstrang der Sonde und die Polymerase baut die beigefügten dNTPs in den Komplementärstrang ein. Dadurch, dass dCTP ausschließlich als [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP zugegeben wird, ist somit die Sonde radioaktiv markiert.

### Herstellung von $^{32}$ P-markierten Sonden

Die Sonden für den Southern-Blot wurden durch PCR aus genomischer DNS amplifiziert und über eingeführte Restriktionsschnittstellen in pBluescript kloniert. Vor der Labeling-Reaktion wurden sie durch Restriktionsverdau aus dem Vektor geschnitten und mittels Elektroelution aufgereinigt.

Die radioaktive Markierung erfolgte mit Hilfe des *Random Primed Labeling Kits* (Roche). Es wurden pro Ansatz 150 ng Sonde eingesetzt, mit H<sub>2</sub>O auf 8  $\mu$ l ergänzt und die DNS unmittelbar vor der Labeling-Reaktion 10 min bei 95°C denaturiert. Der Reaktionsansatz an sich setzte sich wie folgt zusammen:

Labeling Reaktionsansatz	
DNS-Sonde (12 ng/ $\mu$ l, denaturiert)	8 $\mu$ l
Hexanukleotid-Mix/ 10x Puffer	2 $\mu$ l
dXTP-Mix (dATP, dGTP, dTTP; je 0,5 mM)	3 $\mu$ l
[ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP 10 mCi/ml (Hartmann)	6 $\mu$ l
<i>Klenow</i> -Enzym	1 $\mu$ l

Dieser Ansatz wurde 90 min bei 37°C inkubiert und anschließend von nicht eingebauten Nukleotiden durch Gelchromatographie über eine *Nick<sup>TM</sup> Column* (GE Healthcare) gemäß den Herstellerangaben gereinigt.

Es folgte die Aktivitätsbestimmung der Sonde mit Hilfe der Cherenkov-Messung am Szintillationsmessgerät (Packard).

### Prähybridisierung und Hybridisierung

Um unspezifisches Binden der radioaktiv markierten Sonde an die Membran zu verhindern, musste diese vorhybridisiert werden. Bei diesem Schritt werden nicht mit DNS besetzte Stellen auf der Membran durch Heringsspermien-DNS blockiert.

Für die Prähybridisierung wurde die Membran mit den darauf geblotteten DNS-Fragmenten 4 h bei 60°C (im Wasserbad) in Church-Puffer (enthält die Heringsspermien-DNS) innerhalb einer Schlauchfolie (Neolab) inkubiert.

Zur Hybridisierung wurde die Sonde zunächst 10 min bei 95°C denaturiert, für 2 min auf Eis gestellt und anschließend zu der entsprechenden Menge vorgewärmten Church-Puffer gegeben. Dabei sollte die Aktivität  $5 \times 10^6$  cpm/ml entsprechen. Die Membran wurde mit 0,125 ml/cm<sup>2</sup> Church-Puffer in eine neue Schlauchfolie eingeschweißt und üN bei 60°C im Wasserbad geschwenkt.

### Entfernung nicht-spezifisch gebundener Sonde

Am darauffolgenden Tag musste die Membran von überschüssiger und unspezifisch anhaftender Sonde befreit werden. Dies konnte durch mehrfaches Waschen in Puffern mit abnehmender Salzkonzentration (und damit steigender „Stringenz“) erreicht werden:

Waschlösung 1 (kurz schwenken)		Waschlösung 2 (15 min bei 60°C)		Waschlösung 3 (je 30 min bei 65°C, 67°C, 72°C)	
20x SSC	100 ml	20x SSC	100 ml	20x SSC	100 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	20% SDS	5 ml	20% SDS	5 ml
		H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Nachdem die Membran luftgetrocknet war, wurde sie in Frischhaltefolie gepackt und auf eine Phosphoimager-Platte (*BAS MP2025*, Fujifilm) aufgelegt.

Nach 1-3 Tagen wurden die Blots mit Hilfe der Computer-Programme *BASReader* und *AIDA* (Firma raytest) ausgewertet.

### Auswertung durch Phospho-Imaging

Die Auswertung der Blots über Phosphoimager-Platten hat gegenüber klassischen Röntgenfilmen den Vorteil der bis zu 100-fach höheren Sensitivität. Zusätzlich können die Signale durch Weißlicht von der Imager-Platte gelöscht werden, so dass eine Mehrfachverwendung möglich ist. Die Imager-Platte ist ein mit BaFBr:Eu<sup>2+</sup>-Kristallen beschichteter Schirm. Durch ionisierende Strahlung wie UV-, Röntgen-,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Strahlung wird ein Elektron des Eu<sup>2+</sup> angeregt, wodurch dieses zu Eu<sup>3+</sup> oxidiert wird und ein BaFBr<sup>-</sup>-Eu<sup>3+</sup>-Komplex entsteht. Der BaFBr<sup>-</sup>-Komplex ist in seinem angeregten Zustand stabil und „speichert“ somit die durch Membranexposition übertragene Information. Bei Laser-Anregung fallen die Elektronen wieder auf das Ausgangsniveau zurück, Eu<sup>3+</sup> wird zu angeregtem Eu<sup>2+</sup> reduziert und dieses geht durch Abgabe eines Photons wieder in den Grundzustand Eu<sup>2+</sup> über. Das abgestrahlte Licht kann nun vermessen und der Blot am Bildschirm sichtbar gemacht werden (Johnston *et al.*, 1990).

## 4.4 Methoden zur Erzeugung genetisch veränderter Mäuse

Voraussetzung für die Entwicklung genetisch veränderter Mäuse war die Entdeckung pluripotenter embryonaler Stammzellen (ES-Zellen). Die ersten ES-Zellen wurden von Evans und Kaufmann (Evans and Kaufman, 1981) und Martin (Martin, 1981) aus der inneren Zellmasse von Blastozysten des 129/Sv-Mausstammes isoliert. Bald danach wurde von Bradley *et al.* gezeigt, dass diese Zellen sich an der Entwicklung sämtlicher Gewebe des resultierenden Embryos, einschließlich der Keimdrüsen beteiligen, wenn sie in die Blastozysten injiziert werden (Bradley *et al.*, 1984). Die erste genetische Manipulation an ES-Zellen wurde von Robertson *et al.* und Gossler *et al.* durchgeführt (Gossler *et al.*, 1986; Robertson *et al.*, 1986). Diese Gruppen konnten zeigen, dass Mutationen im Genom von ES-Zellen von diesen durch die Keimbahn transmittiert werden. Die ersten erfolgreichen Homologen Rekombinationen in ES-Zellen wurden fast gleichzeitig von Thomas und Capecchi sowie Doetschman publiziert (Doetschman *et al.*, 1987; Thomas and Capecchi, 1987). Die hier angewandte Methode der Stammzelltechnologie ermöglicht es, gezielte Veränderungen so in das Genom einzuführen, dass sie im ganzen Organismus vorhanden sind und aufgrund der Keimbahngängigkeit (germline transmission) auch von einer Generation zur nächsten weitergegeben werden. In Abbildung 4-5 wird ein grobes Schema über die einzelnen Schritte bei der Erzeugung genetisch veränderter Mäuse gegeben.

### 4.4.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen

Allgemein versteht man unter Stammzellen Körperzellen, die noch nicht ausdifferenziert, d.h., noch nicht auf ihre spätere Funktion spezialisiert sind. Aufgrund ihrer Herkunft werden Stammzellen, die aus einem Embryo isoliert werden, als Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) bezeichnet (im Unterschied zu adulten oder hämatopoetischen Stammzellen). Zu dem können sie auch noch, je nach Differenzierungseigenschaften, in totipotente, pluripotente, multipotente und unipotente ES-Zellen unterschieden werden. In der Regel werden der Maus pluripotente Stammzellen aus der inneren Zellmasse (Embryoblast) des im Blastozystenstadium befindlichen Embryos (*dies post coitum* 3,5) entnommen. *In vitro* können diese anschließend beliebig vermehrt und in Blastozysten reimplantiert werden. Da die Zellen aus der inneren Zellmasse entnommen wurden, können sie sich nicht zu Geweben differenzieren, die aus der äußeren Zellmasse des Blastozysten (Trophoblast) hervorgehen (Nabelschnur, Plazenta). Deshalb ist nur noch Pluripotenz, aber keine Totipotenz der Stammzellen mehr vorhanden.

#### 4.4.1.1 Nährmedien und Substanzen

Als Medium wurde DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) verwendet. Es enthält neben Aminosäuren, Mineralsalzen und Vitaminen zusätzlich Glucose und den pH-Indikator Phenolrot. Die Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes ist für optimales Zellwachstum unumgänglich. Die Einstellung erfolgt über eine Hydrogencarbonatpufferung, die in Anwesenheit von 5% CO<sub>2</sub> einen pH-Wert von 7,2–7,4 gewährleistet. Ein weiterer Zusatz war Fötales Kälberserum (FCS). Die neben vielen anderen Substanzen enthaltenen Wachstumsfaktoren fördern zusätzlich das Zellwachstum. Dem Medium wurde außerdem β-Mercaptoethanol zugesetzt, was eine Oxidation und damit Inaktivierung des LIF verhindert.

##### DMEM (Invitrogen)

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

##### FCS (Gibco); Lot 40F2342K

Fötales Kälberserum; wurde 20 min bei 60°C hitzeinaktiviert und in 50 ml-Aliquots bei –20°C gelagert

##### Trypsin / EDTA 10x (Gibco)

mit 1x PBS auf 1x bzw. 2x verdünnt, sterilfiltriert

##### LIF (Esgro™, Chemicon) 10<sup>7</sup>U/mL

Leukämie-inhibierender-Faktor, Arbeitslösung 5x10<sup>5</sup> U/ml: 1ml LIF 10<sup>7</sup> U/ml mit 19 ml EF-Medium verdünnt, sterilfiltriert und in Aliquots à 1 ml bei 4°C gelagert; Endkonzentration 1000 U/ml

##### β-Mercaptoethanol (Sigma)

β-ME, Arbeitslösung 50 mM: 73,5 µl β-ME in 21 ml PBS verdünnt, sterilfiltriert und in Aliquots à 1 ml bei –20°C gelagert; Endkonzentration 0,1 mM

##### Selektionszusatz G418 (Gibco)

Geneticin, G418-Sulfat, Arbeitslösung 40 mg/ml, Aliquots à 5 ml bei –20°C gelagert; Endkonzentration 0,4 mg/ml

##### Selektionszusatz Ganciclovir (Roche)

Cymeven i.v. / Ganciclovir-Na, Arbeitslösung 20 mM, Aliquots à 50 µl bei –20°C gelagert; Endkonzentration 2 µM

#### 4.4.1.2 Gefäße für die Zellkultur

Kulturgefäß	Medium-Volumen	Trypsin/EDTA-Volumen
175 cm <sup>2</sup> -Kulturflasche	20 ml	5 ml
75 cm <sup>2</sup> -Kulturflasche	15 ml	3 ml
25 cm <sup>2</sup> -Kulturflasche	5 ml	2 ml
55 cm <sup>2</sup> -Petrischale	10 ml	2 ml
6-well-Platte 54cm <sup>2</sup>	3 ml/Well	1,5 ml/Well
24-well-Platte 55cm <sup>2</sup>	1 ml/Well	500 µl/Well
96-well-Platte 31cm <sup>2</sup>	200 µl/Well	40 µl/Well

#### 4.4.1.3 Allgemeine Vorgehensweise bei der ES-Zellkultur

Absolut höchstes Gebot bei der Kultur von ES-Zellen ist, die Pluripotenz aufrechtzuerhalten. Unbedingt müssen stets optimale Kulturbedingungen sehr penibel eingehalten werden, um eine Differenzierung zu verhindern. So wurden die ES-Zellen auf eine Ein-Zell-Schicht (*Monolayer*) aus Feederzellen (embryonale Fibroblasten) ausgesät. Diese aus Mäuseembryonen gewonnenen, nun teilungsunfähigen Zellen geben neben bestimmten Wachstumsfaktoren und Nährstoffen den Leukämie inhibierenden Faktor (LIF) in das Medium ab. LIF, ein Polypeptid-Zytokin, wurde als der essentielle Faktor erkannt, der ein Ausdifferenzieren der pluripotenten Stammzellen in andere Zelltypen verhindert (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). Des Weiteren muss die Kultur ständig unter Beobachtung stehen und ein zu starkes Annähern der einzelnen Zellkolonien verhindert werden, da die Zellen auch dabei differenzieren.

Für einen besseren Überblick werden hier die einzelnen Arbeitsschritte während der Kultivierung von ES-Zellen schematisch dargestellt.

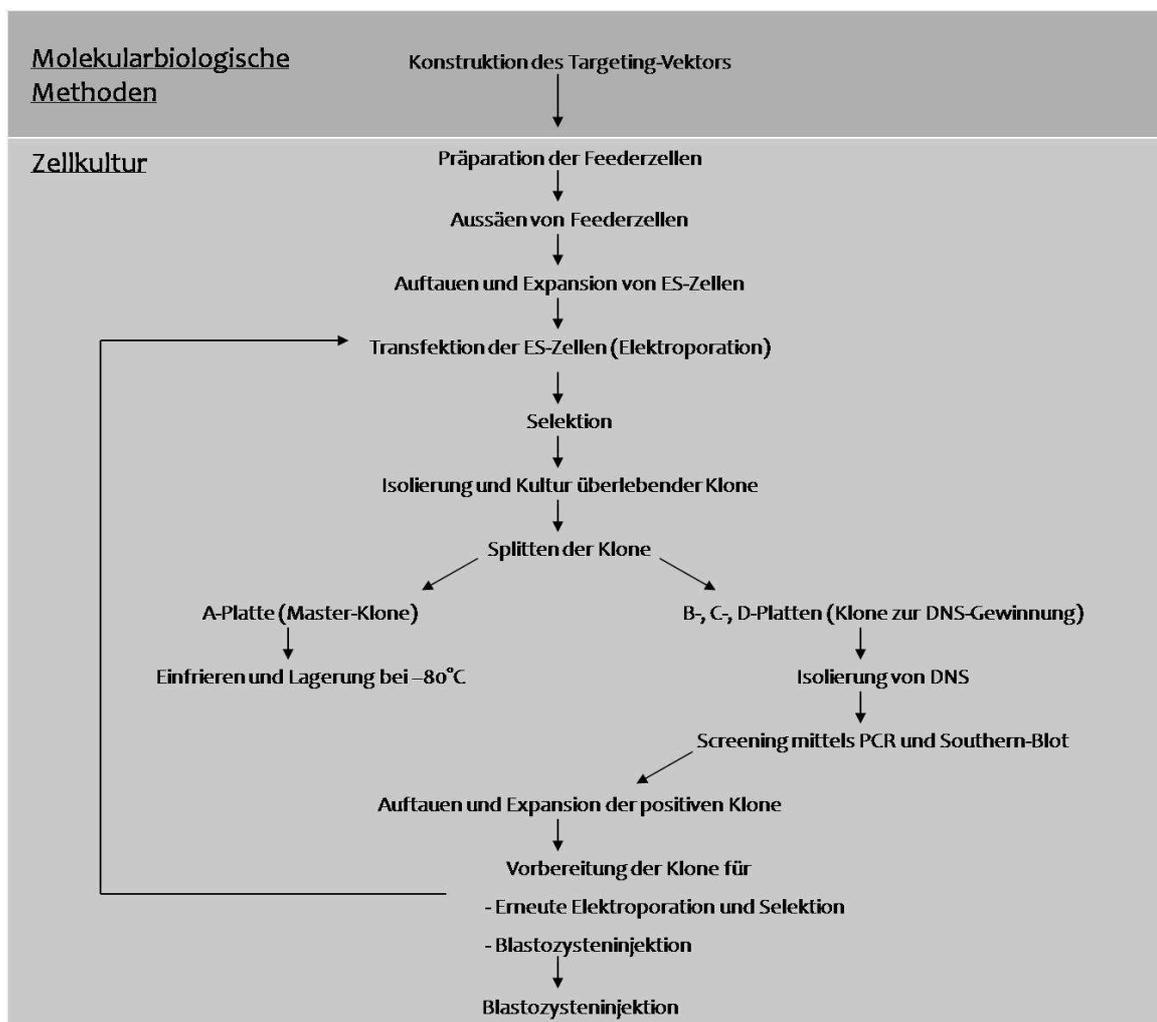


Abbildung 4-5 Die wichtigen Schritte während der ES-Zellkultur im Überblick

Die Kultivierung fand bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (HERAcell, Heraeus) mit täglichem Mediumwechsel statt. Hatten die Zellen eine Fläche von ca. 70% bewachsen, wurden sie gesplittet. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten 5 min bei 200x g und RT.

Zudem fand das Arbeiten mit ES- und Feederzellen unter einer Sterilbank (*LaminAir HB2448*, Heraeus) statt.

## 4.4.2 Feederzellen

### 4.4.2.1 Gewinnung von Feederzellen

Zur Isolierung embryonaler Fibroblasten wurden männliche C57/Bl6 (J-Tg(pPGKneobpA) 3Ems/J)-Mäuse (Jackson Laboratory), die das *neo*-Resistenzgen homozygot besitzen, mit weiblichen C57/Bl6 Wildtyp-Mäusen verpaart. Die Weibchen wurden am nächsten Morgen auf das Vorhandensein eines Vaginalplugs, als Indiz für erfolgte Kopulation, untersucht. Am Tag 14,5 *p.c.*, also 14 Tage später, wurden die Embryonen isoliert und zur Feederzell-Präparation verwendet. Nach Entfernen der inneren Organe („rotes Gewebe“) sowie der Extremitäten und des Kopfes wurde der Rumpf in Stücke geschnitten und mit 1ml 1x Trypsin/EDTA pro Embryo für 10 min bei 37°C inkubiert. Durch anschließendes Auf- und Abpipettieren musste schließlich eine homogene Lösung entstehen, welche mit EF-Medium zu einem Gesamtvolumen von 40 ml gebracht wurde. Damit die Zelltrümmer absinken konnten, wurde das Gemisch für 10 min bei RT stehen gelassen. Letztlich wurden je 2 ml der Suspension plus 19 ml EF-Medium in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen gegeben und die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wachsen gelassen. Nach Erreichen der Konfluenz (ca. 5-6 Tage) erfolgte das Ernten der Zellen.

### 4.4.2.2 Ernten, Bestrahlen und Einfrieren der Feederzellen

Zum Ernten der Feederzellen wurde zunächst das Medium in den 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen abgesaugt und anschließend mit 15 ml PBS gewaschen, pro Flasche 4 ml 1x Trypsin/EDTA zugegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit der Stripette gründlich vereinzelt und bis auf einen kleinen Rest in einem 50 ml-Falcon vereint. Die Kulturflasche wurde auf 20 ml Gesamtvolumen mit EF-Medium aufgefüllt und erneut für 6 Tage bis zur Konfluenz wachsen gelassen (2. Passage). Nach dem Abernten aller Flaschen wurde das Röhrchen mit vereinigten Zellen zentrifugiert und in 20 ml EF-Medium resuspendiert.

Es folgte die Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlung (5000 Rad) am Institut für Mikrobiologie, Klinikum Rechts der Isar, womit die Zellen teilungsunfähig gemacht wurden. So können sie später einen einschichtigen Zellrasen ausbilden, auf dem die ES-Zellen wachsen können.

Nach der Bestrahlung wurden die Zellen abzentrifugiert, das Pellet in einer geeigneten Menge (pro Stock 1 ml) Einfriermedium (EF-Medium+10% DMSO) gelöst und auf 1 ml-Aliquots in Kryovials (Nunc) verteilt. Es folgte das stufenweise Einfrieren der Zellen (1 Tag bei -20°C, 1 Tag bei -80°C, danach in flüssigem Stickstoff). Diese Prozedur wurde bis zur Passage 5 wiederholt.

Die Teilungsfähigkeit und die Dichte der Feederzell-Stocks mussten vor Gebrauch in einem Testaussäen bestimmt werden.

#### 4.4.2.3 Aussäen von Feederzellen

Generell wurden Feederzellen einen Tag vor Beginn der geplanten ES-Zellkultur ausgesät. Dazu wurden die Zellen schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in ein mit 9 ml EF-Medium versehenen 15 ml-Falcon überführt, abzentrifugiert, in dem nötigen Volumen EF-Medium aufgenommen und in das entsprechende Kulturgefäß gegeben. Mindestens 4 h vor ES-Zell-Zugabe wurde das EF-Medium gegen ES-Medium ausgetauscht.

### 4.4.3 Embryonale Stammzellen

#### 4.4.3.1 Gewinnung Embryonaler Stammzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden R1 (Genotyp: 129X1/SvJx129S1/SV-+p<sup>Tyr-c</sup>Kitl<sup>Sl-J/+</sup>) ES-Zellen (Nagy *et al.*, 1993) verwendet. Diese wurden aus Blastozysten von agoutifarbenen Mäusen gewonnen, expandiert und nach Passage 13 als gebrauchsfertige Gefrierstocks in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Zeitpunkt der Elektroporation befanden sich die Zellen in Passage 15 (SF-Zellkultur, 5.1.3) bzw. 14 (EQ-ES-Zellkultur, 5.2.2).

#### 4.4.3.2 Auftauen und Aussäen Embryonaler Stammzellen

Die ES-Gefrierstocks wurden schnell bei 37°C (Wasserbad) aufgetaut und in 9 ml vorgewärmten ES-Medium gewaschen. Das durch Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde in 1 ml ES-Medium resuspendiert und in ein 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturgefäß mit Feederzellen und bereits 4 ml vorgelegtem ES-Medium gegeben.

#### 4.4.3.3 Expandieren in die nächst höhere Zellpassage

Nach vollständiger Abnahme des Mediums wurde der Zellrasen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 1x Trypsin/EDTA bei 37°C für 3 min. Anschließend wurden die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gründlich vereinzelt, mit ES-

Medium zu einem Gesamtvolumen von 10 ml gebracht, abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml frischem ES-Medium aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt.

#### 4.4.3.4 Primäres Zell-Targeting

Im Ersten Targeting werden die ES-Zellen mit dem Targeting-Vektor transfiziert. Ein effizientes Verfahren ist dabei die Elektroporation (Chu *et al.*, 1987; Neumann *et al.*, 1982). Kurze Hochspannungsimpulse bewirken eine Störung des Membranpotentials der Zelle. Es entstehen Poren in der Membran und fremde DNS kann ins Zellinnere aufgenommen werden (Klenchin *et al.*, 1991; Sukharev *et al.*, 1992). Im Zellinneren kann sich die fremde DNS in das Genom der Zelle integrieren. Diesen Vorgang bezeichnet man als „*crossing over*“ homologer Bereiche oder auch „Homologe Rekombination“.

Der Targeting-Vektor enthält ein Neomycin-Resistenzgen. Dadurch wird eine Resistenz gegenüber dem Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin (G418) vermittelt. Die Kultur in geneticinhaltigem Medium überleben folglich nur die Zellen, die den Selektionsmarker in ihr Genom integriert haben und somit resistent gegenüber G418 sind. Die Resistenz zeigt jedoch nur an, dass der Targeting-Vektor integriert hat, jedoch nicht, an welcher Stelle. Daher mussten alle isolierten Zellklone mit einem Screening danach getestet werden, ob die Homologe Rekombination an der richtigen Stelle stattgefunden hatte. Alle Zellklone, die nach dem Ersten Targeting als positiv gescreent worden waren und auch in der Sequenzanalyse die veränderte DNS-Sequenz zeigten, wurden einem Zweiten Targeting unterzogen.

#### Vorbereitung des Targeting-Vektors

Je 100 µg des entsprechenden Targeting-Vektors wurden mit 100 Units der Endonuklease *NotI* für 4 h linearisiert. So wurden beide Targeting-Vektoren (pBI-lox-NeoTK-Not/Bam-S1512/1570A und pBI-lox-NeoTK-EQ) unmittelbar 5' zum Beginn des 5'-Armes geöffnet. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung (4.3.4.2) mit anschließender Natriumacetat-Fällung. Die DNS wurde unter der Sterilbank getrocknet und in 20 µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst. Für die Elektroporation war eine Menge von 10-50 µg nötig. Das entsprechende Volumen wurde der Vektor-DNS-Lösung entnommen und mit PBS auf 100 µl ergänzt.

#### Elektroporation

Für die Elektroporation wurde eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche bis zur 60-70%igen Konfluenz wachsen gelassen (1-3 Tage). Die ES-Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, mit 1x Trypsin/EDTA vom Gefäßboden gelöst, sorgfältig vereinzelt und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zell-Pellet in 900 µl PBS aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette (25 x 4 mm, Peqlab) überführt. Dazu gab man den linearisierten Vektor. Es folgte die Elektroporation mit dem *Gene Pulser*<sup>TM</sup> (BioRad) bei 0,23 kV und

500  $\mu$ F. Die Zellen wurden im Anschluss für 5 min bei RT inkubiert und danach in 11 ml ES-Medium überführt. Je 1 ml dieser Suspension wurde auf insgesamt 12 mit Feederzellen bewachsenen 55 cm<sup>2</sup>-Petrischalen pipettiert. Nach 24 h wurde mit der positiven Selektion begonnen.

### **Positive Selektion mit G418**

Die Selektion erfolgte in geneticinhaltigem ES-Medium (0,4 mg/ml). Dieses wurde mindestens einmal täglich gewechselt, bei massivem Zellsterben auch zweimal täglich.

### **Picken von ES-Zellklonen**

Nach 7-9 Tagen werden resistente Zellklone mit bloßem Auge in der Petrischale erkennbar. Nur Zellklone mit scharf abgegrenztem, leuchtendem Rand wurden gepickt, denn nur von diesen konnte ausgegangen werden, dass sie noch ihre Pluripotenz besaßen.

Der ganze Pick-Vorgang (jeweils an 4 aufeinanderfolgenden Tagen) fand unter einem Stereomikroskop (Zeiss) mit angelegtem Mundschutz und OP-Haube statt. Es wurde je ein Klon mit der 20  $\mu$ l Pipette umfahren, eingesaugt und in ein Well einer 96-well-Platte mit 30  $\mu$ l PBS transferiert. War diese Platte voll, wurden 30  $\mu$ l 2x Trypsin/EDTA pro Well zugegeben. Nach 3 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Kolonie gut vereinzelt und 60  $\mu$ l ES-Medium plus G418 zugegeben. Das Volumen von 120  $\mu$ l pro Well wurde geteilt und je die Hälfte in mit Feederzellen vorbereitete 96-well-Platten (A- und B-Platte) überführt.

### **Einfrieren der Sicherungsplatte (Platte A)**

Nach 2-3 Tagen (bei 70%iger Konfluenz) wurde die Sicherungsplatte A für die Lagerung bei -80°C vorbereitet. Jedes Well wurde mit 180  $\mu$ l PBS gewaschen, die Zellen trypsiniert und direkt mit 180  $\mu$ l Einfriermedium (ES-Medium + 10% DMSO) suspendiert. Die Zellen wurden schließlich 1-3 h bei -20°C und dann bei -80°C eingefroren.

Es muss beachtet werden, dass die Sicherungsplatten dort nicht länger als 8 Wochen gelagert werden dürfen, da die Zellen an Qualität für eine Keimbahngängigkeit verlieren.

### **Vervielfältigung der Platte B für DNS-Isolierung**

Platte B wurde auf drei 96-well-Platten gesplittet. Platte B, C und D (Screening-Platten) sind also exakte Duplikate von Sicherungsplatte A und somit können die später positiv gescreenten Klone auch in Platte A zugeordnet werden.

Jedes Well in Platte B wurde mit 180  $\mu$ l PBS gewaschen, die Zellen trypsiniert und 120  $\mu$ l ES-Medium zugegeben. Von dieser Zellsuspension wurden je 50  $\mu$ l auf die C- und D- Platten aufgeteilt. Bei allen drei Platten wurden pro Well 150  $\mu$ l ES-Medium zugegeben. Nun musste

solange gewartet werden, bis die Wells komplett dicht bewachsen waren (bis zu 1 Woche). Dann wurden die Platten mit PBS gewaschen und bei -20°C eingefroren.

#### 4.4.3.5 Screening nach dem primären Zell-Targeting

Die Platten für das Screening wurden aufgetaut, die Zellen lysiert und anschließend daraus die DNS isoliert (4.3.1.2). Je nach Screening-Methode wurde die ES-Zell-DNS entweder einem Restriktionsverdau (4.3.3.1) unterzogen (Screening mittels Southern-Blot (4.3.10)) oder direkt in die Screening-PCR-Reaktion(4.3.9) eingesetzt.

#### 4.4.3.6 Sekundäres Zell-Targeting

Neben der *neo*-Resistenz besitzt der Vektor als weiteren Selektionsmarker ein Gen, das für die virale Thymidinkinase codiert (*tk*). Die Thymidinkinase ist ein Enzym, das Ganciclovir phosphoryliert und somit in dessen aktive Form überführt, welche toxisch für die Zelle ist. Beim Sekundären Zell-Targeting („Zweites Targeting“) erfolgt die Transfektion mit dem pIC-Cre-Plasmid (Gu *et al.*, 1993). Dieses Plasmid wird nur vorübergehend episomal in die Zellen aufgenommen und vermittelt die Expression der Cre-Rekombinase. Dadurch kommt es wiederum zu Rekombination der loxP-Sequenzen und letztlich zur Entfernung der Selektionskassette.

Wird die Kultur nun in ganciclovirhaltigem Medium durchgeführt, kann das Virostatikum nur bei vorhandener Thymidinkinase aktiviert werden. Alle Zellen, bei denen die NeoTK-Kassette noch vorhanden ist, sterben folglich ab. Diese Art der Selektion wird als „Negativ-Selektion“ bezeichnet, da dieses Mal nur Zellen ohne Selektionsmarker überleben.

#### Auftauen und Kultivierung der positiven Klone

Die als positiv identifizierten Klone wurden im Brutschrank bei 37°C aufgetaut („schnelles Auftauen“) und mit 100 µl ES-Medium suspendiert. Anschließend wurden sie in mit Feederzellen vorbereitete 24-well-Platten transferiert. Bei 70%iger Konfluenz wurden die Klone in das nächst größere Kulturgefäß (6-well, dann auf eine 25 cm<sup>2</sup>- und dann auf zwei 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen) expandiert.

#### Vorbereitung des pIC-Cre Plasmids

Analog zur Vorbereitung des Targeting-Vektors im Ersten Targeting (4.4.3.4), wurden hier 100 µg nicht-linearisierter, also zirkulärer pIC-Cre Vektor mit Natriumacetat gefällt (4.3.4.1), in 20 µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst und davon 40 µg auf ein Endvolumen von 100 µl mit PBS versetzt.

### **Elektroporation (Cre-Transfektion)**

Die Elektroporation erfolgte wie beim Ersten Targeting, mit dem Unterschied, dass die Zellen nach der Elektroporation in unterschiedlichen Konzentrationen auf die 55 cm<sup>2</sup>-Petrischalen ausgesät wurden, da das Wachstumsverhalten der transfizierten Zellen nicht vorherzusehen ist. Bei zu hoher Zelldichte werden durch das Absterben der Zellen sehr große Mengen an Faktoren freigesetzt, welche dann ihrerseits das Wachstum der richtig rekombinierten Zellen beeinträchtigen können. Es wurde auf insgesamt 6 Platten 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml, 0,5 ml und 0,25 ml der 11 ml-Zellsuspension ausgesät.

### **Negativselektion mit Ganciclovir**

Bei den dichteren Schalen (4 ml, 3 ml, 2 ml) begann die Selektion in Ganciclovir-haltigem Medium (2 µM) nach 48 h, bei den anderen Petrischalen nach 72 h. Nach etwa 8-10 Tagen konnten die ersten Klone isoliert werden (es wurde an 2 Tagen gepickt). Im Weiteren wurde analog zum Ersten Targeting (4.4.3.4) vorgegangen.

### **4.4.4 Blastozysteninjektion**

Die ES-Zellen, die sowohl nach dem Ersten Targeting, als auch nach dem Zweiten Targeting als positiv gescreent worden waren (Homologe Rekombination erfolgte an der richtigen Stelle und die NeoTK-Kassette wurde eliminiert) und die auch die mutierte DNS aufweisen, werden letztlich zum letzten *in vitro*-Schritt der Generierung von transgenen Mäusen herangezogen, der Blastozysteninjektion.

Es wurden die entsprechenden ES-Zellklone aufgetaut, in Blastozysten injiziert und diese Blastozysten in Ammen-Mäuse (*foster-mice*) reimplantiert.

### **Vorbereitung der ES-Zellen zur Injektion**

2 Tage vor geplanter Injektion wurden die dafür vorgesehenen Klone in Kultur genommen. Kurz vor der Injektion wurden die ES-Zellen trypsinisiert, das Zellpellet in 500 µl ES-Medium aufgenommen und 30 min auf Eis stehen gelassen, um tote Zellen abzutrennen. Anschließend wurden 375 µl Überstand abgenommen (mit den toten Zellen) und verworfen. Der Rest wurde gut resuspendiert.

### **Isolierung der Blastozysten**

Zur Gewinnung der Blastozysten wurden üN C57/Bl6 Weibchen mit Männchen des gleichen Stammes verpaart und am nächsten Morgen auf das Vorhandensein eines Vaginalplugs geprüft, was auf erfolgte Kopulation hindeutet. Im Falle einer Befruchtung entspricht dies Tag 0,5 *p.c.* Am Tag 3,5 *p.c.* wurden die Spenderweibchen per Genickbruch getötet, die Uteri

entnommen und mit M2-Medium (Sigma) durchgespült. Die Blastozysten wurden mit einer Transferpipette (ID= 115-124  $\mu\text{m}$ , BioMedical Instruments) eingesammelt und bis zur Injektion in M16-Medium (Sigma-Aldrich) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (ca. 1 h).

### Blastozysteninjektion

Für die Injektion der Blastozysten mit den ES-Zellen verwendete man einen sogenannten Mikromanipulator. Der Injektionsvorgang fand in einer auf 10°C gekühlten Kammer mit M2-Medium statt. Die Blastozyste wurde mit der Haltepipette (Sterile VacuTips® ES, Eppendorf) durch Ansaugen möglichst so fixiert, dass die innere Zellmasse bei der späteren Injektion nicht verletzt werden konnte und eine Einschnürung der Trophoblasten möglichst genau gegenüber der Haltepipette erkennbar war. Zwischen 8 und 15 ES-Zellen wurden perlschnurartig mit einer Injektionspipette (Sterile TransferTips® ES, Eppendorf) mittels eines Druckdosierers (Cell Tram Oil, Eppendorf) eingezogen und schließlich vorsichtig in die Höhle der Blastozyste injiziert (Abbildung 4-6-3 rechts).

Nach Beendigung der Injektionen wurden die injizierten Blastozysten mit einer Transferpipette eingesammelt und in M16-Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Reimplantation inkubiert (1-3h).



**Abbildung 4-6 Schema über den Ablauf der Blastozysteninjektion. Erklärung siehe Text.**

### **Implantation in scheinträchtige Ammenmütter**

Als Ammen sollten CD1-Weibchen dienen, die vom Hormonstatus auf Schwangerschaft eingestellt sind, jedoch keine eigenen Embryos tragen. Daher setzte man sie mit sterilen, vasktomierten FVB/N Männchen zusammen und untersuchte am nächsten Morgen auf einen Vaginalpfropf. Nach erfolgter Kopulation stellte sich der Organismus auf Schwangerschaft um, ohne dass eine Befruchtung stattgefunden hatte („Pseudo-schwangerschaft“).

Zur Blastozysteninjektion wurden die Tiere narkotisiert (150 µl einer Mischung aus 2,1 ml NaCl 0,9%, 0,39 ml Rompun, 0,39 ml Ketavet, 0,12 ml Ventranquil 1%), der Uterus durch einen gezielten Schnitt am Rücken freigelegt und mit einer Transferpipette 10-13 Blastozysten ins Infundibulum injiziert. Der Uterus wurde anschließend wieder in die ursprüngliche Lage gebracht und die Wunde vernäht.

Die Tragezeit von Mäusen beträgt 21 Tage. Etwa 7 Tage nach der Geburt ist die Fellfarbe der Jungen erkennbar und erste Aussagen über Chimäritätsgrad möglich.

### **4.4.5 Testen der Chimären auf Keimbahngängigkeit und Etablierung von knock-in-Mauslinien**

Die durch Homologe Rekombination veränderten ES-Zellen (aus SV129-Mäusen, agouti) und die für die Injektion verwendeten Blastozysten (aus C57/Bl6-Mäusen, schwarz) stammen von Mäusen mit unterschiedlich genetischem Hintergrund ab. Aus diesem Grund bezeichnet man die auf solche Weise erzeugten Mäuse als Chimären. Bei der Entstehung des Maus-Embryos tragen somit Stammzellen beider Mauslinien bei. Daher besitzen die Nachkommen, also die Chimären, ein geflecktes Fell. Das Ausmaß des Chimärismus lässt sich dadurch bereits optisch durch Beurteilung der Fellfarbe abschätzen. Je größer der agoutifarbene Anteil, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass auch Keimbahnzellen die gewünschte Mutation tragen und diese dadurch weitervererbt wird (Keimbahngängigkeit).

Um eben diese Keimbahngängigkeit zu testen, wurden alle Chimären mit hohem (50–95%) Chimärismus mit C57/Bl6-Tieren verpaart. Agouti wird dominant gegenüber schwarz vererbt, so dass braune Nachkommen ein Allel aus dem ES-Zell Genom, entweder das mutierte oder das Wildtyp-Allel. Dies konnte anschließend mit einer Genotypisierungs-PCR (4.5.1) getestet werden.

Für die weitere Zucht von homozygoten Tieren wurden die Heterozygoten untereinander verpaart.

## **4.5 Analyse von genetisch veränderten Mäusen**

### **4.5.1 Genotypisierung durch PCR**

Den Nachkommen wurde am Tag 7-15 eine Schwanzbiopsie entnommen, das Gewebe üN wie unter 4.3.1.2 beschrieben verdaut und die DNS isoliert. 1 µl des Verdau-Ansatzes wurde für die Genotypisierungs-PCR eingesetzt. Die Primer sind so gewählt, dass sich Wildtyp- und knock-in-Allele aufgrund verschiedener Amplikongrößen unterscheiden lassen. Reaktionsansatz und Programm sind dem *Taq*-Standard-Protokoll (4.3.9.1) zu entnehmen.

### **4.5.2 Genotypisierung durch Southern-Blot**

Für den Nachweis über Southern-Blot muss mehr Gewebe verdaut werden. Daher wurden 5 mm des Schwanzes üN mit Proteinase K verdaut und die DNS-Isolierung wie unter 4.3.1.2 beschrieben vorgenommen. Anschließend wurde mittels Southern-Blot (4.3.10) der Genotyp bestimmt.

### **4.5.3 Sequenzanalyse der knock-in-Mäuse**

Auch hier wurde die DNS wie unter 4.3.1.2 beschrieben gewonnen. Anschließend wurde die Sequenz, wie unter 4.3.8 beschrieben, ermittelt.

## 4.6 Biochemische Methoden

### 4.6.1 Proteingewinnung aus verschiedenen Geweben

Das zu untersuchende Gewebe wurde möglichst zügig dem Tier entnommen, in Flüssigstickstoff schockgefroren und mittels Mörser und Pistill pulverisiert. Das so gewonnene Pulver wurde mit 2% SDS/50 mM Tris, pH 7,4 (10 mg Gewebe/ 100 µl) für 10 min aufgekocht und anschließend die Lösung zentrifugiert (10 min, 10000x g). Der Überstand wurde abgenommen und eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt (4.6.2). Das Lysat wurde bei -80 °C gelagert.

### 4.6.2 Quantitative Proteinbestimmung

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des *BCA Protein Assay Reagent A* und *B* (Pierce) wurden alle Werte durch eine Doppelbestimmung ermittelt. Diese Methode beruht auf einer Kombination der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine im alkalischen Medium (Biuret-Reaktion) mit der photometrischen Detektion des Kupfer-Kations ( $\text{Cu}^+$ ) unter Verwendung einer Bicinchoninsäure (BCA)-haltigen Lösung. Das Reaktionsprodukt aus zwei Molekülen BCA und einem  $\text{Cu}^+$  besitzt eine starke Absorption bei 540 nm, die in einem Photometer gemessen werden kann.

50 µl der zu bestimmenden, 1:100 und 1:200 verdünnten Proteinproben und 50 µl der BSA-Standard-Lösungen (Konzentrationsbereich: 100-1000 µg/ml) wurden jeweils mit 200 µl eines Gemisches aus *BCA Protein Assay Reagent A* und *B* (50:1) 45-60 min bei 60°C inkubiert. Danach wurden je 50 µl der Proben in eine Mikrotiterplatte überführt und dort die Extinktion bei 540 nm gemessen (Titertek Multiskan MCC/340).

Die Proteinkonzentration konnte schließlich anhand einer Eichgeraden aus der Extinktion bei 540 nm der BSA-Standard-Lösung errechnet werden.

### 4.6.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und wird standardmäßig zur Trennung von Proteinen eingesetzt. SDS ist ein anionisches Detergens und überdeckt die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass Micellen mit konstantem, negativem Ladung/Masse-Verhältnis entstehen (1,4 g SDS/1 g Protein).

Bei der Vorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95°C erhitzt und dadurch die Tertiär- und Sekundärstruktur durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und

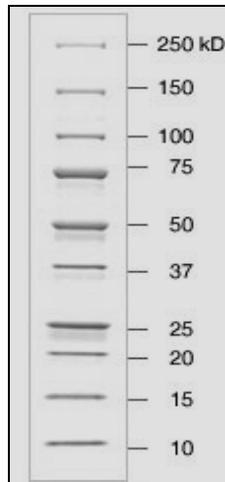
durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen werden durch Zugabe der reduzierenden Thiolverbindung  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgespalten. Dadurch wird gewährleistet, dass allein die Masse, nicht aber die Struktur des Proteins als Trennkriterium wirkt. Bei der SDS-Elektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol, wobei die Elektrophorese in einem von Lämmli (Laemmli, 1970) eingeführten diskontinuierlichem Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem erfolgt.

10x TBS (pH 8,2)		4x Tris/SDS (pH 6,8)		4x Denaturierungs- (Lämmli-) puffer	
Tris	12,1 g	Tris	6,04	1M Tris pH 6,7	10 ml
NaCl	87,6 g	SDS	0,4 g	20% SDS	12,5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	Bromphenolblau	20 mg
				Glycerin	20 ml
				DTT	2 mg
				H <sub>2</sub> O	ad 50 ml
1x TBST		Polyacrylamidgel		10x Elektrophoresepuffer	
10x TBS	100 ml	<u>Trenngel 10%</u>		Tris	30,2 g
Tween 20	1 ml	Acrylamid (30%)	1670 $\mu$ l	Glycin	144 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	4x Tris/SDS (pH 8,8)	1250 $\mu$ l	SDS	10 g
		H <sub>2</sub> O	2080 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
		20% APS	12,5 $\mu$ l		
		TEMED	5 $\mu$ l		
4x Tris/SDS (pH 8,8)		<u>Sammelgel</u>			
Tris	18,2 g	Acrylamid (30%)	325 $\mu$ l		
SDS	0,4 g	4x Tris/SDS (pH 6,8)	625 $\mu$ l		
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	H <sub>2</sub> O	1525 $\mu$ l		
		20% APS	6 $\mu$ l		
		TEMED	3 $\mu$ l		

Die Komponenten des engmaschigen Trenngels und des großporigen Sammelgels wurden jeweils bis auf APS und TEMED gemischt. Zuerst wurde dann das Trenngel gegossen. Hierfür wurde durch Zugabe von TEMED und APS die Polymerisierungsreaktion von Acrylamid gestartet, das noch flüssige Gel in die vorbereiteten Glasplatten eingefüllt, die zuvor in die Gelhalterung eingespannt worden waren. Das Gel wurde mit 1 ml 100% Ethanol überschichtet, was eine gleichmäßige glatte Oberfläche des Trenngels gewährleistet. Nach der Polymerisierung des Trenngels (ca. 15 min) wurde der Ethanol vollständig entfernt, das Sammelgel fertig gemischt, auf das Trenngel gegossen und sofort ein Kamm als Aussparung von Probestaschen eingesetzt. Nach ca. 10 min war auch das Sammelgel erstarrt. Das Gel wurde daraufhin in die *MiniProtean3Cell* Gelkammer (Biorad) eingesetzt, die mit 1x Laufpuffer befüllt war.

Die Proben wurden mit 4x Lämmli-Puffer versetzt, auf ein Endvolumen von 20  $\mu$ l gebracht, 5 min bei 95°C aufgeköcht und schließlich in die Taschen pipettiert. Als Größenstandard wurden 5  $\mu$ l des *Precision Plus Protein Standard* (Biorad) (Abbildung 4-7) aufgetragen.

Die Trennung der Proteine erfolgte zunächst bei 50 mV bis zum vollständigen Einlaufen der Proben in das Trenngel. Danach wurde die Spannung auf 120 mV erhöht und das Gel so lange laufen gelassen, bis die Farbstofffront (Bromphenolblau) den unteren Rand des Gels erreicht hatte.



**Abbildung 4-7** Bandenmuster des verwendeten Standard-Markers bei Polyacrylamid-Gelen (Precision Plus Protein Standard, Biorad)

#### 4.6.4 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse im Semi-Dry-Verfahren dient zum Nachweis bestimmter Proteine aus einem Proteingemisch mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1992). Dabei werden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine in einem vertikal zur Oberfläche angelegten elektrischen Feld aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (*Immobilon-P*, Millipore) transferiert. Nach dem Transfer wird das Protein mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (Primärantikörper) detektiert. Entstandene Antigen-Antikörper-Komplexe werden dann mittels eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, sichtbar gemacht. Durch die gekoppelten Enzyme können vorher undetektierbare Substrate in eine nachweisbare Form umgewandelt werden.

Anodenpuffer1 (pH 10,4)	
Tris	36,3 g
Methanol	100 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Anodenpuffer2 (pH 10,4)	
Tris	3,03 g
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Kathodenpuffer	
6-N-Hexansäure	5,2 g
Tris	3,03 g
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine nun auf die PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde die Membran kurz in Methanol getaucht und in Anodenpuffer<sup>2</sup> gewaschen. Drei Stück *Whatman 3 MM Papiere* (in Anodenpuffer 1 eingeweicht) und zwei Stück (in Anodenpuffer 2 eingeweicht) wurden übereinandergeschichtet, gefolgt von der vorbehandelten Membran und dem Polyacrylamidgel. Auf dieses kamen dann fünf *Whatman 3 MM Papiere*, die im Kathodenpuffer eingeweicht waren. In diesem Stapel, der auf die Anodenplatte (V20-SDB, Techne AG) platziert wurde, kam es schließlich bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  zum Proteintransfer auf die Membran (1 h). Anschließend wurde die Membran in bei  $4^\circ\text{C}$  in Blockinglösung (5% Milchpulver in 1x TBST) geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und später die Antikörperbindung nur an spezifische Bindungsstellen zu ermöglichen. Nach dreimaligem Waschen in 1x TBST wurde die Membran mit dem ersten Antikörper in der jeweiligen Verdünnung mit 1x TBST auf einem Taumelmischer (NeoLab) für 1,5 h bei RT inkubiert. Daraufhin wurde erneut 3x 10 min mit 1x TBST gewaschen, bevor die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 1 h bei RT folgte. Nach erneutem Waschen (2x 5 min in 1% Milchpulver in 1x TBST, 2x 10 min in 1x TBST) konnte das nachzuweisende Protein mit dem Sekundärantikörper, der gegen Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, sichtbar gemacht werden.

Hierfür wurde die *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Methode angewandt. Die beiden Lösungen des *ECL Western Blotting Systems* (Pharmacia) wurden laut Herstellerangaben 1:1 gemischt, die Membran darin für 1 min inkubiert, in Klarsichtfolie eingeschlagen und ein *Hyperfilm ECL* (Millipore) für unterschiedlich lange Zeit aufgelegt. Dieser Film wurde mit einer *Curix 60*-Entwicklermaschine (AGFA) entwickelt.

#### 4.6.5 Membranpräparation

Da der  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal als transmembranäres Protein in der Zellmembran zu finden ist, wurde für dessen Gewinnung eine Membranpräparation durchgeführt. Ziel hierbei ist, die Zellmembranfraktion von der Zytosolfraktion zu trennen.

Die hydrophoben Anteile der Seifenmoleküle des Solubilisierungspuffers lagern sich an die hydrophoben Anteile des Zielproteins. Dabei werden die Phospholipide der Zellmembran verdrängt, bis schließlich das Protein einen Komplex mit dem Detergens eingeht und in Lösung geht.

Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Mörser und Pistill pulverisiert. Da Proteine nach der Zellyse sehr schnell gespalten werden, wurden alle Arbeitsschritte zügig bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt.

Pro 100 mg Gewebepulver folgte die Zugabe von 1 ml Membranpräppuffer plus Proteaseinhibitoren (*Protease Inhibitor Mixture* (Sigma)  $2 \mu\text{l/ml}$ , Phenylmethylsulfonylfluorid

PMSF (Fluka) 200 mM, Calpain Inhibitor I und II (Roche) je 8 µg/ml). Dieses Gemisch wurde mit Hilfe des Ultraturrax (*Polytron PT 1200*, Kinematica AG) auf Eis homogenisiert. Um größere Zellfragmente abzutrennen, wurde zentrifugiert (2x 5 min, 3600x g, 4°C). Der Überstand wurde im Beckmann-*Ti-60-Rotor* ultrazentrifugiert (30 min, 200 000x g, 4°C). Das Pellet wurde in 200 µl Solubilisierungspuffer mit einem Potter (*Typ RM4*, Janke Kunkel KG) resuspendiert. Durch einen zweiten Ultrazentrifugationsschritt (30 min, 200 000x g, 4°C) konnte nicht-lösliches Material abgetrennt werden. Im Überstand befanden sich die solubilisierten Membranproteine, diese konnten zunächst einer Proteinkonzentrationsbestimmung (4.6.2) unterzogen und danach bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

Membranpräppuffer (pH 7,4)		Solubilisierungspuffer (pH 7,4)		Waschpuffer (pH 7,4)	
EDTA	20 mM	EDTA	20 mM	NaCl	150 mM
EGTA	20 mM	EGTA	10 mM	Tris	10 mM
Tris	10 mM	Tris	10 mM	Triton-X-100	1%
NaCl	300 mM	Deoxycholat	1%		
Saccharose	75 mM				

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Generierung und Untersuchung der Ca<sub>v</sub>1.2<sup>SF</sup>-Mauslinie

#### 5.1.1 Gen-Targeting-Strategie

Die CaMKII-Phosphorylierungsstellen, die an der Fazilitierung beteiligt sein sollen, sind im Carboxyterminus der  $\alpha_1$ -Untereinheit des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals lokalisiert. Genauer beschrieben liegt das Codon für S1512 (TCT) in Exon 36, das Codon für S1570 (TCC) in Exon 38.

Das Targeting-Konstrukt (Targeting-Vektor) enthielt folgende Abschnitte:

- einen kurzen, 5'-gelegenen Arm
- eine Selektionskassette, die durch loxP-Sequenzen flankiert wird
- einen langen, 3'-gelegenen Arm, der die Mutationen trägt.

Es mussten bei der Strategie-Planung zunächst die begrenzenden Schnittstellen für kurzen und langen Arm festgelegt werden. Dabei wurden bevorzugt Restriktionsstellen in die Überlegungen einbezogen, die sowohl in den Armen als auch in der Selektionskassette des pBSloxP-NeoTK-loxP nicht vorkommen, um sie gerichtet an die gewünschte Stelle einzuführen. Schneidet ein Enzym mehrfach, kann es sein, dass bereits klonierte Fragmente in einem späteren Klonierungsschritt ungewollt wieder zerschnitten werden. Bei näherer Betrachtung der Restriktionskarte und der *multiple-cloning-site* (MCS) des pBluescript-Vektors wiesen die Restriktionsstellen NotI, BamHI, ClaI, XhoI und KpnI die gewünschten Kriterien auf. Diese Schnittstellen wurden dann als Begrenzung der jeweiligen Arme in der richtigen Reihenfolge (der MCS entsprechend) in den *CACNA1C*-Genabschnitt eingeführt, so dass bei der späteren Klonierung der einzelnen Abschnitte deren richtige Orientierung gewährleistet werden kann.

Auch die Länge der beiden Arme des Targeting-Vektors muss gut durchdacht sein. So muss beim 5'-Arm darauf geachtet werden, dass er eine Größe von 1-1,5 kb aufweist. Dies gewährleistet bei der späteren Screening-PCR nach dem Ersten Targeting ein gut amplifizierbares Produkt (Vorwärtsprimer liegt 5', Rückwärtsprimer liegt 3' des 5'-Armes). Ein solcher, relativ kurzer 5'-Arm muss mit einem möglichst großen (5-7 kb) 3'-Arm ergänzt werden, um eine erfolgreiche Homologe Rekombination des gesamten Targeting-Konstruktes zu erlauben. Je größer die Sequenzhomologie von Vektor zur genomischen DNS ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit der Rekombination am gewünschten Gen-Ort.

Dennoch ist das Ereignis der Homologen Rekombination an der richtigen Stelle relativ selten. Nur bei etwa 0,1-1% der transfizierten Zellen findet eine korrekte Insertion statt. Bei den

restlichen Zellen integriert das Targeting-Konstrukt entweder zufällig in das Genom, oder gar nicht. Um letztgenannten Anteil zu eliminieren, wurde in den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Targeting-Vektor eine Selektionskassette mit dem Resistenzgen *neo* eingebaut. Sie erlaubt eine Positivselektion während des Ersten Targetings. Zusätzlich enthält die Selektionskassette ein Gen, das für die Thymidinkinase codiert (*tk*). Über diesen Marker kann eine Negativselektion während des Zweiten Targetings erfolgen, bei dem die genannte Selektionskassette wieder entfernt wird. Diese Eliminierung der NeoTK-Kassette während des Zweiten Targetings wird durch zwei gleichgerichtete loxP-Sequenzen ermöglicht.

### 5.1.2 Konstruktion des Gen-Targeting-Vektors

Durch die Erstellung des Targeting-Vektors sollte die Grundlage für ein Gen-Targeting und die anschließenden *in vivo*-Untersuchungen geschaffen werden, die die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung der Serine S1512 und S1570 für die Fazilitierung des Kanals aufklären sollen.

Der Vektor sollte mit dem mutierten Genabschnitt, der die Exone 35-38 des *CACNA1C* umfasst, konstruiert werden. Die einzelnen Fragmente wurden in separaten Schritten hergestellt und nacheinander zusammengebaut.

Zunächst wurden sie mittels PCR aus genomischer ES-Zell-DNS amplifiziert. Über Primer wurden Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingeführt und die Fragmente zunächst in pBluescript II KS subkloniert. Auf diese Weise entstanden die Zwischenvektoren pBI(Not-BamH), pBI(Cla-Xho)S1512A und pBI(Xho-Kpn)S1570A. Deren korrekte Basenabfolge wurde mittels Sequenzanalyse überprüft, um ungewollte Mutationen auszuschließen, die bei der PCR möglicherweise entstanden sind.

Die beiden Mutationen S1512A und S1570A wurden mit Hilfe eines Mutagenesekits bzw. einer Overlap-PCR im jeweiligen Subvektor erzeugt und anschließend über Sequenzanalyse bestätigt.

Im letzten Konstruktionsschritt wurden die Stücke aus ihren Zwischenvektoren unter Zuhilfenahme der eingefügten Schnittstellen ausgeschnitten und in den finalen pBSloxP-NeoTK-loxP umkloniert.

#### 5.1.2.1 Klonierung des kurzen Armes (5'-Arm)

##### Zwischenvektor pBI(Not-BamH)

Für die Herstellung des kurzen Armes wurde zunächst ein Bereich in der genomischen *CACNA1C*-DNS ausgewählt, der im Endvektor 5' von der geflochtenen NeoTK-Kassette lokalisiert sein sollte. Dieser DNS-Abschnitt liegt zwischen nt 13194 und nt 14430 (siehe Anhang). Er musste mit den Schnittstellen für *NotI* und *BamHI* flankiert werden, mit deren

Hilfe dieser 5'-Arm in den Subvektor pBluescript ligiert werden sollte. Diese Schnittstellen wurden mit Hilfe einer PCR eingebracht, indem der Vorwärtsprimer *5'\_NotI\_for* die Sequenz für die Schnittstelle von *NotI*, der Rückwärtsprimer *5'\_BamHI\_rev* die Sequenz für die Schnittstelle von *BamHI* enthielt. Das PCR Produkt besaß somit die Schnittstellen *NotI* und *BamHI*. Im Anschluss an die PCR wurde dieses Produkt mit den beiden Enzymen *NotI* und *BamHI* verdaut und durch ein Agarosegel aufgereinigt. Das isolierte DNS-Fragment konnte schließlich in den zuvor präparierten Subvektor pBluescript ligiert werden und durch Sequenzanalyse (nicht gezeigt) bestätigt werden.

Die erläuterte Strategie ist in Abbildung 5-1 schematisch dargestellt.

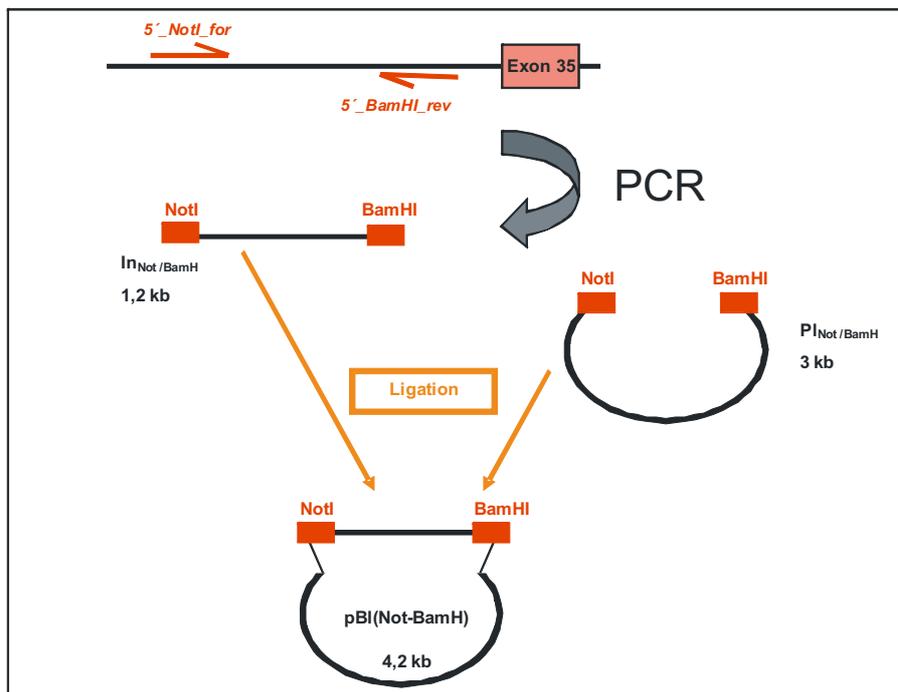


Abbildung 5-1 Strategie zur Herstellung des 5'-Arms. (Erklärung siehe Text)

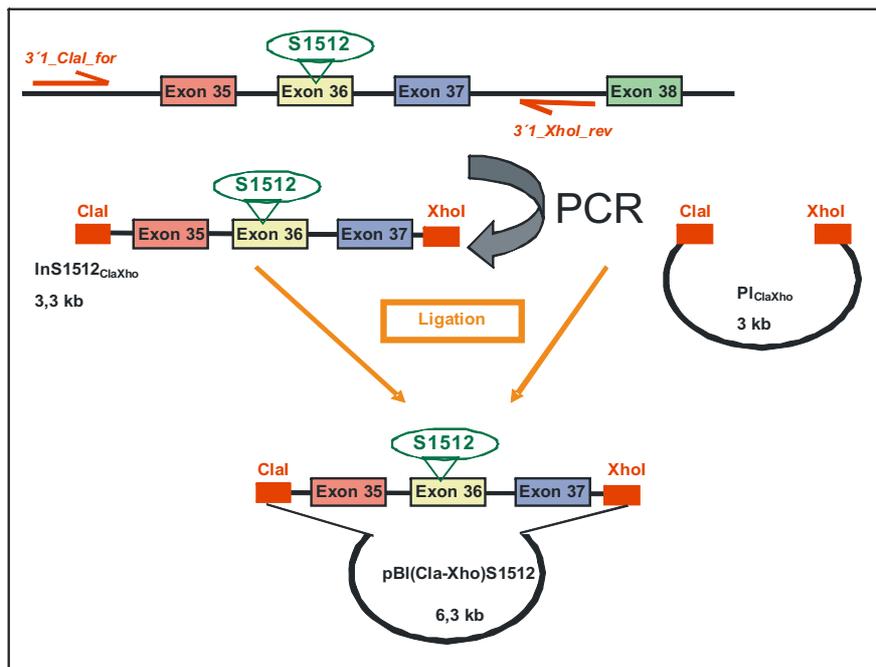
### 5.1.2.2 Klonierung des langen Armes (3'-Arm)

Die Klonierung des 3'-Arms erfolgte in mehreren Schritten. Da der 3'-Arm sehr lang ist (6,7 kb) wurde er in zwei Teilen amplifiziert und diese Stücke separat subkloniert. Somit konnten auch die beiden Mutationen getrennt voneinander generiert werden.

#### Zwischenvektor pBI(Cla-Xho)S1512A

Zuerst galt es, die Schnittstellen, mit Hilfe derer das DNS Stück kloniert werden sollte, zu bestimmen. So waren es *ClaI* und *XhoI*, die als die für die Subklonierung relevanten Schnittstellen ausgewählt wurden. In pBluescript sind beide in der MCS vorhanden (Abbildung 4-1). Der Bereich um das S1512 besitzt jedoch keine dieser beiden Schnittstellen.

Deshalb wurde eine PCR, bei der der Vorwärtsprimer *3'1\_ClaI\_for* die Schnittsequenz für die Endonuklease *ClaI*, der Rückwärtsprimer *3'1\_XhoI\_rev* die Schnittsequenz für *XhoI* codierte, durchgeführt. Das durch diese PCR amplifizierte DNS-Fragment besaß neben S1512 in Exon 36 die Exone 35 und 37, sowie die Schnittstellen *ClaI* (am 5'-Ende) und *XhoI* (am 3'-Ende). Diese Schnittstellen stimmten im Hinblick auf Orientierung mit denen in pBluescript überein, sodass ein korrekter Einbau des Inserts in pBluescript gewährleistet werden konnte. Für die Generierung der Mutation S1512A fand das *QuickChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) Verwendung. Hierfür wurden die Primer *OL\_S1512A\_for* und *OL\_S1512A\_rev* entworfen. Diese sind komplementär zu einem Bereich (nt 16321-16343) um das S1512 und enthalten an Stelle nt 16326 kein Thymin sondern ein Guanin. Das dadurch hervorgegangene modifizierte Plasmid wurde auf Vorhandensein der gewünschten Punktmutation T/G untersucht und letztlich bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die beschriebene Strategie ist in Abbildung 5-2 in einer schematischen Darstellung noch einmal zusammengefasst.



Fortsetzung nächste Seite

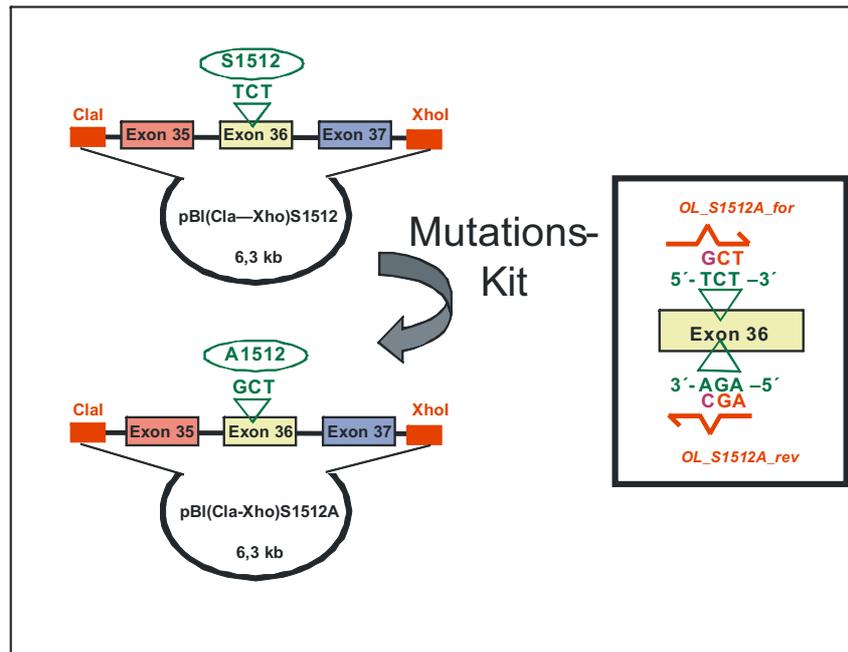


Abbildung 5-2 Strategie zur Herstellung des (Cla-Xho)-Teiles des 3'-Armes. (Erklärung siehe Text)

### Zwischenvektor pBI(Xho-Kpn)S1570A

Analog zur Herstellung des [Cla/Xho]S1512A-Teiles des 3'-Armes wurde auch bei der Herstellung des zweiten Teiles des 3'-Armes ein 3443 bp großes DNS-Stück, welches das Codon für S1570 enthielt, in pBluescript subkloniert. Erst dort wurde mit Hilfe einer Overlap-PCR die Sequenz an der Stelle nt 19055 im *CACNA1C* so verändert, dass die neu entstandene Basenabfolge für Alanin codierte.

Für die Klonierung des ersten Subvektors wurden die Schnittstellen XhoI und KpnI ausgewählt. Es wurden auch hier diese beiden Schnittstellen ins *CACNA1C*-Genom durch PCR eingefügt. Die dafür verwendeten Primer waren *3'2\_XhoI\_for* und *3'2\_KpnI\_rev*. Das so erzeugte, 3443 bp große DNS-Fragment besaß das Exon 38 und die darin gelegene Sequenz TCC für S1570 sowie eine XhoI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine KpnI-Schnittstelle am 3'-Ende. Ein Vergleich der Lage der beiden Schnittstellen mit denen in pBluescript ließ darauf schließen, dass das [Xho/Kpn]-Stück in der richtigen Orientierung inkloniert werden konnte.

Ziel in diesem Schritt war, das S1570 zu Alanin zu mutieren. Dazu wurde an der Stelle nt 19055 das Thymin des Serin-Codons TCC gegen Guanin ausgetauscht. Dieser Basenaustausch erfolgte mit Hilfe einer Overlap-PCR, bei welcher der hergestellte Subvektor pBI(Xho-Kpn)S1512 als Matrizen-DNS verwendet wurde. Das Produkt dieser Overlap-PCR wurde anschließend erneut subkloniert, der daraus entstandene Subvektor pBI(Xho-Kpn)S1570A trug die modifizierte Sequenz GCC in Exon 38, die für A1570 codierte (durch Sequenzanalyse bestätigt, Daten nicht gezeigt).

Die erläuterte Strategie ist in Abbildung 5-3 in übersichtlicher Art dargestellt.

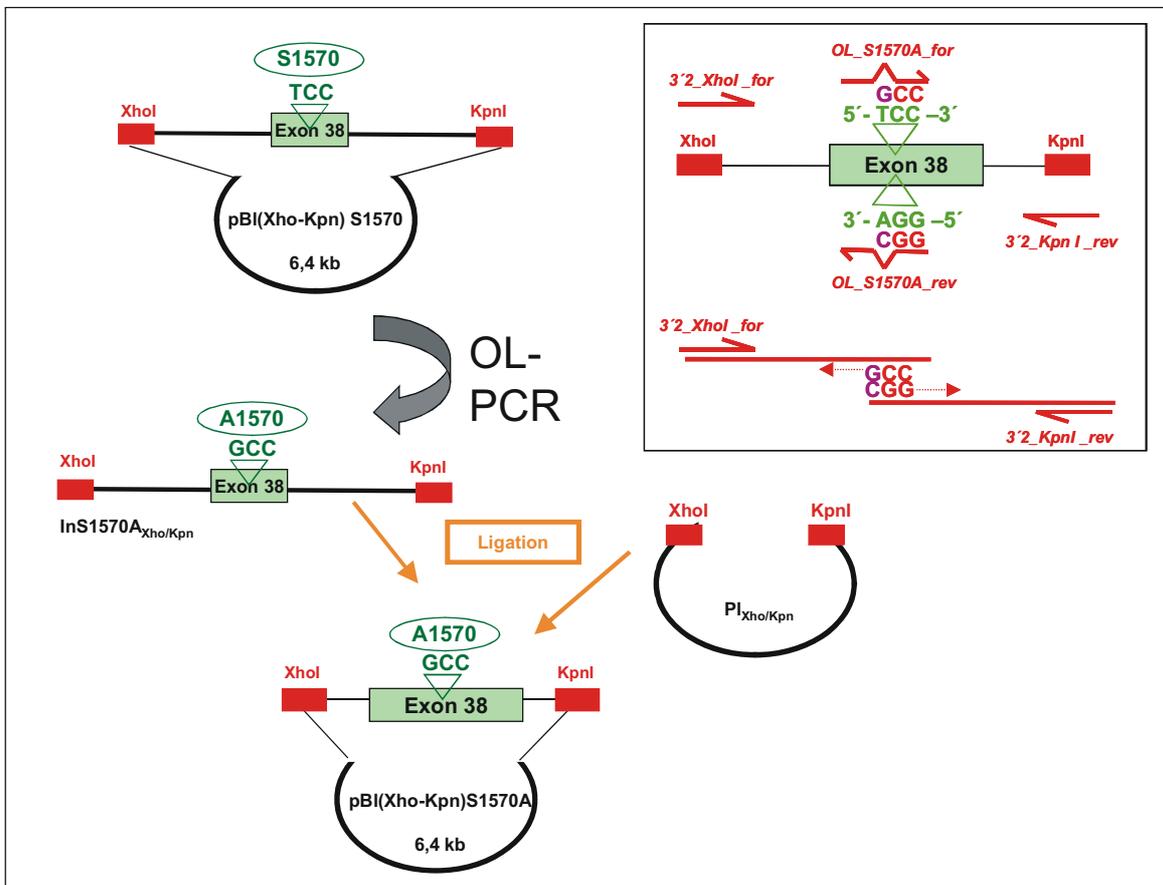
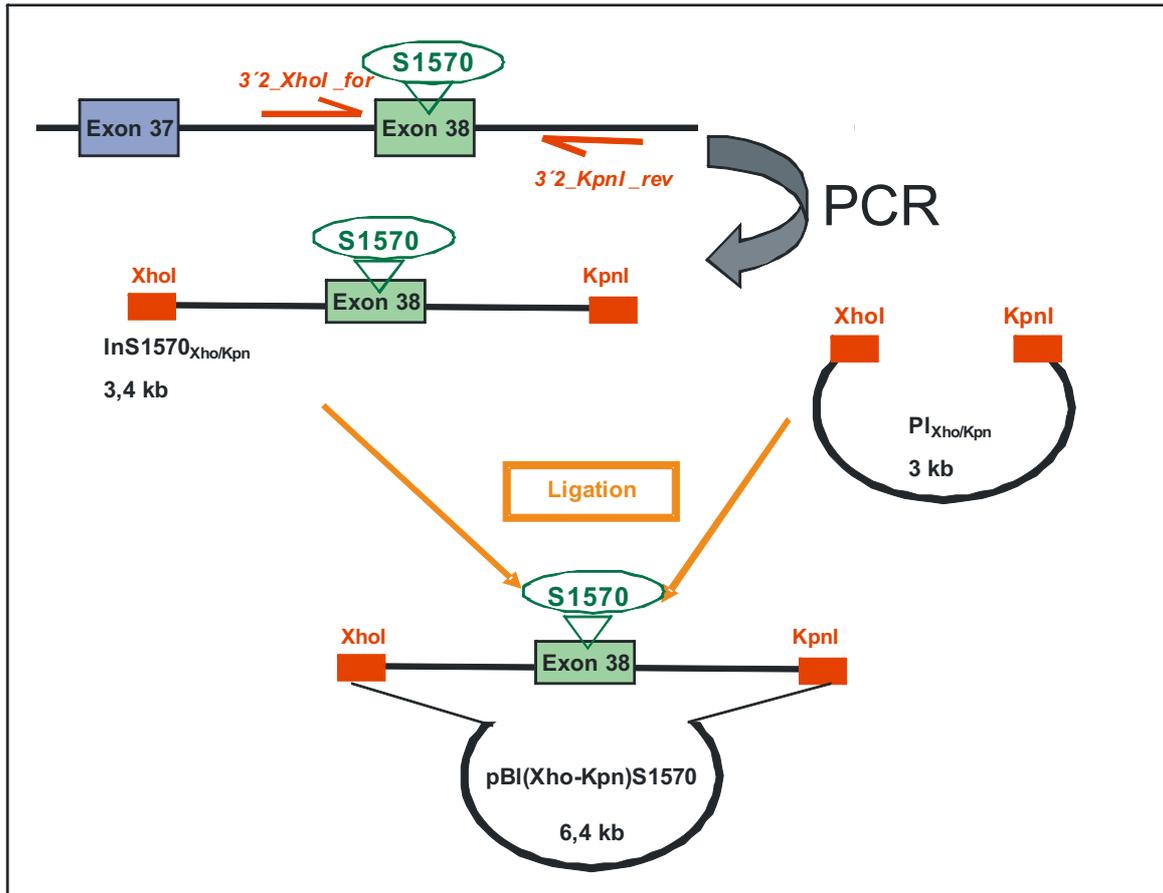


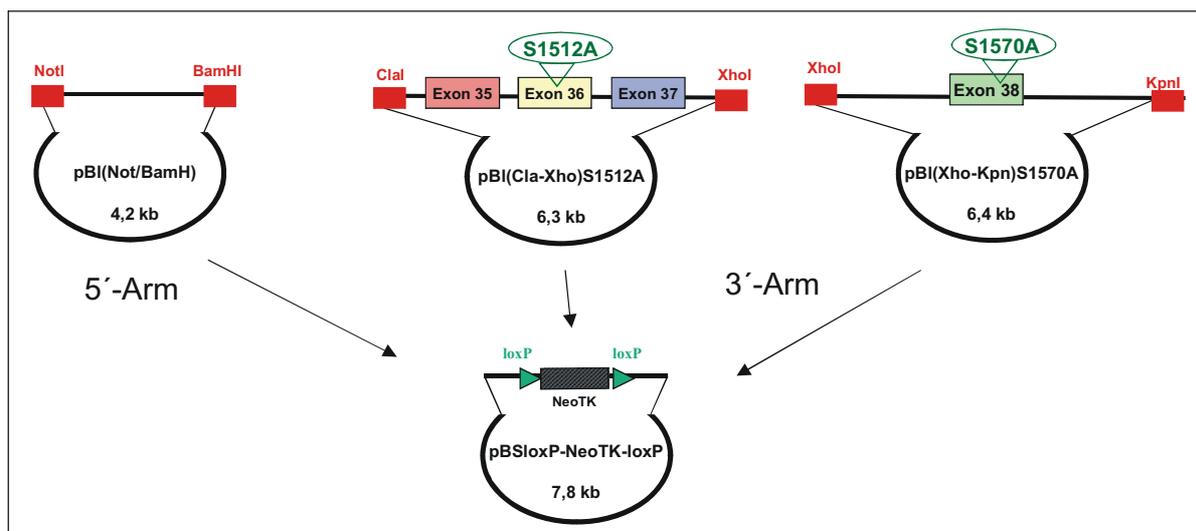
Abbildung 5-3 Strategie zur Herstellung des (Xho-Kpn)-Teiles des 3'-Armes. (Erklärung siehe Text)

### 5.1.2.3 Umklonierung und Fertigstellung des finalen Gen-Targeting-Vektors

Für die endgültige Konstruktion des Gen-Targeting Vektors sollten die bisher subklonierten DNS-Abschnitte der *CACNA1C*-Sequenz in das finale Vektorrückgrat pBSloxP-NeoTK-loxP kloniert werden, dessen Sequenz eine 4,8 kb große, gefloxt NeoTK-Resistenzkassette enthält.

Der in pBI(Not/Bam) subklonierte DNS-Abschnitt sollte in den von der NeoTK-Kassette 5'-gelegenen Bereich eingebaut werden. Dagegen sollten die beiden veränderten DNS-Abschnitte in die von der NeoTK-Kassette 3'-gelegenen Richtung kloniert werden. Dabei stoßen diese beiden Teil-Sequenzen nahtlos im Endvektor aneinander, sodass letztendlich der 3'-Arm des Gen-Targeting Vektors aus einem  $Ca_v1.2$ -Bereich besteht, der nt 14433 - nt 21139 der Wildtyp-Sequenz umfasst, aber nicht mehr die Codons für S1512 und S1570, sondern für A1512 und A1570 enthält.

Abbildung 5-4 bzw. Abbildung 5-5 zeigen den Verlauf der Konstruktion bzw. die Zusammensetzung des Endvektors pBI-lox-NeoTK-Not/Bam-S1512/1570A.



**Abbildung 5-4 Schematische Zusammenfassung der Subvektoren, welche die verschiedenen Arme des Targeting-Konstruktes enthalten.**

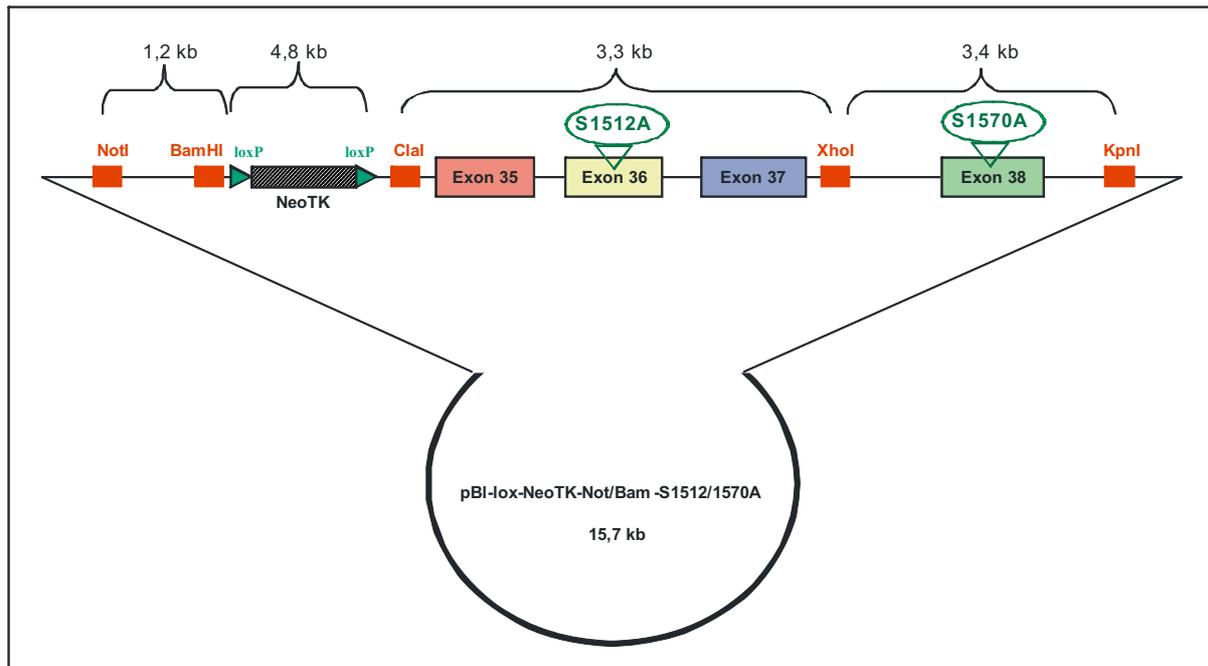


Abbildung 5-5 Darstellung des Gen-Targeting-Vektors *pBI-lox-NeoTK-Not/Bam-S1512/1570A*

#### 5.1.2.4 Überprüfung des finalen Gen-Targeting-Vektors

##### Restriktions-Check

Mit dieser Reihe an Restriktionsspaltungen konnte gezeigt werden, dass der Endvektor alle klonierten Insertfragmente auch tatsächlich enthält und dass diese auch in der richtigen Reihenfolge vorlagen.

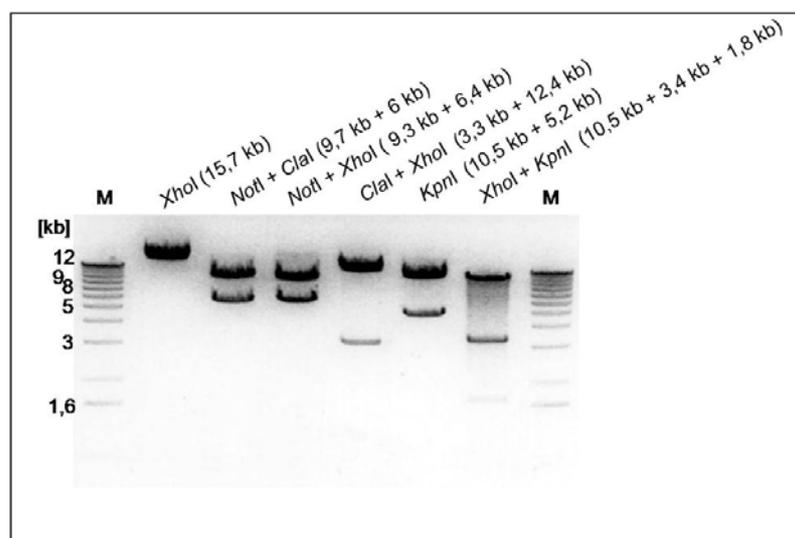


Abbildung 5-6 Agarose-Checkgel (0,7%). Zur Bestätigung des rekombinanten Plasmids wurden mehrere Verdauansätze mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen hergestellt.

**Sequenz-Check**

Anschließend wurde die Sequenz der Exone 35 bis 38 auf ihre Richtigkeit überprüft. Dabei wurden die beiden eingeführten Punktmutationen in den Exonen 36 und 38 identifiziert. Zudem wurde auch sichergestellt, dass ein ca. 80 bp großer Abschnitt vor dem jeweiligen Exon keine Punktmutation enthält, da diese Sequenz für korrektes Spleißen verantwortlich ist.

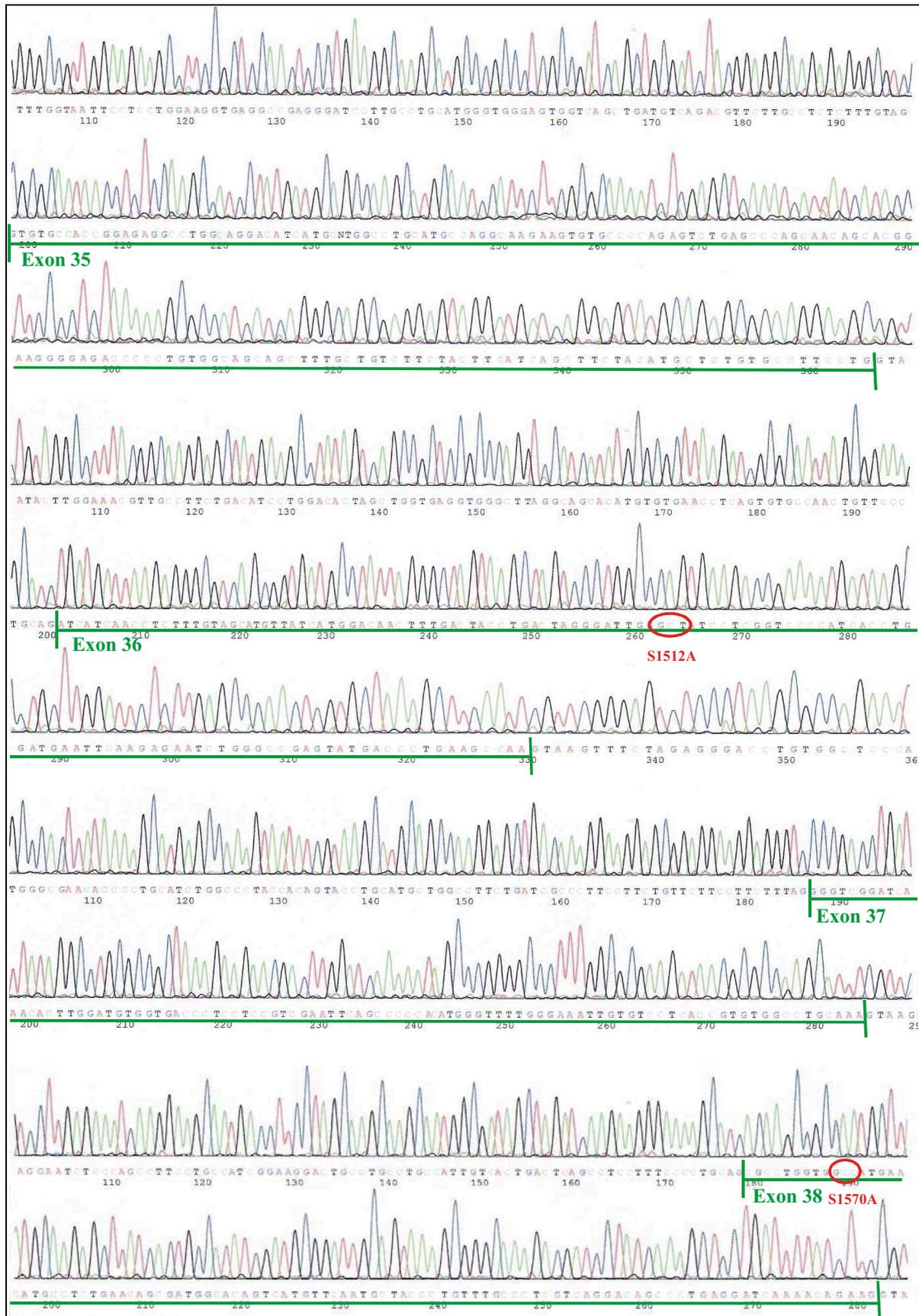


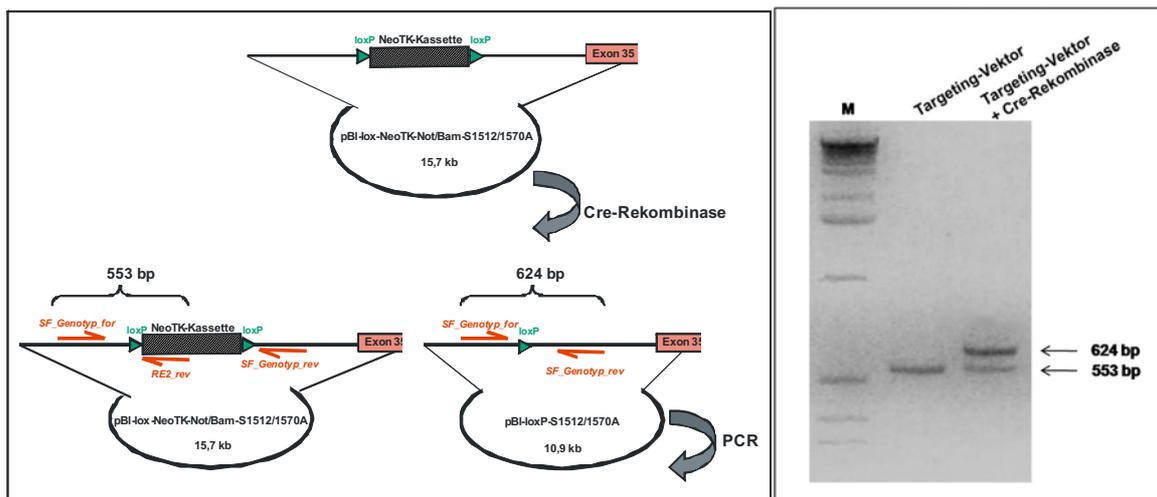
Abbildung 5-7 Sequenz der Exone 35 bis 38 und der jeweilige Bereich ca. 80 bp vor dem jeweiligen Exon. Die modifizierten Codons für A1512 und A1570 sind rot umkreist.

## Funktionsüberprüfung der loxP-Sequenzen

Der nun hergestellte Gen-Targeting Vektor besteht aus einem modifizierten Ca<sub>v</sub>1.2-Abschnitt und einer Resistenzkassette. Um diese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* entfernen zu können, wurde sie von zwei loxP-Sequenzen flankiert.

Für eine *in vitro*-Funktionsüberprüfung der Cre-vermittelten Rekombination dieser loxP-Sequenzen, wurde der Vektor zunächst mit *Cre-Rekombinase* (NEB) inkubiert. Dabei sollte die NeoTK-Kassette eliminiert werden. Mit Hilfe der Primerkombination *SF\_Genotyp\_for* + *SF\_Genotyp\_rev* wurde die Amplifizierung eines Fragmentes der Größe 624 bp erwartet. Wie im Gelbild in Abbildung 5-8, rechts erkennbar ist, entstand in dem *Cre-Rekombinase*-Ansatz auch dieses 624 bp große Fragment. Daraus konnte man schließen, dass die Funktionalität der loxP-Sequenzen gegeben war.

Als Kontrolle wurde unbehandelter Targeting-Vektor als DNS-Matrize in den PCR-Ansatz eingesetzt. Durch die Primer *SF\_Genotyp\_for* + *RE2\_rev* wurde ein 553 bp großes Fragment amplifiziert (Abbildung 5-8, rechts, linke Spur).



**Abbildung 5-8** Funktionalitätstest der loxP-Stellen im Gen-Targeting-Vektor. links: Vorgehensweise: sind die loxP-Sequenzen in Ordnung, dann entsteht durch die 3-Primer-Kombination ein 624 bp großes Fragment, beim Gen-Targeting-Vektor ergibt diese Kombination ein 553 bp großes Fragment. rechts: Agarosegel des Cre-Rekombinationstests

### 5.1.3 Primäres Zell-Targeting (Erstes Targeting)

Beim Ersten Targeting wurden 40 µg des zuvor mit *NotI* linearisierten Vektors in R1 ES-Zellen der Passage 15 elektroporiert. 24 h später begann die Selektion in G418-haltigem ES-Medium. Nach 4 Tagen war massives Zellsterben erkenntlich. Ab dem siebten Tag nach Elektroporation wurden insgesamt 685 Klone an 4 Tagen isoliert, die alle anschließend dem Screening unterzogen wurden.

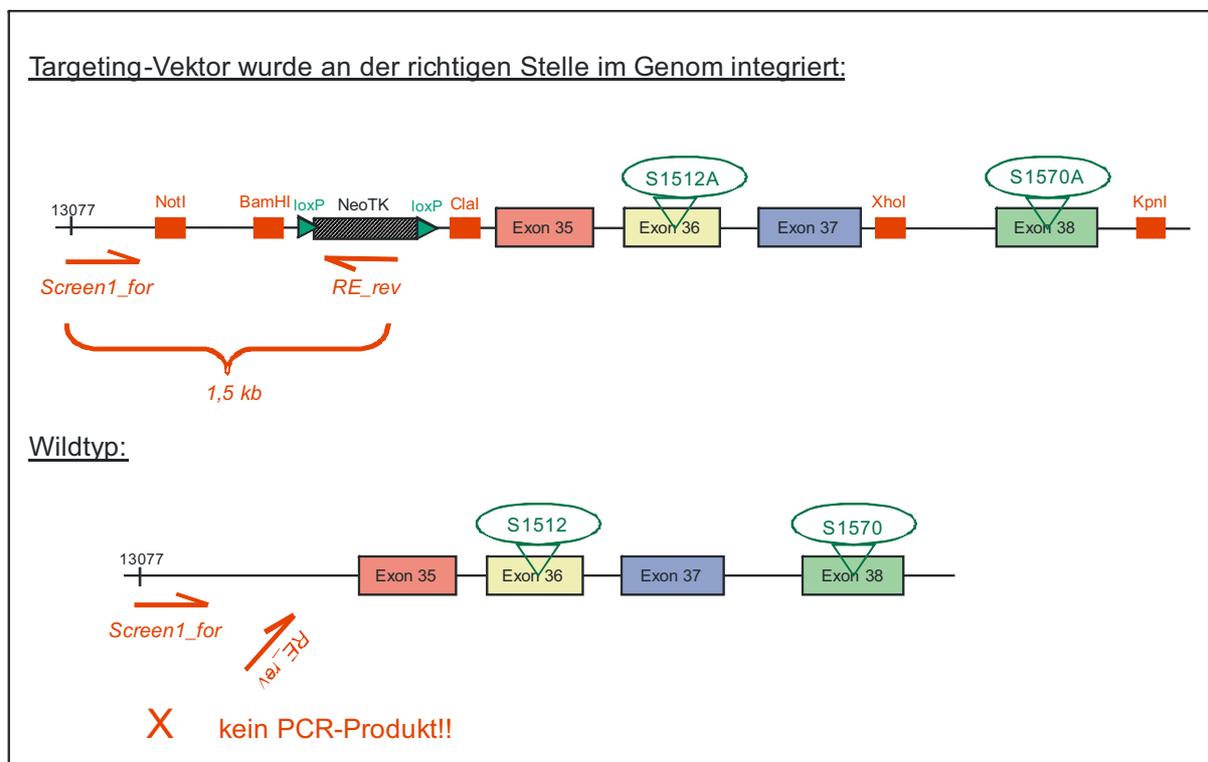
### 5.1.3.1 Nachweis der Homologen Rekombination

Durch den Einsatz von G418 überleben lediglich die ES-Klone, die das Neomycin-Resistenzgen in ihrem Genom tragen, die NeoTK-Kassette also integriert haben. Beim Screening erfolgt dann die Suche nach den Klonen, bei denen die Homologe Rekombination an der richtigen Stelle stattgefunden hat und nicht irgendwo zufällig im Genom erfolgt ist. Dies kann mit zweierlei Methoden erfolgen: mittels PCR und mittels Southern-Blot.

#### Screening mittels PCR

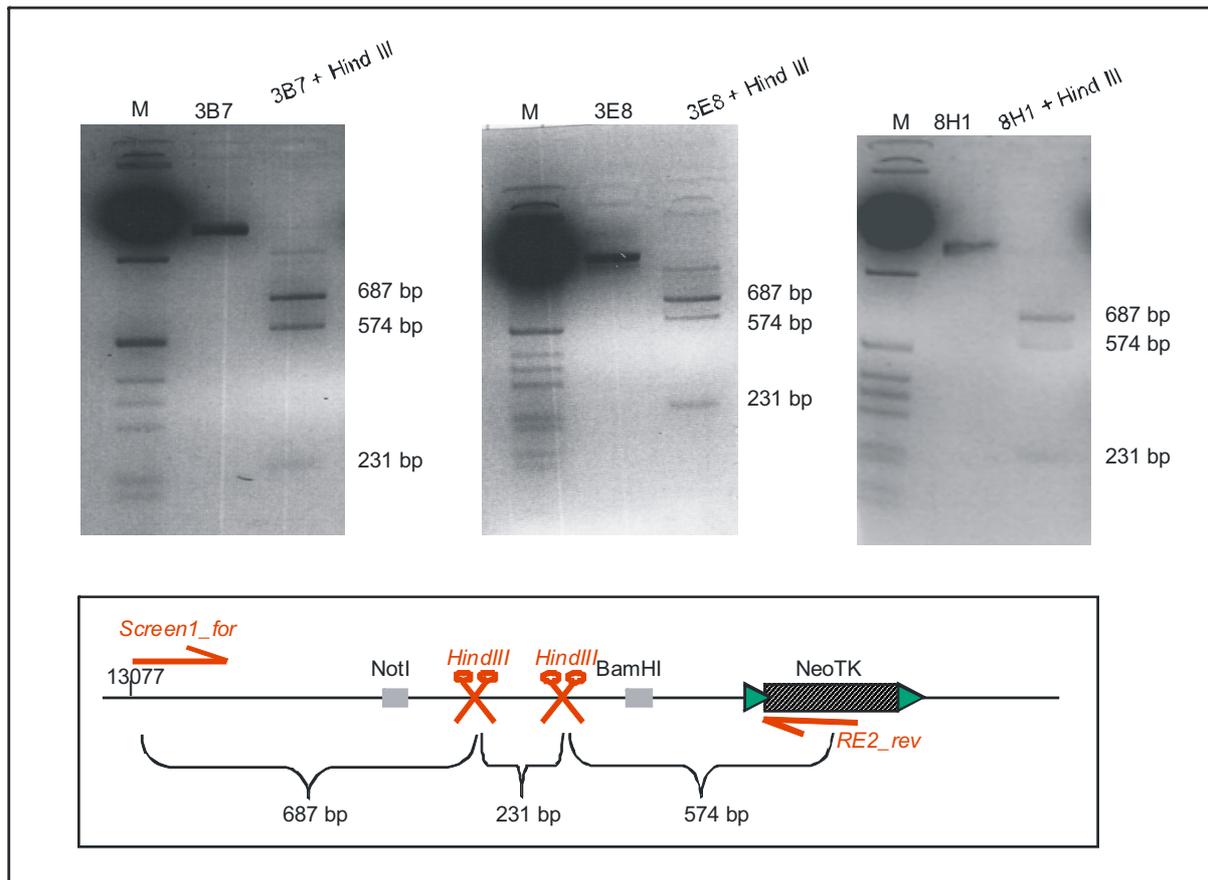
Will man eine Screening-PCR etablieren, so ist darauf zu achten, dass Vorwärts- und Rückwärtsprimer richtig platziert werden. Der Vorwärtsprimer sollte zu einem DNS-Bereich homolog sein, der außerhalb des rekombinanten Ortes, also 5' vor dem 5'-Arm liegt. Der Rückwärtsprimer soll an einen Bereich binden, der ausschließlich auf dem Targeting-Vektor lokalisiert ist, also z.B. der NeoTK-Kassette, die im Wildtyp-Allel nicht zu finden ist.

Hat die Vektor-DNS an der richtigen Stelle integriert, dann erhält man mit der Primerkombination *Screen1\_for* und *RE2\_rev* ein Amplifikat der Größe von 1,5 kb. Von denjenigen Klonen, bei denen die Integration an anderer Stelle, also zufällig erfolgt ist, kann mit dieser Primerkombination kein Produkt entstehen.



**Abbildung 5-9 Strategie des PCR-Screenings.** Hat die Vektor-DNS an der richtigen Stelle im ES-Zell-Genom integriert, dann entsteht ein 1,5 kb großes Fragment (oben); beim Wildtyp kann mit dieser Primerkombination kein Produkt entstehen (unten).

Alle 685 isolierten Klone wurden zunächst mit der Screening-PCR-Methode untersucht. Es konnte auf diese Weise bei drei dieser Klone ein Produkt der gewünschten Größe vermerkt werden (siehe Abbildung 5-10). Dieses Produkt konnte mittels Restriktionsverdau bestätigt werden; durch *HindIII* wird das Fragment in 3 Stücke gespalten, was die Banden auf den Gelbildern jedes Klons widerspiegeln (Abbildung 5-10).



**Abbildung 5-10 Ergebnis nach dem PCR-Screening.** Bei 3 der 685 untersuchten Klone konnte eine Bande auf der erwarteten Höhe vermerkt werden. Durch Zerschneiden des PCR-Produkts mit dem Restriktionsenzym *HindIII* entstanden die drei Fragmente mit den errechneten Größen.

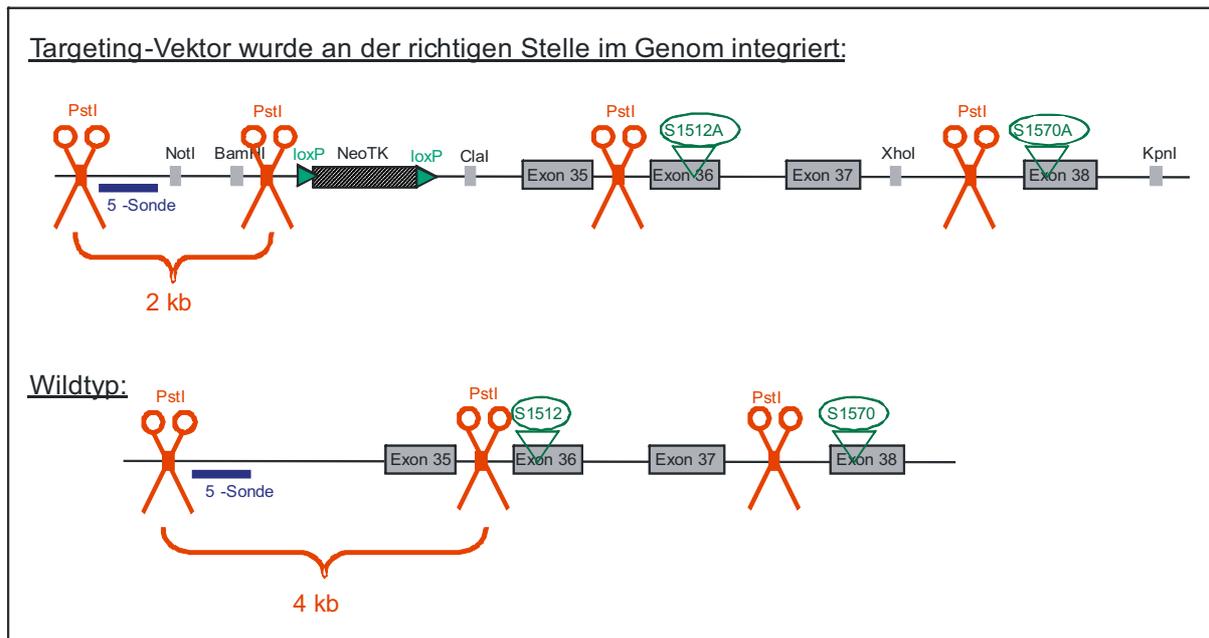
### Screening mittels Southern-Blot

#### 5'-Sonde

Bei der Screening Methode mittels Southern-Blot beruht der Nachweis darauf, dass durch Restriktionsverdau von Wildtyp-DNS ein Fragment bestimmter Größe entsteht. Durch den Targeting-Vektor werden zusätzliche Restriktionssequenzen an den Genort gebracht, so dass sich bei richtiger Integration die Größe des Restriktionsproduktes ändert. Die Größe des entstandenen Fragmentes gilt es schließlich mit Hilfe einer radioaktiv markierten Sonde nachzuweisen.

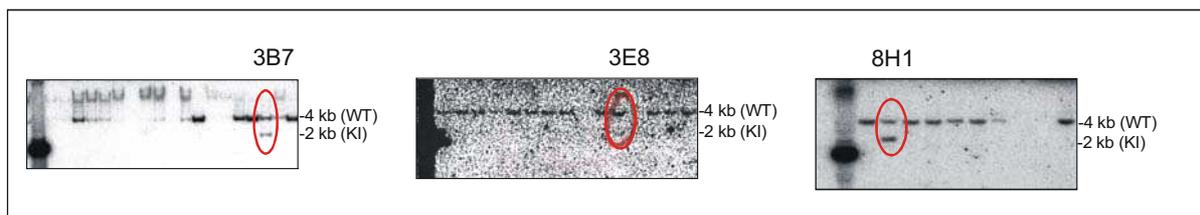
Bei der Wahl der Schnittstellen ist darauf zu achten, dass eine außerhalb, die andere innerhalb des rekombinanten Bereiches liegt, denn nur so kann eine Aussage darüber gemacht werden, ob die Integration auch an richtiger Stelle stattgefunden hat. Es wurde hier die Wahl für die Restriktionsendonuklease *PstI* getroffen.

Die verwendete 5'-Sonde hatte eine Größe von 439 bp und wurde mittels *Hifi*-PCR (4.3.9.1) aus genomischer DNS amplifiziert und in pBluescript ligiert. Aus diesem wurde sie kurz vor Gebrauch mit *XhoI* und *KpnI* herausgeschnitten und in den *Labeling*-Ansatz (4.3.10) eingesetzt.



**Abbildung 5-11 Strategie des Southern-Screenings.** Durch Zerschneiden der ES-Zell-DNS mit dem Restriktionsenzym *PstI* entstehen von knock-in- und Wildtyp-Allel Fragmente unterschiedlicher Größe, welche durch die radioaktiv-markierte Sonde identifiziert werden.

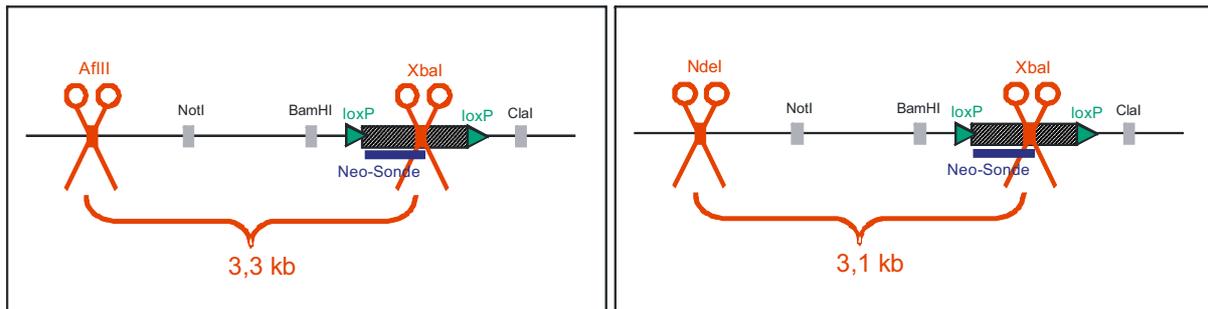
Von den schon durch PCR als positiv identifizierten ES-Zell-Klonen zeigten diese auch beim Southern-Blot ein positives Signal, die 2 kb große knock-in-Bande. Da Homologe Rekombination nur bei einem Allel auftritt, ist auch stets das Wildtyp-Allel vorhanden, was das Erscheinen der Wildtyp-Bande (4 kb) erklärt.



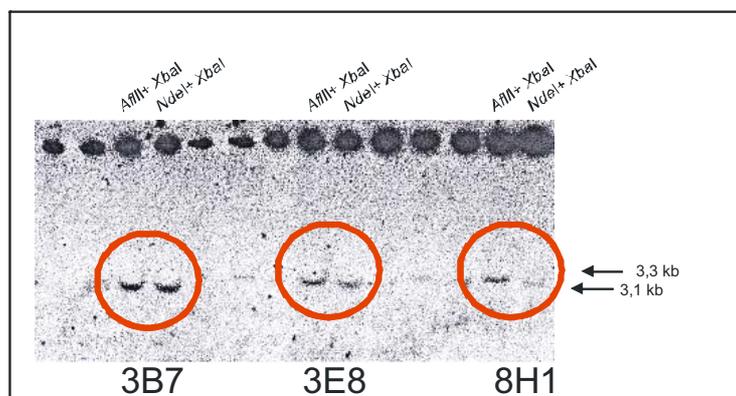
**Abbildung 5-12 Ergebnis nach dem Southern-Screening.** Durch das Erscheinen der 2 kb großen knock-in-Bande werden die schon beim PCR-Screening als positiv identifizierten Klone zusätzlich durch den Southern-Blot bestätigt.

### Neo-Sonde

Um auszuschließen, dass der Targeting-Vektor mehrfach ins Genom integriert hat, wurden die positiven Klone zusätzlich mit der Neo-Sonde hybridisiert. Die ES-Zell-DNS wurde mit *Xba*I und *Af*III bzw. *Xba*I und *Nde*I zerschnitten. Das dadurch entstandene Fragment sollte eine Größe von 3,3 kb bzw. 3,1 kb aufzeigen (Abbildung 5-13) und bei nur einmaliger Integration als einzige Bande auf dem Blot zu erkennen sein, was auch der Blot in Abbildung 5-14 zeigt.



**Abbildung 5-13 Strategie des Neo-Southern-Blots.** Die ES-Zell-DNS wird mit den Enzymkombinationen *Af*III+*Xba*I bzw. *Nde*I+*Xba*I zerschnitten und die daraus entstandenen Fragmente mit der Neo-Sonde, die an die Neo-Kassette bindet, visualisiert.

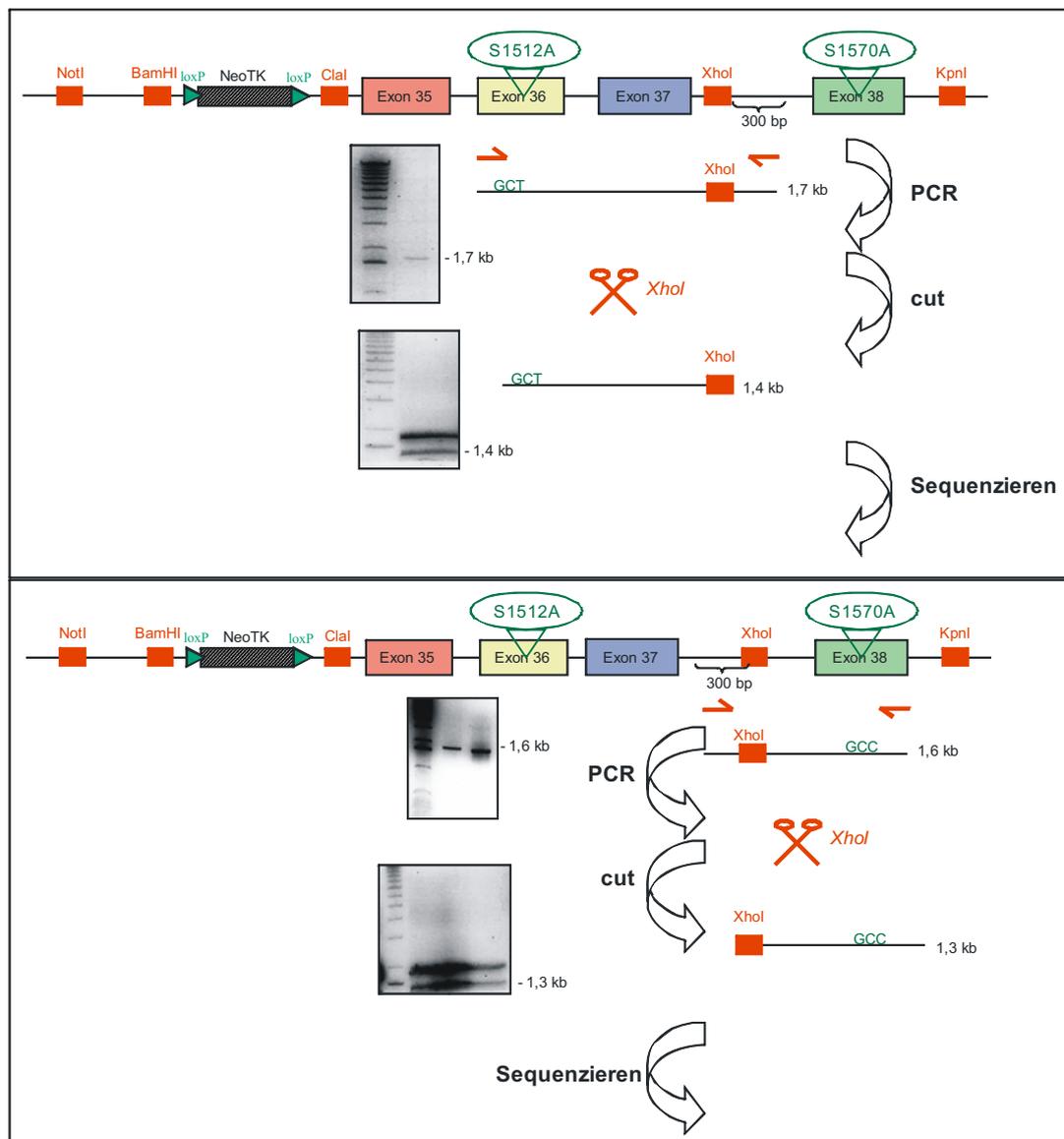


**Abbildung 5-14 Ergebnis des Neo-Southern-Blots.** Das Erscheinen von nur einer einzigen Bande pro Klon und Ansatz bestätigt die Tatsache, dass das Targeting-Konstrukt nur einmal in die ES-Zell-DNS integriert hat.

#### 5.1.3.2 Sequenzanalyse der positiven ES-Zell-Klone

Um letztlich sicherzugehen, dass die als positiv identifizierten Klone auch die Mutationen enthalten, wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt. Zunächst musste das knock-in-Allel vom Wildtyp-Allel getrennt werden, um ein überlappendes Signal zu vermeiden. Die Strategie (Abbildung 5-15) wurde folgendermaßen gewählt: Zunächst wurde mit der Primerkombination *KI\_S1512A\_for* und *KI\_S1512A\_rev* bzw. *KI\_S1570A\_for* und *KI\_S1570A\_rev* ein Bereich gemäß *Taq*-Standard-PCR-Protokoll amplifiziert, der die

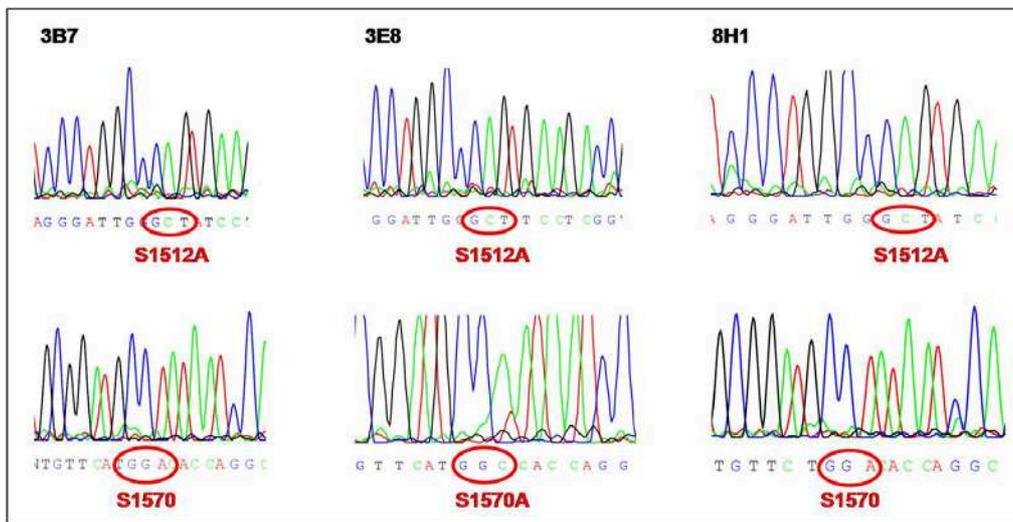
jeweilige Mutation einschließlich der vom Targeting-Vektor stammenden *Xho*I-Schnittstelle enthielt. Verdaute man nun das jeweilige PCR-Produkt mit *Xho*I, dann wurde nur das knock-in-Allel geschnitten, da nur dieses auch die Schnittstelle besitzt. Auf diese Weise konnten Wildtyp- und knock-in-Allel voneinander unterschieden werden. Das geschnittene PCR-Produkt (1,4 kb bzw. 1,3 kb) wurde durch ein präparatives Agarosegel aufgereinigt, eluiert und schließlich sequenziert.



**Abbildung 5-15 Strategie zur Sequenzanalyse.** Die vom Targeting-Vektor stammende Restriktionsschnittstelle *Xho*I macht man sich hier zunutze. Nur das vom knock-in-Allel amplifizierte PCR-Produkt wird zerschnitten und kann dadurch identifiziert, isoliert und letztendlich sequenziert werden.

Die Sequenzanalyse (siehe Abbildung 5-16) (mit den Primern *KI\_S1512A\_for* bzw. *KI\_S1570A\_rev*) ergab, dass bei Klon 3E8 sowohl das ursprüngliche Codon für S1512 als auch das für S1570 mutiert vorlagen und nun für Alanin codierten. Die Klone 3B7 und 8H1

wiesen die Mutation für S1512A auf, besaßen aber noch die ursprüngliche Sequenz für S1570.



**Abbildung 5-16 Sequenzen der als positiv gescreenten Klone.** Zwei der drei Klone tragen die Mutation an Stelle 1512 und an Stelle 1570 das ursprüngliche Codon für Serin TCC. Der Klon 3E8 enthält beide Mutationen. Bei den Sequenzen über die Stelle 1570 ist zu beachten, dass der verwendete Primer (KI\_1570\_rev) ein Rückwärtsprimer ist, hier das Codon für S1570 (TCC) bzw. für A1570 (GCC) revers komplementär dargestellt ist.

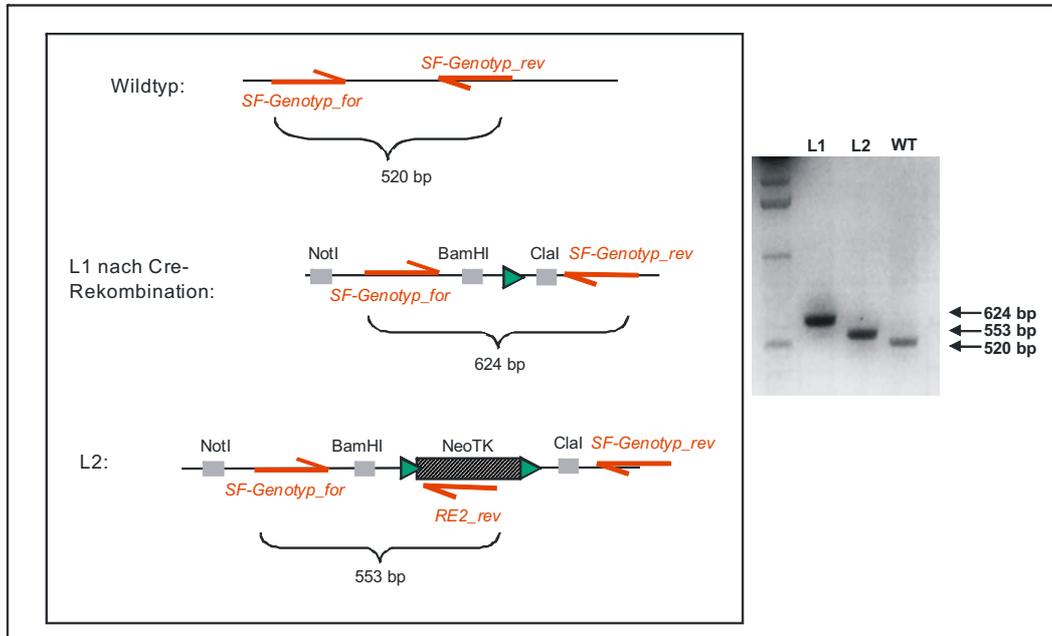
### 5.1.4 Sekundäres Targeting (Zweites Targeting)

Mit allen drei als positiv gescreenten Klonen wurde das Zweite Targeting durchgeführt. Bei diesem Schritt wurden 40 µg des Plasmids pIC-Cre, der die Cre-Rekombinase exprimiert, in ES-Zellen, die sich in Passage 21 befanden, elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen auf insgesamt 6 Petrischalen verteilt und nach 48 bzw. 72 h mit der Negativselektion in ganciclovirhaltigem Medium begonnen. Ganciclovir ist für solche Zellen toxisch, die das Thymidinkinasegen enthalten, bei denen also die Cre-Rekombination nicht stattgefunden hatte, die NeoTK-Kassette also noch integriert war. Am Tag 9 nach pIC-Cre Elektroporation wurde mit dem Picken der Klone begonnen. An 2 Tagen sind insgesamt 100 Klone isoliert und anschließend, wie unter 4.4.3.6 beschrieben, verarbeitet worden.

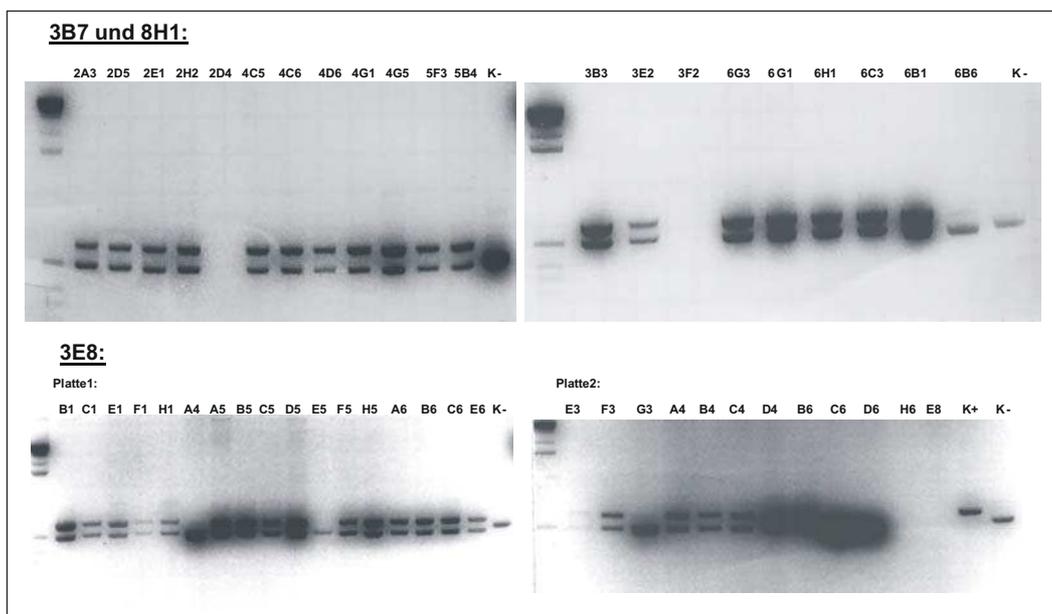
#### 5.1.4.1 Screening

Das Screening erfolgte auch nach dem Zweiten Targeting mittels PCR-Analyse. Hierbei sollte durch eine 3-Primer-PCR die Cre-Rekombination und somit das Eliminieren der NeoTK-Kassette nachgewiesen werden. Durch die Primerkombination *SF-Genotyp\_for* und *SF-Genotyp\_rev* entsteht aus dem Wildtyp-Allel ein 520 bp großes Fragment, aus dem

knock-in-Allel ein 624 bp großes Produkt. Wäre die NeoTK-Kassette noch im Genom integriert, dann würde dieses Produkt nicht entstehen, stattdessen ergäbe die Primerpaarung *SF-Genotyp\_for* und *RE2\_rev* ein 553 bp großes Fragment (Abbildung 5-17). Alle Doppelbanden bei 520/624 bp in Abbildung 5-18 deuten folglich auf positive Klone hin.



**Abbildung 5-17 Strategie des PCR-Screenings nach dem Zweiten Targeting.** Je nach Genotyp erhält man mit dieser 3-Primer-PCR Produkte definierter Größe, die in einem Agarosegel gut voneinander zu unterscheiden sind (rechts).



**Abbildung 5-18 Ergebnis der Screening-PCR nach dem Zweiten Targeting.** Alle Klone, die auf dem Gel die Doppelbande 520/624 bp aufweisen, werden als positiv angesehen. Negativkontrolle(K-): Targeting-Vektor; Positivkontrolle (K+): in-vitro-Cre-Rekombinase-Ansatz.

Alle hier als positiv gescreenten Klone wurden bis auf eine 6-well-Fläche hochgezogen und anschließend als Gefrierkulturen in flüssigem Stickstoff bis zur Blastozysteninjektion gelagert.

### 5.1.5 Blastozysteninjektion

Aus dem Zweiten Targeting des primären Klons 3E8 wurden letztlich 14 unterschiedliche ES-Zellklone an insgesamt 15 Tagen injiziert. Die genaue Anzahl der Blastozysten, deren Passagenummer (P) zum Zeitpunkt der Injektion, der Nachkommen und letztendlich der Chimären sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst.

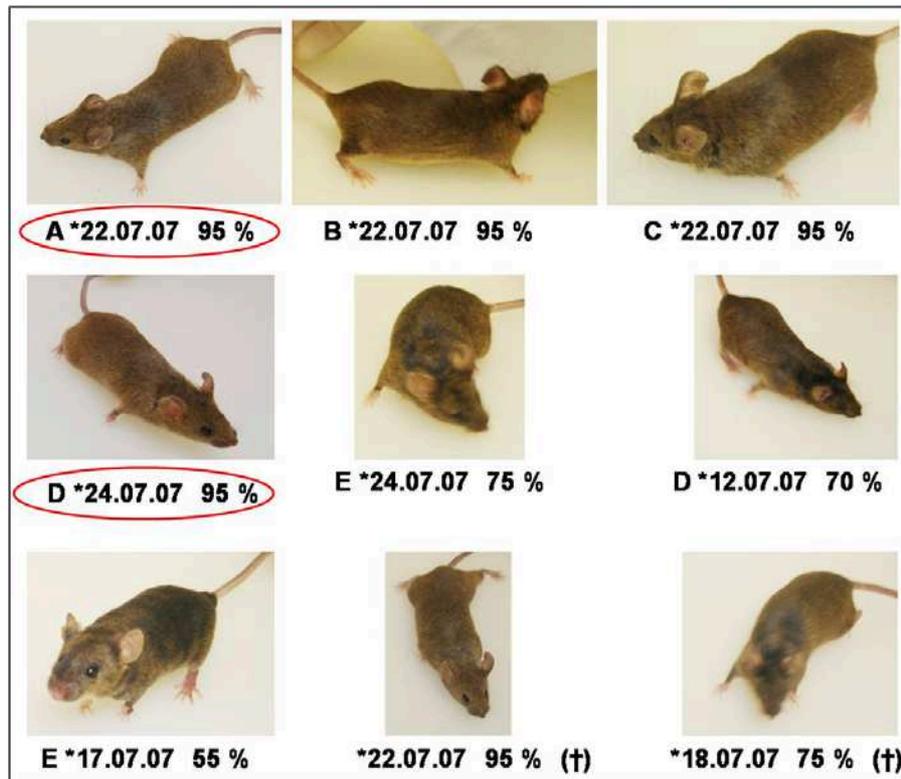
**Tabelle 5-1: Tabellarische Zusammenfassung der SF-Blastozysteninjektionen.** Die Blastozysteninjektionen ergaben insgesamt 9 Chimären, wovon zwei dieser Chimären (gekennzeichnet) heterozygote Nachkommen hervorbrachten.

Sek. ES-Zell-Klon	Injizierte Blastozysten	Nachkommen	Chimären
1H5 (P26)	8	2 (†)	
1F1 (P26)	18		
1A6 (P26)	10	2 (†)	
1B5 (P26)	4	2	1 (*12.07.07 70 %)
2F3 (P26)	13	3 (†)	
1B1 (P26)	12	5	
1E1 (P26)	8	5 + 1(†)	
1C1 (P26)	16	2 + 2(†)	
2C3 (P26)	18	2 + 1(†)	1 (*17.07.07 55 %)
1A5 (P26)	19	2	1 (*18.07.07 75 % (†))
1C5 (P26)	10	6	3 (*22.07.07 95 % 95 % (†) 95 %)
1E6 (P26)	17		
1F5 (P26)	27	5 + 4(†)	3 (*24.07.07 95 % 95 % 75 % )
2A4 (P26)	24	5 (†)	

Im Alter von 7-8 Wochen wurden alle zu dem Zeitpunkt noch lebenden Chimären mit C57/Bl6-Mäusen verpaart und damit die Keimbahntransmission der Mutation getestet. Nachkommen einer Chimäre aus Klon 1C5 sowie einer Chimäre aus Klon 1F5 waren agoutifarben und konnten nach Genotypisierung als heterozygot identifiziert werden, womit die Keimbahngängigkeit der S1512/1570A nachgewiesen werden konnte.

Die heterozygoten Nachkommen wurden im nächsten Schritt untereinander verpaart, um Mäuse zu erhalten, die homozygot für die Mutationen S1512A und S1570A sind.

Sekundäre ES-Zellklone, die von den primären Klonen 3B7 und 8H1 stammten und nur die Mutation S1512A enthalten, lagern im Flüssigstickstoff und können noch in Blastozysten injiziert werden.



**Abbildung 5-19** Fotos der 9 SF-Chimären. Die beiden markierten Chimären waren diejenigen, die heterozygote Nachkommen erbrachten.

## 5.1.6 Untersuchung der $Ca_v1.2^{SF}$ -Mäuse

### 5.1.6.1 Genotypisierung

Für die Identifizierung des fraglichen Genotyps wurden, wie unter 4.3.1.2 beschrieben, die Schwanzbiopsien der Tiere mit Proteinase K verdaut und die SF-Genotypisierungs-PCR mit dem Primerpaar *SF-Genotyp\_for* und *SF-Genotyp\_rev* durchgeführt. Wie schon in Abbildung 5-17 gezeigt, enthält das knock-in-Allel zusätzliche Nukleotide (Schnittstellen der MCS sowie eine loxP-Sequenz), die vom Targeting-Vektor stammen. Diesen Größenunterschied zwischen Wildtyp- und knock-in-Allel macht man sich bei dieser PCR zunutze und es entsteht ein 520 bp großes Produkt vom Wildtyp-Allel bzw. ein 624 bp großes Fragment vom knock-in-Allel.

Abbildung 5-20 zeigt die Genotypisierungs-PCR der ersten braunen Nachkommen der beiden Chimären \*22.07.07 bzw. \*24.07.07. Bei 2 dieser 7 Nachkommen entstand das

624 bp große Fragment, diese sind also heterozygote Nachkommen und können für die Weiterzucht herangezogen werden. Letztendlich wurde aus Nachkommen von Chimäre \*22.07.07 die Mauslinie herangezüchtet.

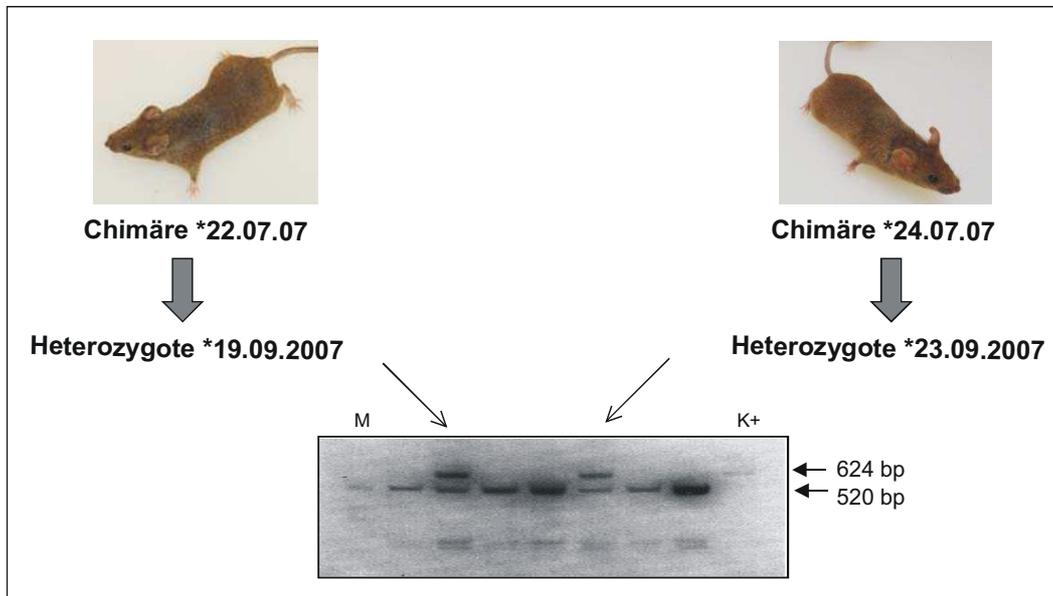


Abbildung 5-20 Etablierung der  $Ca_v1.2^{SF}$ -Mauslinie aus den Nachkommen der SF-Chimäre \*22.07.07

### **Southern-Blot mit genomischer DNS**

Aus Schwanzbiopsien von Mäusen unterschiedlichen Genotyps wurde die DNS isoliert (4.3.1.2) und eine Southern-Blot-Analyse wie unter 4.5.2 beschrieben durchgeführt. Dabei entstand bei der für die Mutationen homozygoten ( $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ ) Maus-DNS die 2 kb große knock-in-Bande, bei der von der Wildtyp-Maus ( $Ca_v1.2^{SF(+/+)}$ ) stammenden DNS die 4 kb große Bande und bei der von der heterozygoten Maus ( $Ca_v1.2^{SF(KI/+)}$ ) isolierten DNS beide Banden (siehe Abbildung 5-21).

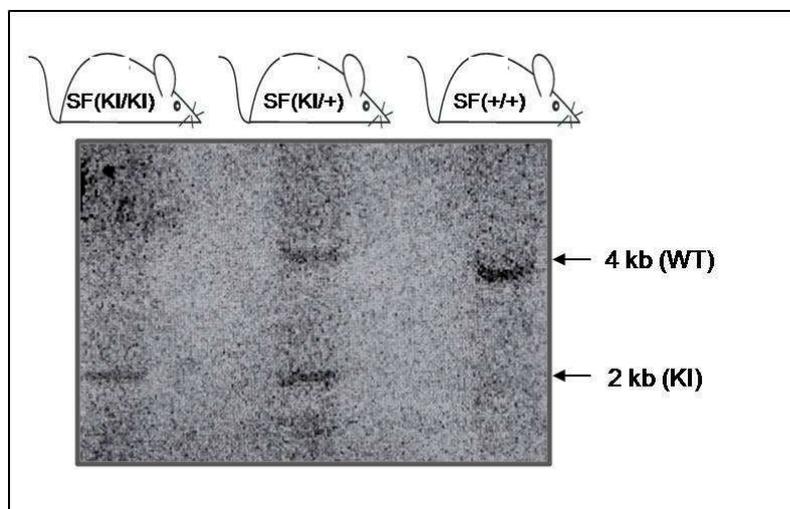


Abbildung 5-21 Southern-Blot als Bestätigung des knock-in-Genotyps. Erklärung siehe Text.

### 5.1.6.2 Nachweis der beiden Mutationen

#### Sequenzüberprüfung der genomischen DNS

Bei diesem Nachweis wurden Tiere der Genotypen  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ ,  $Ca_v1.2^{SF(KI/+)}$  und  $Ca_v1.2^{SF(+/+)}$  untersucht. Aus Schwanzbiopsien wurde zunächst die DNS isoliert (4.3.1.2), welche dann als Matrize in die knock-in-PCR (4.3.10) mit der Primerkombination *KI\_S1512A\_for* und *KI\_S1512A\_rev* bzw. *KI\_S1570A\_for* und *KI\_S1570A\_rev* eingesetzt wurde. Die anschließende Sequenzierung mit Primer *KI\_S1512A\_for* bzw. *SF\_E38\_for* zeigte die jeweils erwarteten Codons.

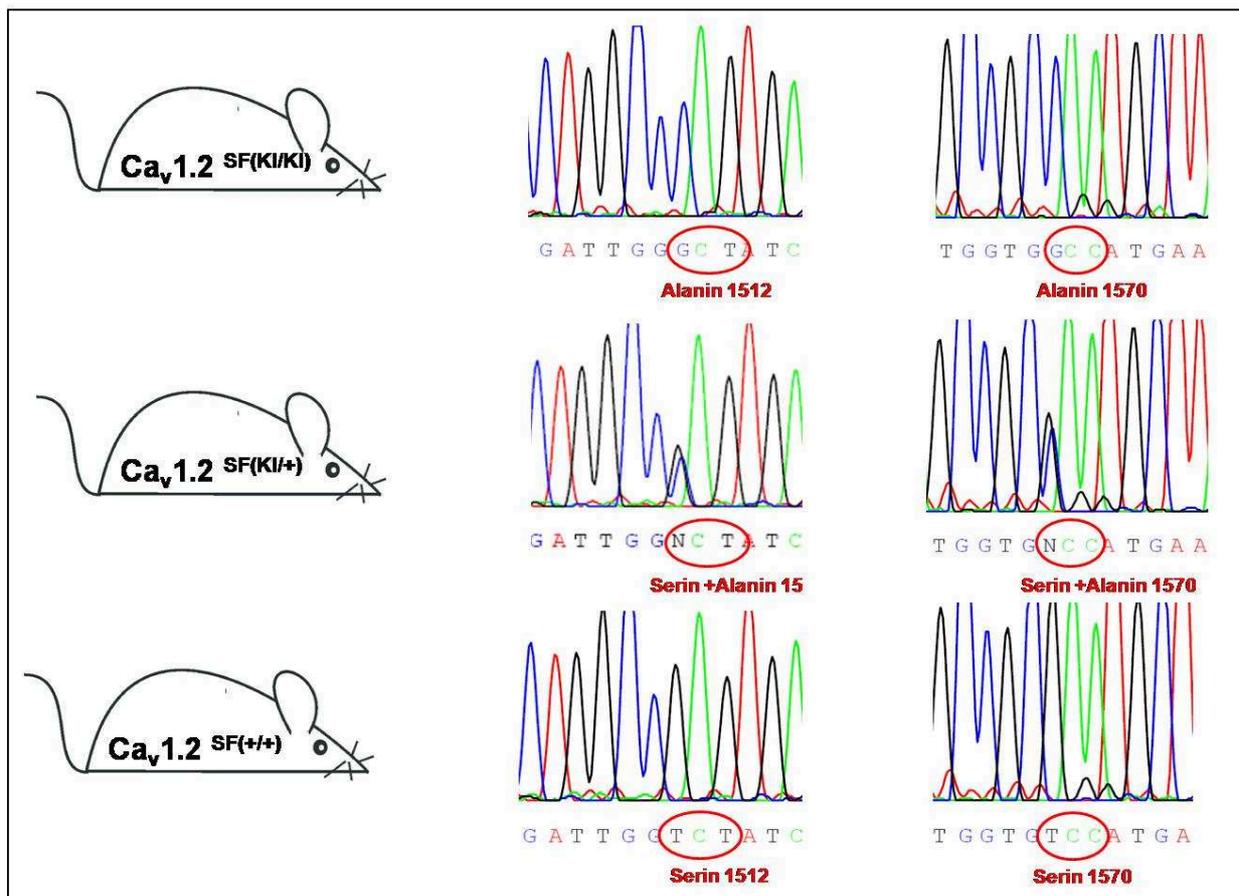


Abbildung 5-22 Nachweis der beiden Mutationen in der  $Ca_v1.2^{SF}$ -Mauslinie nach Untersuchung der genomischen  $Ca_v1.2^{SF}$ -Maus-DNS

#### Sequenzüberprüfung der cDNS

Zunächst wurde aus Organen (Herz und Gehirn) von Mäusen, die die beiden Mutationen in beiden Allelen tragen, sowie von Wildtyp-Tieren die RNS isoliert (4.3.1.3). Diese konnte im Anschluss mittels RT-PCR (4.3.9.3) in cDNS umgeschrieben werden. Nach einer Taq-Standard-PCR-Reaktion mit dem Primerpaar *cDNA-PCR-seq\_for* und *cDNA-PCR-seq\_rev* entstand ein 609 bp großes Fragment, von welchem mit Hilfe des Sequenzierprimers *cDNA-PCR-seq\_for* die Sequenz ermittelt wurde. Auch hier konnten bei den homozygoten Tieren

beide Mutationen sowohl in Herz als auch in Gehirn festgestellt werden (siehe Abbildung 5-23 unten).

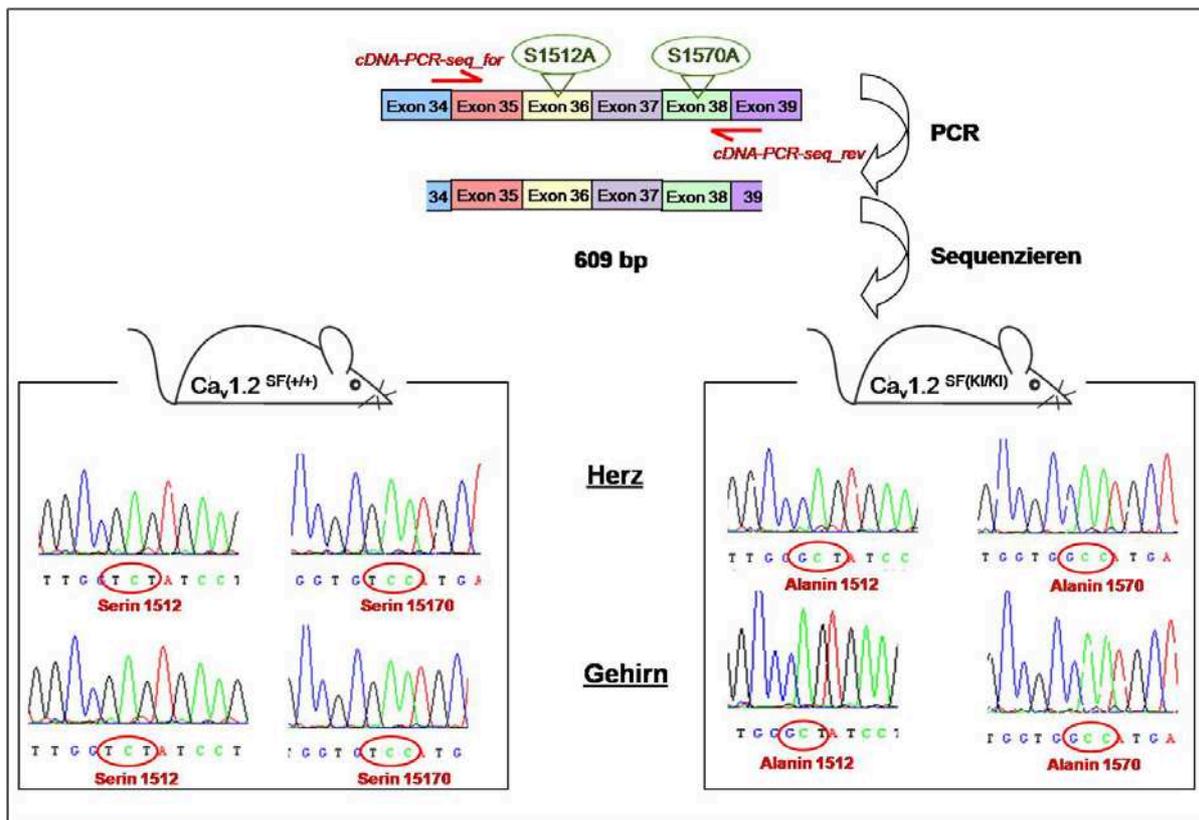


Abbildung 5-23 Nachweis der beiden Mutationen auf cDNA-Ebene. Erklärung siehe Text.

### 5.1.6.3 Primäre Grundcharakterisierung

Homozygote Versuchstiere der  $Ca_v1.2^{SF}$ -Mauslinie sind lebensfähig und fertil. Sie zeigen äußerlich keine Unterschiede zu den aus denselben Verpaarungen hervorgegangenen Wildtypen. Auch das Körpergewicht (siehe Abbildung 5-24) ist zu den Kontrolltieren unverändert.

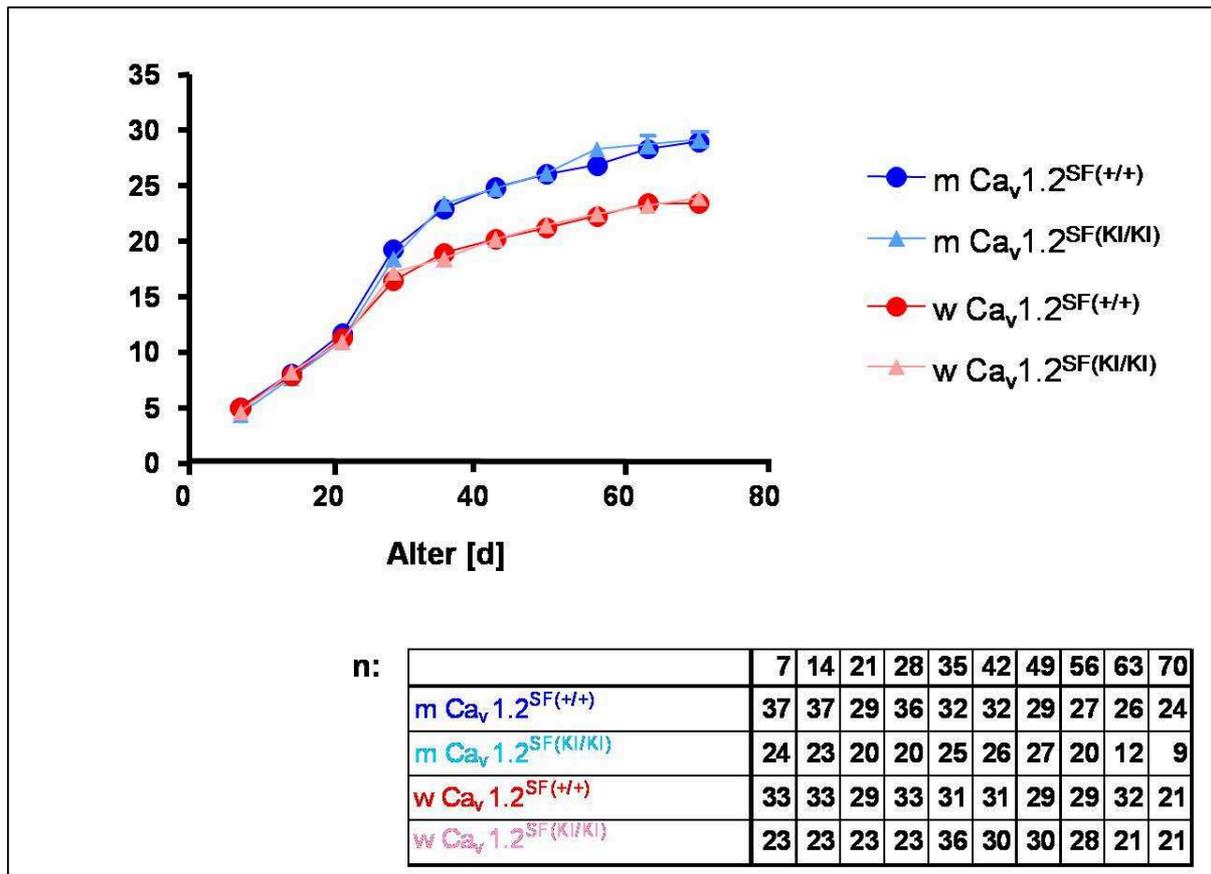


Abbildung 5-24 Gewichtsstatistik. Es wurde das Gewicht von Tieren der vier Genotyp-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ab der Geburt ermittelt und ein zeitlicher Verlauf erstellt. Die jeweilige Anzahl der gewogenen Tiere ist der Tabelle zu entnehmen.

#### 5.1.6.4 Geburtsstatistik

Zur Untersuchung des Vererbungs-Verhaltens der Mauslinie wurde eine Statistik über alle heterozygoten Verpaarungen ( $Ca_v1.2^{SF(KI/+)} \times Ca_v1.2^{SF(KI/+)}$ ) erhoben. Würde eine Vererbung nach dem Mendelschen Gesetz erfolgen, dann müsste das Verhältnis Homozygot:Heterozygot:Wildtyp 25:50:25 entsprechen. Die Auswertung aller bisherigen Würfe ergab nach Anwendung des Chi-Quadrat-Testes keine signifikante Abweichung von dieser Erwartung ( $\chi^2 = 0,646$ ;  $p > 0,7$ ). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die  $Ca_v1.2^{SF}$ -Mauslinie dem Mendelschen Vererbungsprinzip folgt.

Tabelle 5-2: Anzahl der Nachkommen und ihre prozentuale Verteilung aus allen heterozygoten Verpaarungen ( $Ca_v1.2^{SF(KI/+)} \times Ca_v1.2^{SF(KI/+)}$ ) der  $Ca_v1.2^{SF}$ -Mauslinie (Stand: Ende Oktober 2008).

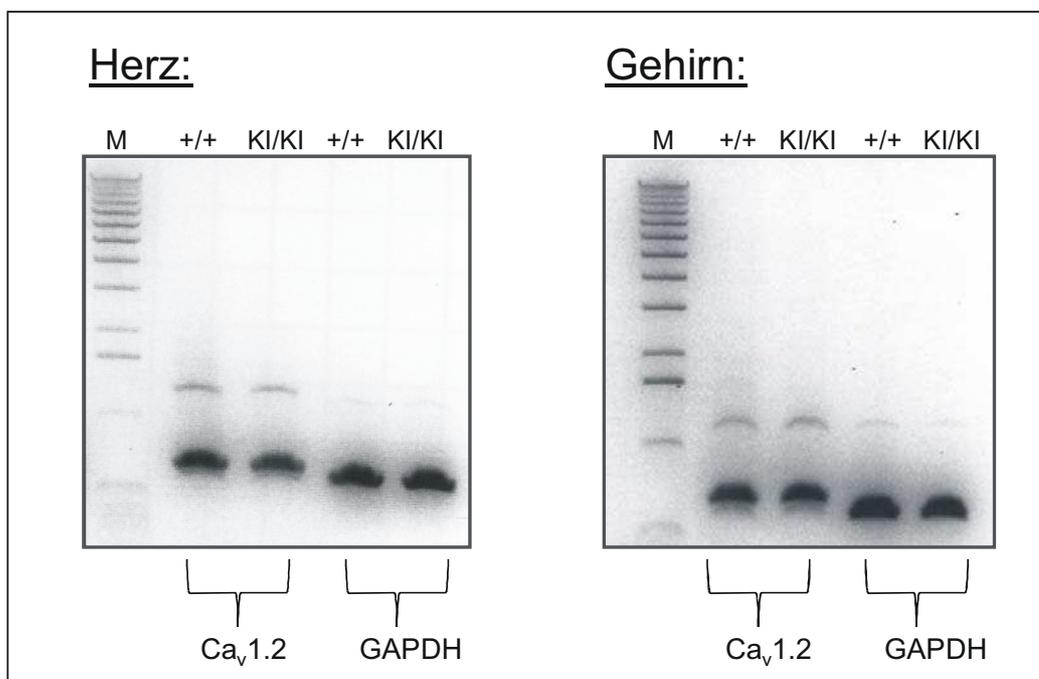
	Homozygot	Heterozygot	Wildtyp
Anzahl	95	187	102
Prozent	24,7	48,7	26,6

### 5.1.6.5 Expressionsanalyse

Es wurde hier untersucht, ob durch die mutierte DNS-Sequenz und die loxP-Stellen die Expression des  $Ca_v1.2$ -Kanals verändert wird. Dies erfolgte auf zweierlei Art und Weisen; auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene.

#### mRNS-Ebene

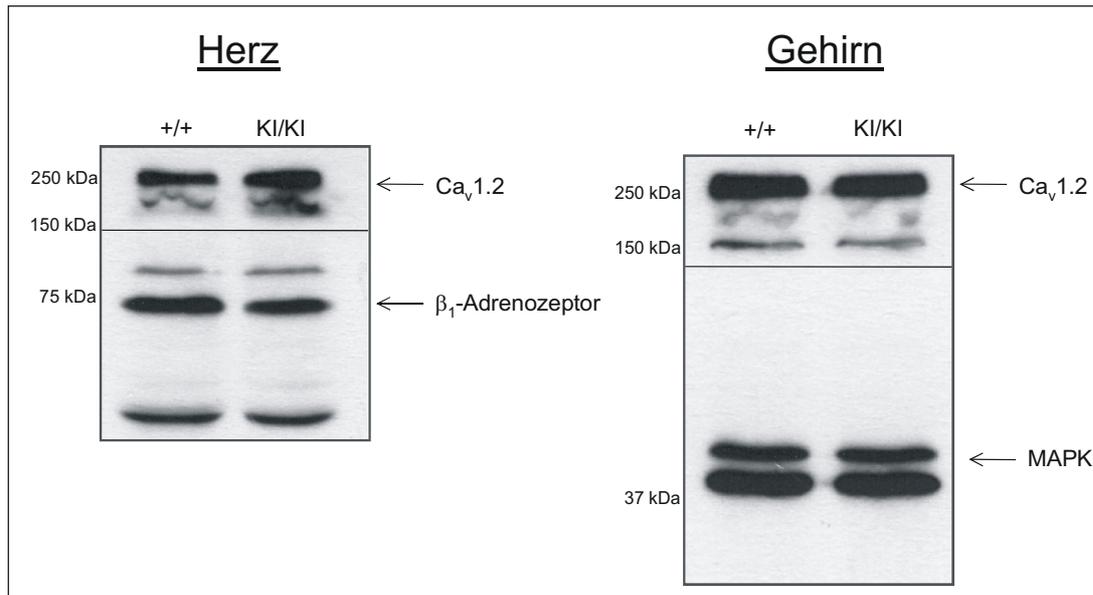
Für diese Expressionsstudie wurde die mRNA aus Herz und Gehirn von Homozygoten  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$  und Kontrollen  $Ca_v1.2^{SF(+/+)}$  isoliert (4.3.1.3) und mittels RT-PCR (4.3.9.3) in cDNA umgeschrieben. Diese verwendete man schließlich als Matrizen-DNA für die Taq-PCR-Reaktion nach Standard-Protokoll (4.3.9) und 28 Zyklen, bei der man auf das *CACNA1C*-Gen (Primerpaar *VS9* + *VS18*) untersucht. Als Referenzgen wurde GAPDH betrachtet (Primer *GAPDH\_for* + *GAPDH\_rev*). Über die Menge an cDNA, welche proportional zur Menge der mRNA sein sollte, kann somit eine Aussage über die Expression des *CACNA1C*-Gens gemacht werden. Daher lässt sich anhand der Stärke der Bande der PCR-Amplifikate letztlich der Expressionsspiegel abschätzen (Abbildung 5-26). Es zeigt sich somit kein auffälliger Unterschied an  $Ca_v1.2$ -mRNA in Herz oder Gehirn von  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ -Tieren. Zu Beginn der Analyse wurde eine Zykluskinetik durchgeführt, um sicherzustellen, dass sich die PCR noch in ihrer exponentiellen Phase befand (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5-25 Semiquantitative mRNA-Expressionsanalyse.** Anhand der Bandenintensität lässt sich der Expressionsspiegel der  $Ca_v1.2$ -mRNA von Versuchstieren ( $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ ) und Kontrolltieren ( $Ca_v1.2^{SF(+/+)}$ ) abschätzen. Es zeigt sich kein eindeutiger Unterschied. GAPDH dient als Kontrollgen.

### Proteinebene

Nach einer Membranpräparation aus Herz- bzw. Gehirngewebe wurde durch Western-Blot (4.6.4) überprüft, ob die Expression des  $\text{Ca}_v1.2$ -Proteins in homozygoten  $\text{Ca}_v1.2^{\text{SF(KI/KI)}}$ -Mäusen verändert vorliegt. Abbildung 5-26 zeigt, dass sowohl im Herzen als auch im Gehirn der  $\text{Ca}_v1.2$ -Spiegel unverändert ist. Die Expression wurde also, wie auch schon auf mRNA-Ebene gezeigt, nicht beeinflusst. Als Ladekontrolle diente im Herzen der  $\beta_1$ -Adrenozeptor, im Gehirn die MAP-Kinase (MAPK).

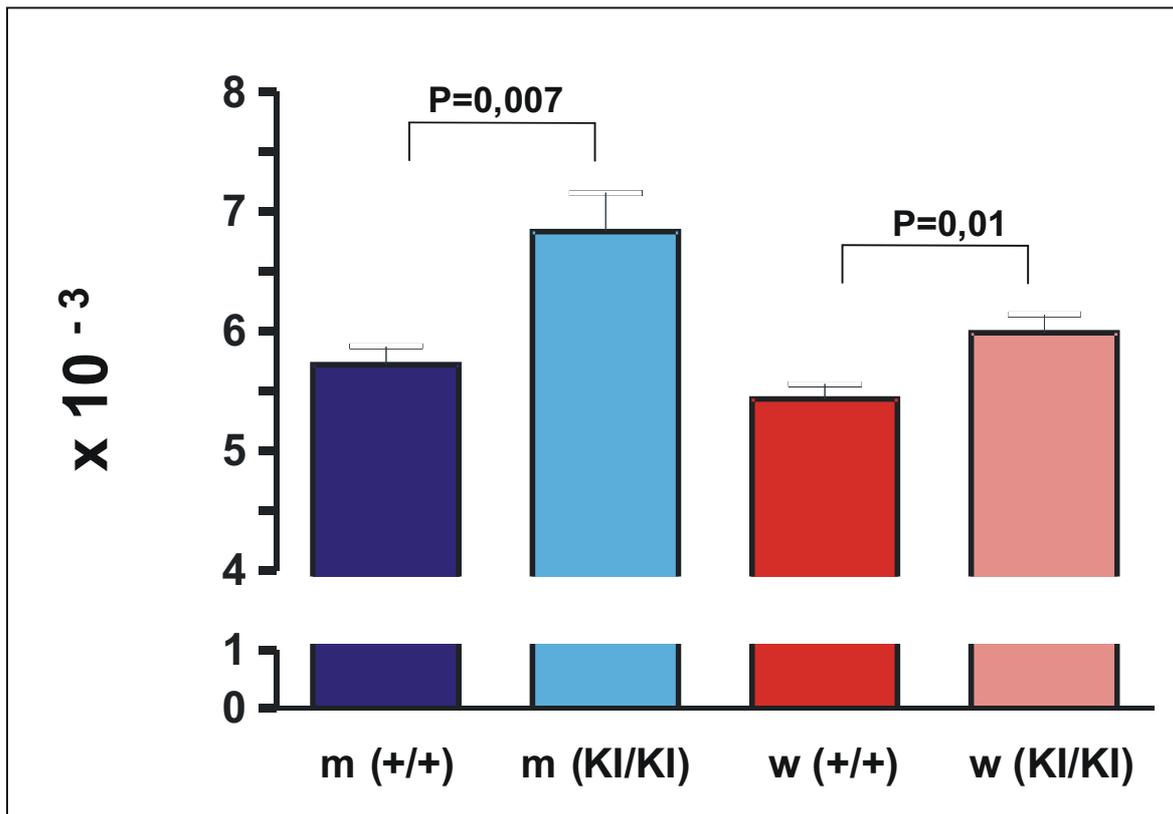


**Abbildung 5-26 Membranpräparation mit anschließender Westernblot-Analyse.** Durch Vergleich der Bandenintensität können keine augenscheinlichen Veränderungen im  $\text{Ca}_v1.2$ -Protein-Expressionslevel zwischen Versuchs- ( $\text{Ca}_v1.2^{\text{SF(KI/KI)}}$ ) und Kontrolltieren ( $\text{Ca}_v1.2^{\text{SF(+/+)}}$ ) vermerkt werden.

#### 5.1.6.6 Untersuchungen am Herzen

##### Ermittlung von Herz-/Körpergewicht-Quotienten

Durch diese Untersuchung soll überprüft werden, ob die Herzen der  $\text{Ca}_v1.2^{\text{SF(KI/KI)}}$ -Mäuse Veränderungen in ihrer Masse aufzeigen. Um nun das Herzgewicht verschieden großer und schwerer Tiere miteinander in Relation zu setzen, wurden Herz- und Gesamtgewicht bestimmt, aus denen der Herz-Körpergewicht-Quotient (HW/BW) ermittelt wurde. Die signifikante Erhöhung des HW/BW um ca. 20% bei den männlichen  $\text{Ca}_v1.2^{\text{SF(KI/KI)}}$ -Mäusen (um ca. 10% bei den weiblichen Homozygoten) gegenüber den Wildtypen (Abbildung 5-27) deutet eine Hypertrophie des Herzens an.



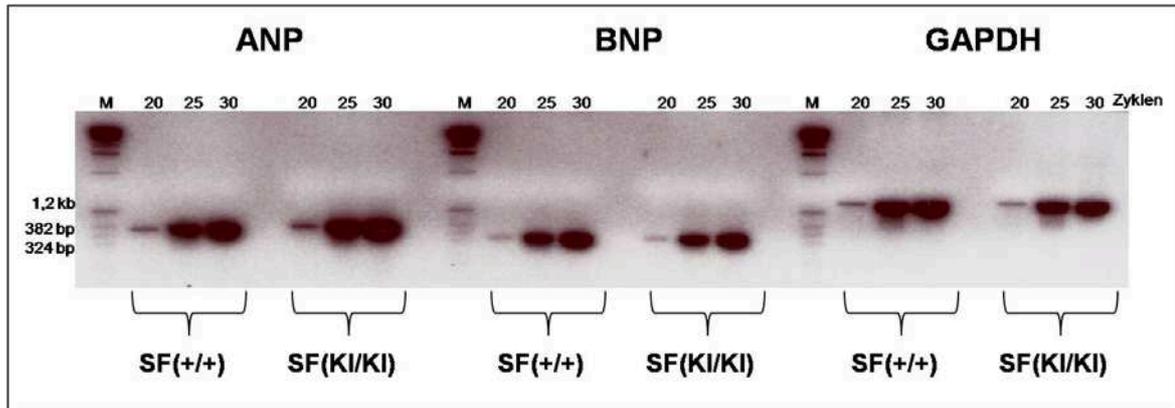
**Abbildung 5-27 Vergleich Herzgewicht/Körpergewicht.** Es wurden je  $n=8$  Tiere (Alter zwischen 9-14 Wochen) pro Versuchsgruppe untersucht. Die Anwendung des Chi-Quadrat-Testes ergab sowohl bei den männlichen ( $m$ ) als auch bei den weiblichen ( $w$ ) Versuchstieren einen signifikanten Unterschied.  $m$ =männliche Versuchstiere,  $w$ =weibliche Versuchstiere;  $(+/+)$ =Wildtyp,  $(KI/KI)$ =  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ -Mäuse

### Nachweis von Hypertrophie-Markergenen im Herzen

Sehr häufig werden bei Herzhypertrophien Veränderungen im Expressionsspiegel verschiedener Gene/Proteine beobachtet, was sich durch die „fetale Reprogrammierung“ des hypertrophen Herzgewebes erklären lässt. Besonders *ANP* und *BNP* sind solche Gene, deren Expression, im Falle einer Hypertrophie, hochreguliert wird. Um ein weiteres Indiz für eine eventuell bestehende Herzhypertrophie der  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ -Mäuse zu erhalten, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt, um so die relativen Expressionsspiegel von sowohl *ANP* als auch *BNP* der Homozygoten mit den Wildtypen zu vergleichen, wobei *GAPDH* als Referenzgen diente.

Aus männlichen, 10 Wochen alten Versuchstieren wurde nach mRNA-Isolierung (4.3.1.3) aus Herzgewebe die so gewonnene mRNA in cDNA umgeschrieben (4.3.9.3). Mit dieser cDNA als Vorlage wurde eine Taq-PCR nach Standard-Protokoll, allerdings mit unterschiedlicher Zyklen-Anzahl (20, 30, 35 Zyklen), durchgeführt. Als Primer wurden *ANP\_for* + *ANP\_rev* und *BNP\_for* + *BNP\_rev* herangezogen (für das Referenzgen *GAPDH*: *GAPDH\_for* + *GAPDH\_rev*).

Anhand der Bandenintensität in Abbildung 5-28 lässt sich ein Anstieg der ANP-Expression bei den homozygoten Tieren ( $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ ) wahrnehmen, was ein weiterer Hinweis für eine bestehende Herzhypertrophie sein könnte. Um eine endgültige Aussage über einen eventuellen ANP-Expressionsanstieg treffen zu können, muss dieses Experiment mit Proben von mehreren Versuchstieren wiederholt und durch Quantifizierung ergänzt werden.



**Abbildung 5-28** Semiquantitative mRNA-Expressionsanalyse der Hypertrophie-Markergene ANP und BNP mit unterschiedlicher Zyklusanzahl (20, 25, 30 Zyklen). Es ist ein Anstieg des Expressionsspiegels von ANP-mRNA in homozygoten  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$  zu erkennen. Referenzen: GAPDH.

## 5.2 Generierung und Untersuchung der $Ca_v1.2^{EQ}$ -Mauslinie

### 5.2.1 Der Gen-Targeting-Vektor

Der verwendete Gen-Targeting-Vektor pBI-lox-NeoTK-EQ wurde von Dr. Peter Lenhardt konstruiert und zur Verfügung gestellt. Er besteht aus einem 1,1 kb großen 5'-Arm, der für die spätere Homologe Rekombination ins ES-Zell-Genom von Bedeutung ist. Der 6,3 kb große 3'-Arm enthält die Exone 40 bis 44. In Exon 40 wurde das ursprüngliche Basentriplett ATC gegen GAG ausgetauscht und somit die Mutation Isoleucin/Glutamat generiert. Dieser Vektor hatte eine Gesamtgröße von 15,2 kb.

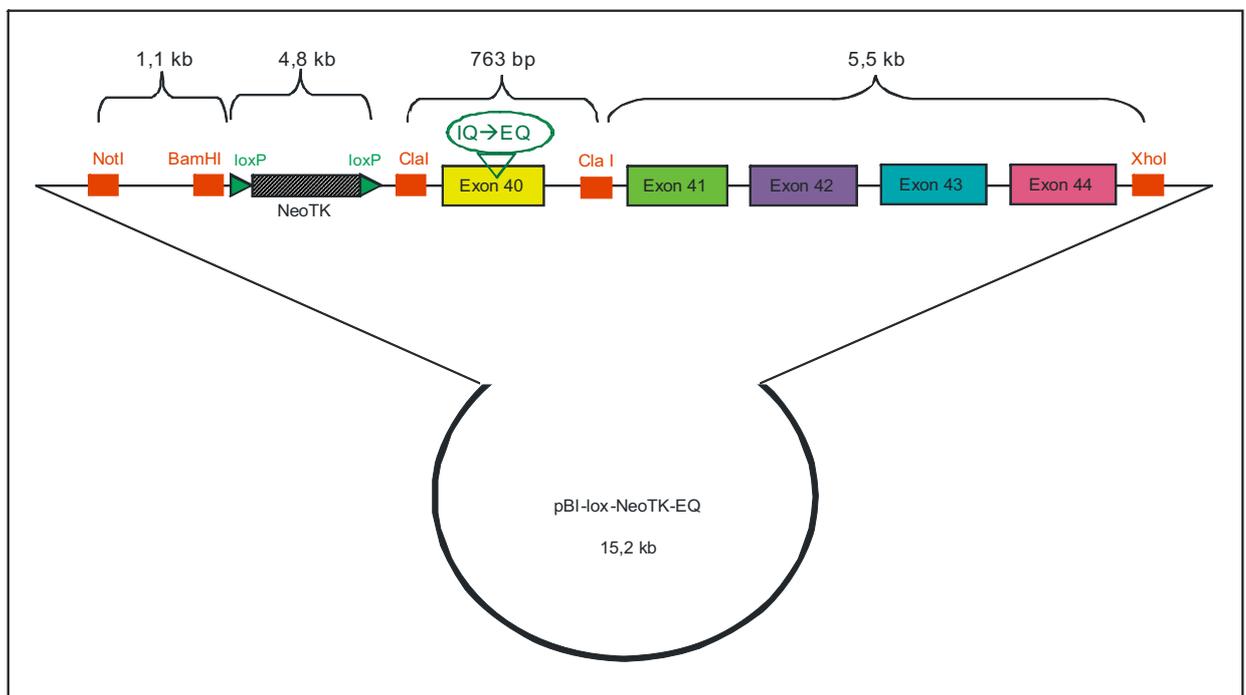
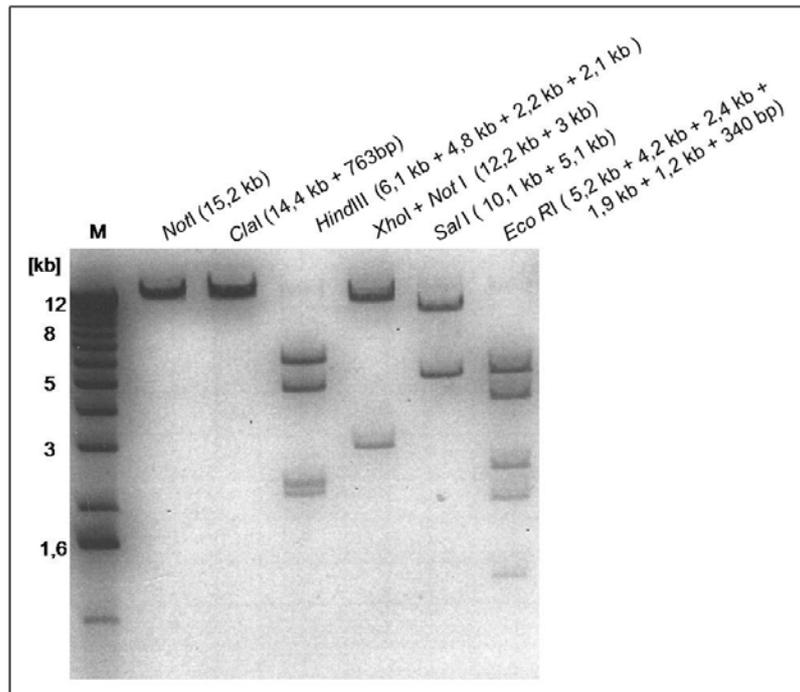


Abbildung 5-29 Darstellung des Gen-Targeting-Vektors pBI-lox-NeoTK-EQ

## Restriktions- und Sequenz-Check

Auch dieser Gen-Targeting-Vektor wurde einem Kontroll-Verdau mit unterschiedlichen Enzymkombinationen unterzogen, wobei er in die jeweils erwarteten Fragmentgrößen zerschnitten wurde (Abbildung 5-30).



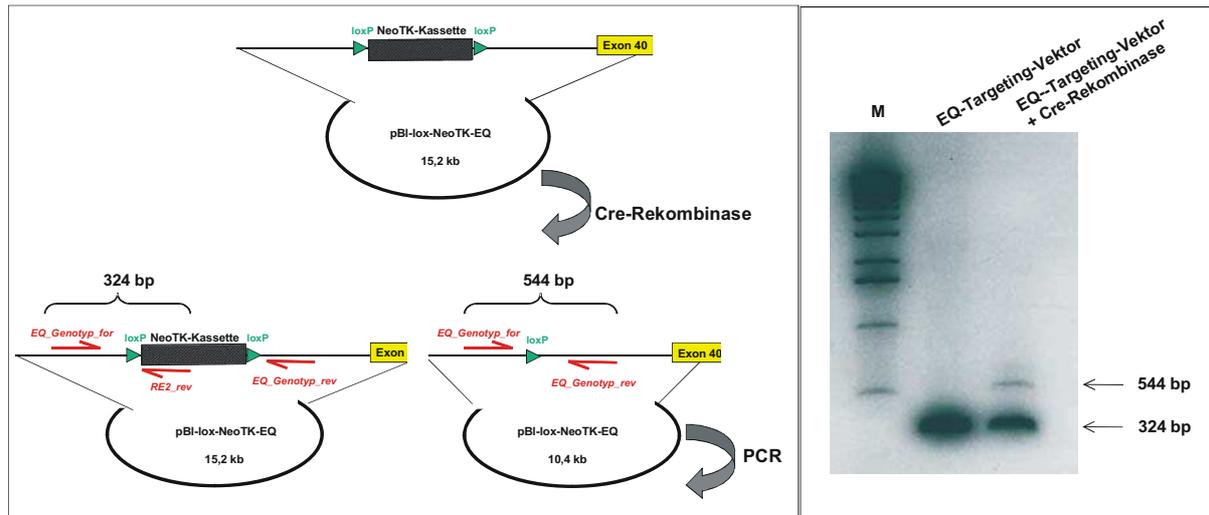
**Abbildung 5-30 Agarose-Checkgel (0,7%).** Zur Bestätigung des rekombinanten Plasmids wurden mehrere Verdauansätze mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen durchgeführt.

Desweiteren erfolgte eine Sequenzanalyse, bei der das veränderte Codon für Glutamat im IQ-Motiv (nun also EQ-Motiv) nachgewiesen und nicht erwünschte Punktmutationen ausgeschlossen werden konnten (Abbildung 5-31).



### Funktionsüberprüfung der loxP-Sequenzen

Ob die loxP-Sequenzen funktionstüchtig sind, d.h. ob durch deren Rekombination die NeoTK-Kassette entfernt werden kann, wurde nun hier *in vitro* getestet. Der Targeting-Vektor wurde mit *Cre-Rekombinase* behandelt, wodurch die Rekombination gestartet wurde. Durch die PCR mit der 3-Primerkombination *EQ-Genotyp\_for* und *EQ-Genotyp\_rev* und *RE2\_rev* konnte gezeigt werden, dass die Selektionskassette eliminiert worden war, somit also die loxP-Sequenzen rekombinant sind.



**Abbildung 5-32** Funktionalitätstest der loxP-Stellen im Gen-Targeting-Vektor. links: Vorgehensweise: sind die loxP-Sequenzen in Ordnung, dann entsteht durch die 3-Primer-Kombination ein 544 bp großes Fragment, beim Gen-Targeting-Vektor ergibt diese Kombination ein 324 bp großes Fragment. rechts: Agarosegel des Cre-Rekombinationstests

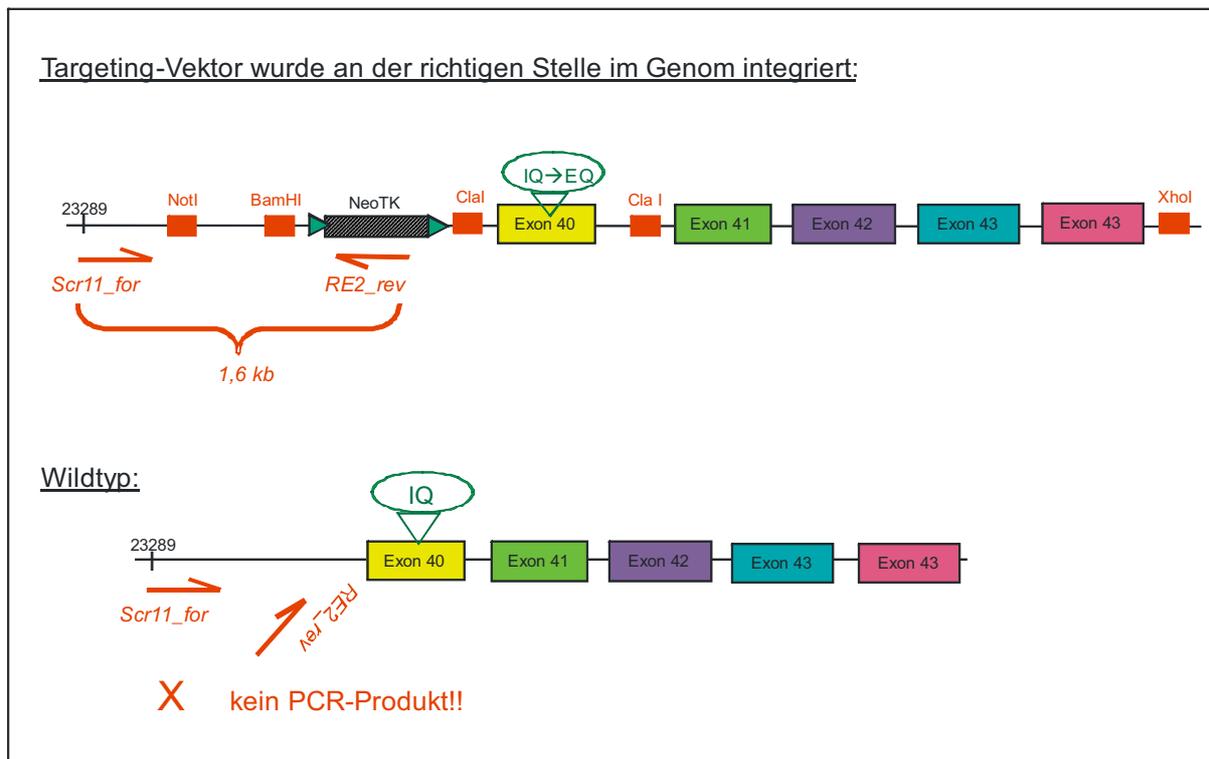
### 5.2.2 Primäres Zell-Targeting (Erstes Targeting)

In ES-Zellen der Passage 14 wurde der EQ-Targeting-Vektor mittels Elektroporation eingeschleust (4.4.3.4), um dort ins ES-Zell-Genom integriert zu werden. Nach 24 h wurde die Positiv-Selektion durch G418 gestartet, was nach weiteren 3 Tagen an massivem Zellsterben bemerkbar wurde. Ab Tag 9 waren die ersten Zellklone mit bloßem Auge erkennbar und wurden isoliert. An 4 Tagen konnten insgesamt 1024 Klone gepickt werden. Während die A-Platten bei einer Konfluenz von 70% als Gefrierstocks bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden, lysierte man die Zellen der restlichen Platten, um daraus die DNS zu isolieren (4.3.1.2).

### 5.2.2.1 Nachweis der homologen Rekombination

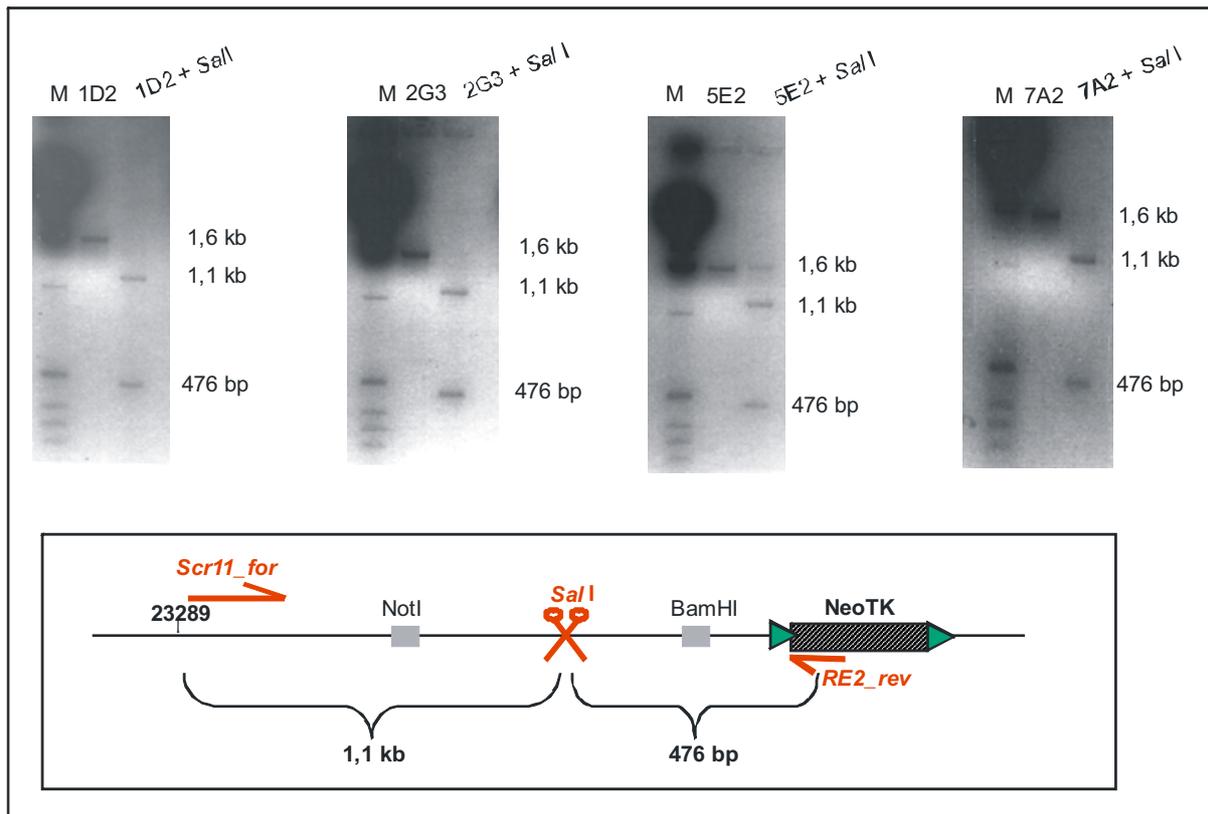
#### Screening mittels PCR

Hatte das Targeting-Konstrukt an der richtigen Stelle im Genom integriert, dann sollte mit der dargestellten Screening-PCR ein 1,6 kb großes Produkt entstehen (Abbildung 5-33). Wie unter 5.1.3 erwähnt, musste hier bei der Primerwahl darauf geachtet werden, dass der Vorwärtsprimer auf einem Bereich 3' vor dem Targeting-Vektor bindet, der Rückwärtsprimer dagegen auf einem Bereich, der nur im Vektor vorkommt (z.B. die Selektionskassette). Somit konnte gewährleistet werden, dass keine falsch-positiven Klone identifiziert werden.



**Abbildung 5-33 Strategie des PCR-Screenings.** Hat die Vektor-DNS an der richtigen Stelle im ES-Zell-Genom integriert, dann entsteht ein 1,6 kb großes Fragment (oben); beim Wildtyp kann mit dieser Primerkombination kein Produkt entstehen (unten).

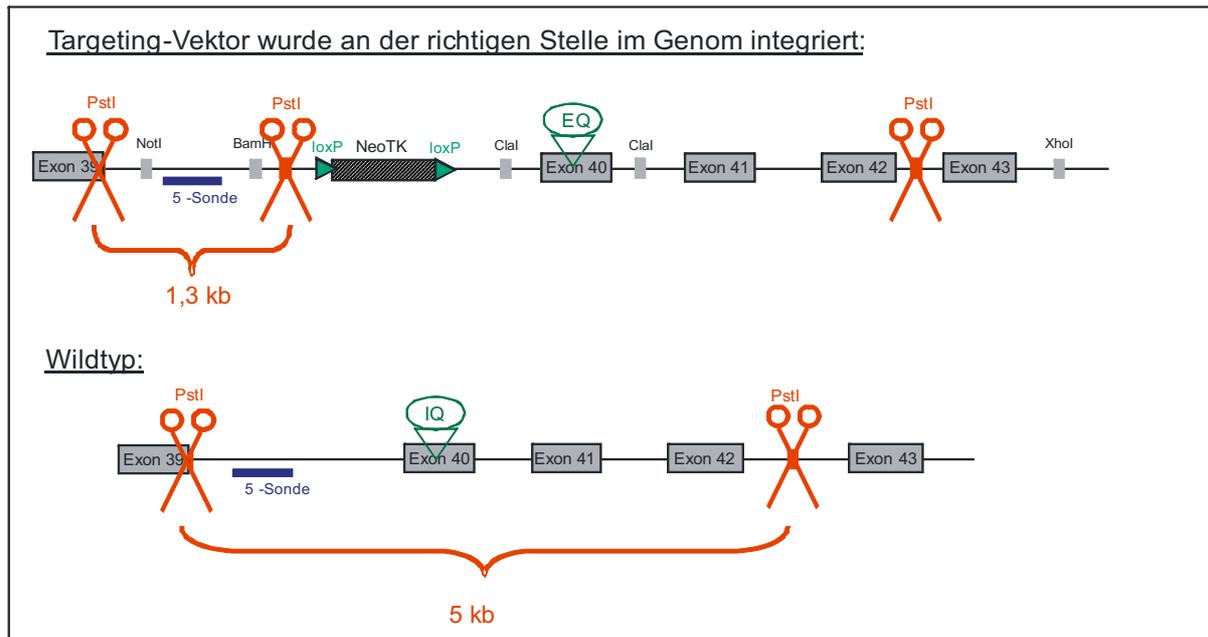
Bei der Suche nach den Positiven unter den 1024 isolierten Kolonien konnten durch das Primerpaar *Scr11\_for* und *RE2\_rev* bei 4 Klonen PCR-Produkte der gewünschten Größe vermerkt und letztlich durch Kontrollverdau mit *SalI* bestätigt werden (Abbildung 5-34).



**Abbildung 5-34 Ergebnis nach dem PCR-Screening.** Bei 4 der 1024 untersuchten Klone konnte eine Bande auf der erwarteten Höhe vermerkt werden. Durch Zerschneiden des PCR-Produkts mit dem Restriktionsenzym *SalI* entstanden die zwei Fragmente mit der errechneten Größe.

### Screening mittels Southern-Blot

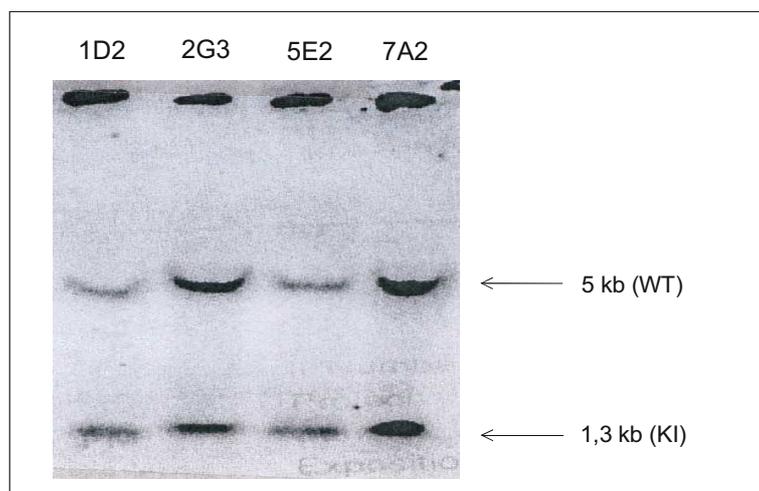
Die oben als positiv identifizierten Klone 1D2, 2G3, 5E2 und 7A2 wurden einer Southern-Blot-Analyse unterzogen. Die genomische ES-Zell-DNS wurde mit der Restriktionsendonuklease *PstI* zerschnitten und das dabei entstandene 1,3 kb große Fragment des knock-in-Allels mittels der radioaktiv markierten Sonde nachgewiesen.



**Abbildung 5-35 Strategie des Southern-Screenings.** Durch Zerschneiden der ES-Zell-DNS mit dem Restriktionsenzym PstI entstehen von knock-in- und Wildtyp-Allel Fragmente unterschiedlicher Größen, welche durch die radioaktiv-markierte Sonde identifiziert werden.

Da jede ES-Zelle neben dem knock-in-Allel auch das Wildtyp-Allel trägt, erscheint auf dem Blot in Abbildung 5-36 auch die 5 kb große Wildtyp-Bande.

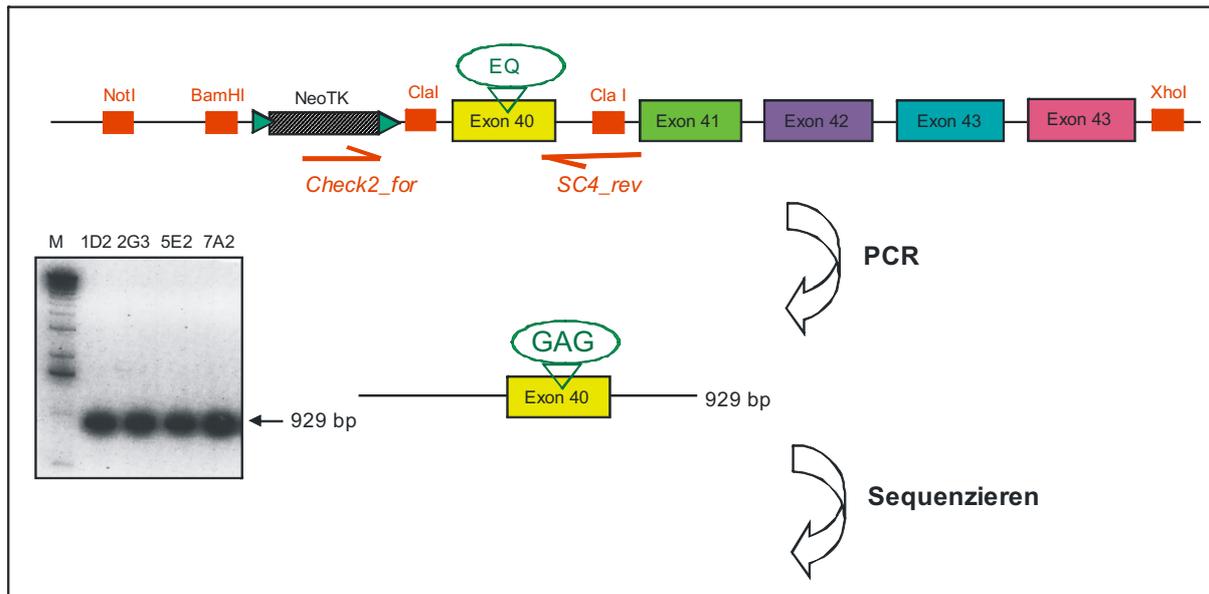
Die 5'-Sonde bindet an einen Bereich, der auf dem Targeting-Konstrukt liegt. Hätte dieses mehrmals ins ES-Zell-Genom integriert, dann wären auf dem Blot mehrere Banden zu erkennen. Da aber neben der knock-in- lediglich die Wildtyp-Bande erscheint, kann davon ausgegangen werden, dass nur eine einmalige Integration des Targeting-Vektors stattgefunden hatte.



**Abbildung 5-36 Ergebnis nach dem Southern-Screening.** Durch das Erscheinen der 1,3 kb großen knock-in-Bande werden die schon beim PCR-Screening als positiv identifizierten Klone zusätzlich durch den Southern-Blot bestätigt. Dadurch, dass keine weiteren Banden erscheinen, kann davon ausgegangen werden, dass das Targeting-Konstrukt nur einmal integriert hat.

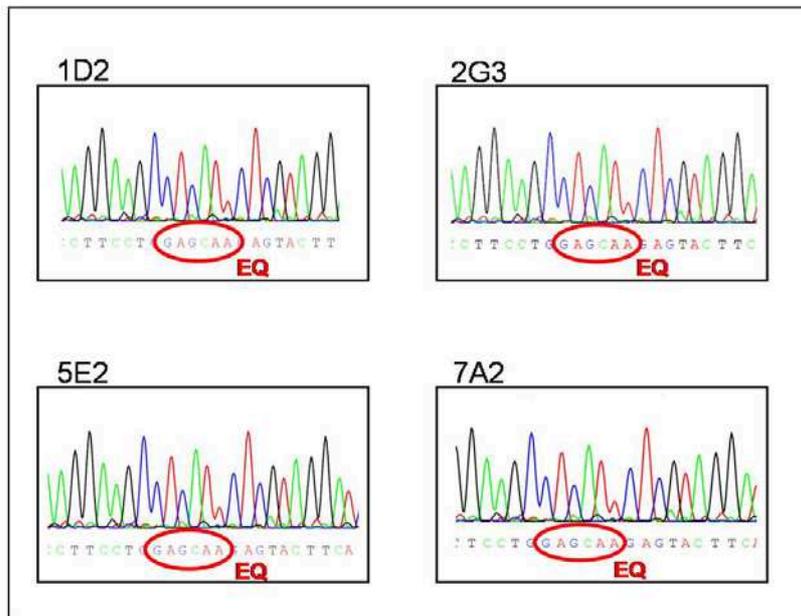
### 5.2.2.2 Sequenzanalyse der positiven ES-Zell-Klone

Um die Sequenz des knock-in-Allels der als positiv gescreenten ES-Zell-Klone zu überprüfen und die Mutation nachzuweisen, wurde nach der in Abbildung 5-37 skizzierten Strategie verfahren. Zunächst erhielt man durch eine PCR (nach Taq-Standard-Protokoll) mit *Check2\_for* und *SC4\_rev* ein 929 bp großes Produkt, welches mittels Gelaufreinigung und –Elution isoliert und schließlich sequenziert wurde.



**Abbildung 5-37 Strategie zur Sequenzanalyse.** Da der Vorwärtsprimer komplementär zur TK-Kassette ist und diese lediglich im knock-in-Allel integriert vorliegt, erhält man nur von diesem ein Amplifikat. Im anschließenden Schritt folgt dessen Sequenzierung.

Für die Sequenzierreaktion kam der Sequenzierprimer *EQ\_Exon40\_for* zum Einsatz. Die so erhaltene Sequenz zeigte die gewollt veränderte Basenabfolge GAG in Exon 40 (Abbildung 5-38). Somit war die Mutation EQ bestätigt und die 4 ES-Zellklone tatsächlich auch auf Sequenzebene positiv.



**Abbildung 5-38** Sequenzen der als positiv gescreenten Klone. Alle vier positiv gescreenten Klone tragen die veränderte Basenabfolge, die nun für ein Glutamat codieren.

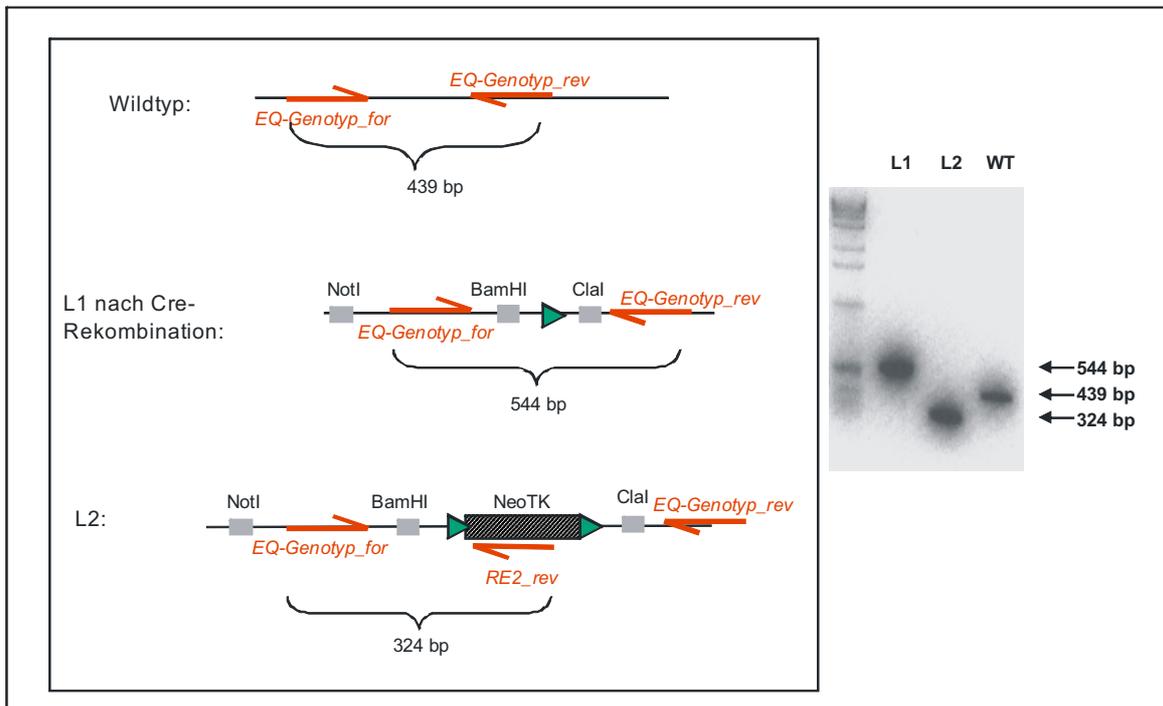
### 5.2.3 Sekundäres Targeting

Im nächsten Schritt musste die Selektionskassette durch Rekombination der loxP-Sequenzen aus dem ES-Zell-Genom entfernt werden. Dies sollte, wie auch schon bei 5.1.4, durch Einschleusen des pIC-Cre-Plasmids erfolgen.

Die unter 5.2.2 positiv identifizierten Klone wurden aufgetaut und bis zu einer Fläche von 75 cm<sup>2</sup> hochgezogen. Diese Zellen wurden geerntet und befanden sich nun in Passage 20. Es folgte die Elektroporation (4.4.3.6) mit 40 µg pIC-Cre-Plasmid. Wie auch schon unter 5.1.4 beschrieben, wurden die Zellen nach Elektroporation in unterschiedlichen Dichten auf 6 Petrischalen verteilt und nach 48 bzw. 72 h mit dem Zusetzen von Ganciclovir begonnen. Dadurch kam es zum Absterben der Zellen, die noch die NeoTK-Kassette integriert hatten. Die schönsten 100 ES-Kolonien wurden nach 10 Tagen gepickt, auf A- und B-Platten verteilt und durch PCR-Analyse bestätigt (Abbildung 5-40).

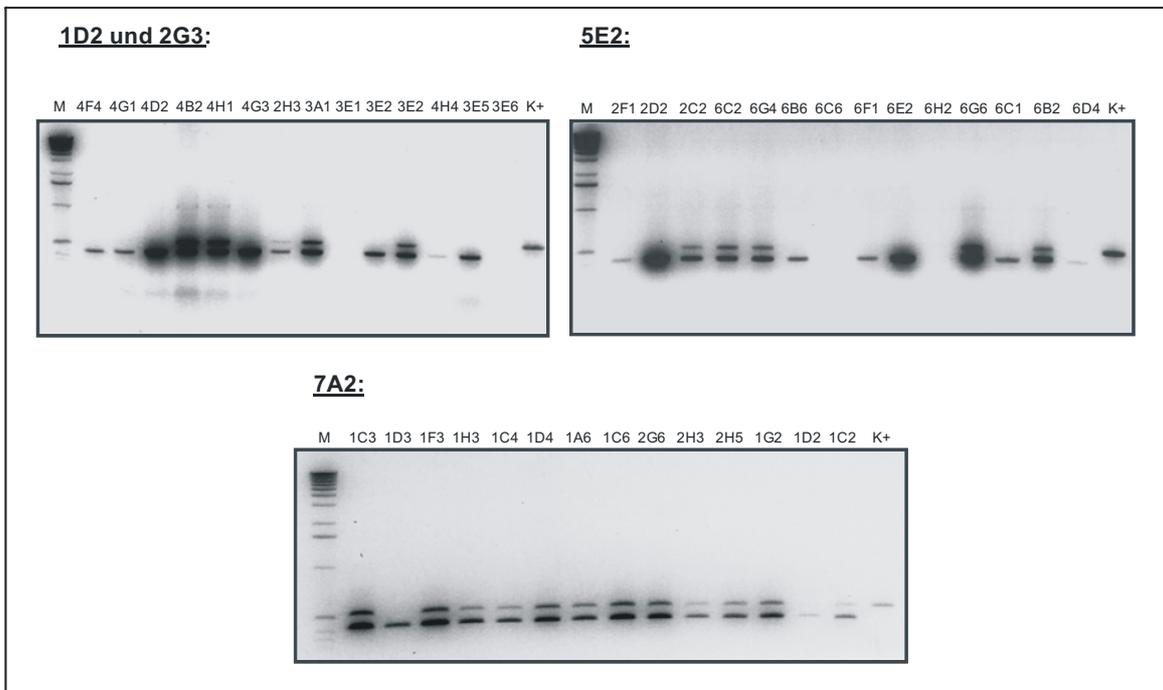
#### 5.2.3.1 Screening

Bei dieser Screening-PCR wurde durch den Einsatz der 3 Primer *EQ-Genotyp\_for*, *EQ-Genotyp\_rev* und *RE2\_rev* nachgewiesen, dass die isolierten Kolonien keine Selektionskassette mehr enthalten.



**Abbildung 5-39 Strategie des PCR-Screenings nach dem Zweiten Targeting.** Je nach Genotyp erhält man mit dieser 3-Primer-PCR Produkte definierter Größe, die in einem Agarosegel gut voneinander zu unterscheiden sind (rechts).

Bei keinem der untersuchten Klone ist eine Bande bei 324 bp zu erkennen, die entstanden wäre, wenn *RE2\_rev* an die Selektionskassette gebunden hätte (L2 in Abbildung 5-39).



**Abbildung 5-40 Ergebnis der Screening-PCR nach dem Zweiten Targeting.** Alle Klone, die auf dem Gel die Doppelbande 439/544 bp aufweisen, werden als positiv angesehen; Positivkontrolle (K+): in-vitro-Cre-Rekombinase-Ansatz.

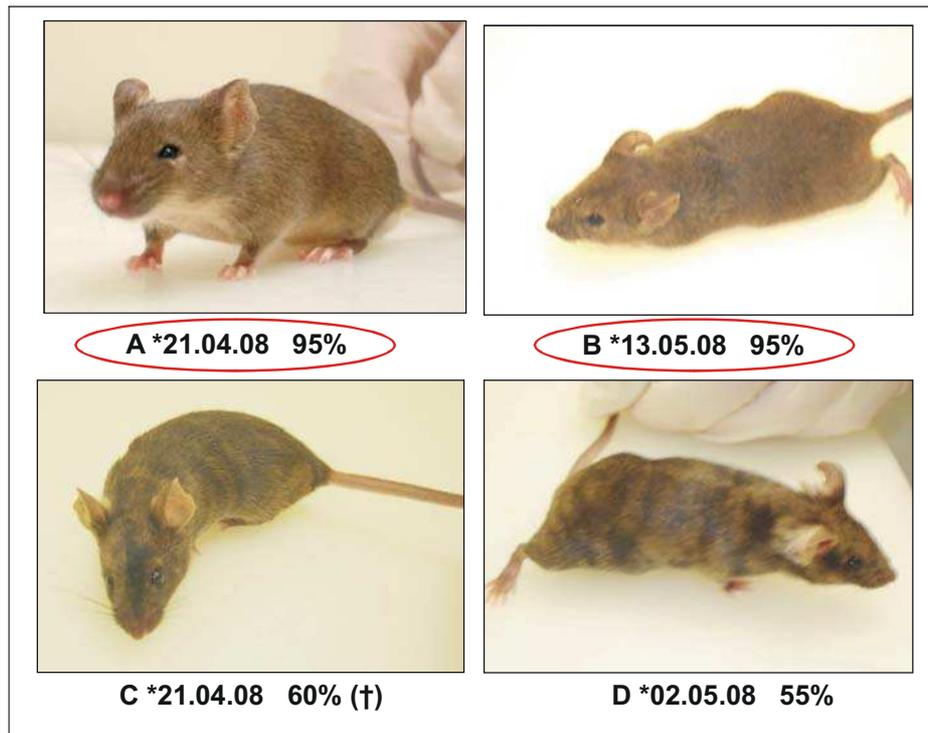
Alle Klone, die für die Blastozysteninjektion herangezogen wurden, zeigen auf den Gel-Bildern in Abbildung 5-40 eine Doppelbande von 439 bp bzw. 544 bp. Diese ES-Zell-Kolonien wurden auf eine Fläche von 9 cm<sup>2</sup> (ein 6-well) hochgezogen und dann als Gefrierstocks in Flüssigstickstoff bis zur Blastozysteninjektion gelagert.

## 5.2.4 Blastozysteninjektion

Positive ES-Zell-Klone aus dem Zweiten Targeting wurden ca. 2 Tage vor Injektion aufgetaut und ausgesät. Tabelle 5-3 gibt eine Zusammenfassung der verschiedenen Parameter, wie Anzahl der Blastozysten, die pro Klon injiziert wurden, die Passagennummer (P) zum Zeitpunkt der Injektion, Nachkommen und Chimären.

**Tabelle 5-3: Tabellarische Zusammenfassung der EQ-Blastozysteninjektionen.** Aus zwei (markiert) dieser vier Chimären konnten heterozygote Nachkommen erzeugt werden.

Prim. ES-Zell-Klon	Sek. ES-Zell-Klon	Injizierte Blastozysten	Nachkommen	Chimären
1D2	4B2 (P25)	13	3	
2G3	3H4 (P24)	15		
	3A1 (P24)	15	5 (†)	
5E2	2C2 (P25)	8	7	1 (*02.05.08 55%)
	6C2 (P24)	26	2 + 4 (†)	
	6B2 (P24)	23		
	6G4 (P24)	5	2 + 1 (†)	
7A2	1C3 (P25)	15	3	
	1F3 (P24)	25	2	
	1H3 (P24)	15		
	1C4 (P24)	13		
	1D4 (P25)	16		
	1A6 (P26)	10	2	1 (*13.05.08 95%)
	2G6 (P25)	9	2	
	2H3 (P25)	15	4	2 (*21.04.08 95% 60% (†))
	2H5 (P25)	9		
	1G2 (P25)	19		
	1C2 (P25)	23		



**Abbildung 5-41** Fotos der vier EQ-Chimären. Sowohl Chimäre A und B erbrachten heterozygote Nachkommen.

Die Ammen-Mäuse brachten insgesamt 4 chimäre Nachkommen hervor, wovon 2 einen sehr hohen Chimaritätsgrad (um 95%) aufwiesen (siehe Abbildung 5-41).

Um die Keimbahngängigkeit der Mutation zu testen, wurden alle Chimären im Alter von 7-8 Wochen mit C57/Bl6-Weibchen verpaart, wobei sich eines der Chimären (D) als infertil herausstellte, aber ein Teil der Nachkommen von den Chimären A und B agoutifarben waren. Nach einer Genotypisierung (Abbildung 5-42) konnte deren heterozygoter Genotyp ( $\text{Ca}_v1.2^{\text{EQ(KI/+)}}$ ) bestätigt werden. Diese Heterozygoten wurden auch hier untereinander verpaart, um eine homozygote Mauslinie zu erhalten, mit der man die Phänotypisierung starten konnte.

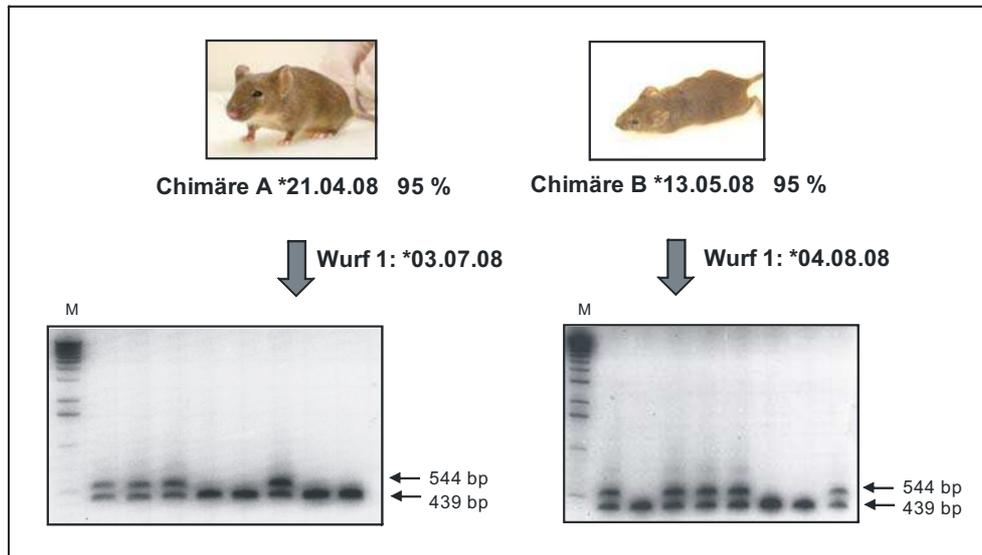
## 5.2.5 Untersuchung der $\text{Ca}_v1.2^{\text{EQ}}$ -Mäuse

### 5.2.5.1 Genotypisierung

Wie die Strategie in Abbildung 5-39 zeigt, bleibt nach dem Entfernen der Selektionskassette noch ein kleiner, unbedeutender Teil des Targeting-Vektors (Schnittstellen der MCS, eine loxP-Sequenz) im Genom zurück. Diesen Größenunterschied macht man sich zunutze, wenn man knock-in- oder Wildtyp-Allel identifizieren möchte. Durch die Primerkombination *EQ-Genotyp\_for* und *EQ-Genotyp\_rev* entsteht durch die Genotypisierungs-PCR (4.5.1) vom

knock-in-Allel ein 544 bp großes Produkt, vom Wildtyp-Allel ein 439 bp großes Fragment. Diese kann man anhand eines 2%igen Agarose-Gels gut voneinander unterscheiden.

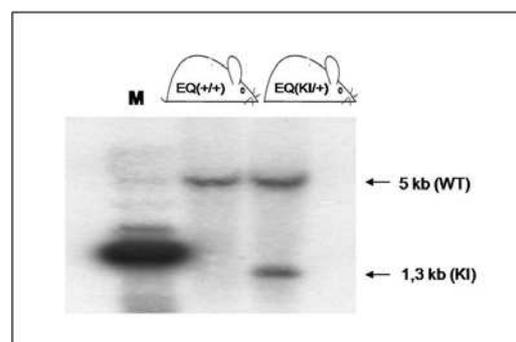
Abbildung 5-42 zeigt ein Genotypisierungsbeispiel der Nachkommen aus dem ersten Wurf von Chimäre A bzw. Chimäre B. Nachkommen mit Doppelbande können als Heterozygote angesehen und für die Weiterzucht verwendet werden.



**Abbildung 5-42 Etablierung der  $Ca_v1.2^{EQ}$ -Mauslinie aus den Nachkommen von entweder Chimäre A oder Chimäre B.** Beide Chimären tragen das veränderte Gen in ihrer Keimbahn und können daher heterozygote Nachkommen hervorbringen. Für die Weiterzucht der Mauslinie  $Ca_v1.2^{EQ}$  wurden Nachkommen von Chimäre B herangezogen.

### Southern-Blot mit genomischer DNS

Um den heterozygoten Genotyp  $Ca_v1.2^{EQ(KI/+)}$  mit Southern-Blot zu bestätigen, wurde nach der schon unter 5.2.2.1 vorgestellten Strategie vorgegangen. Nach DNS-Isolierung aus Schwanzgewebe wurde die Southern-Blot-Analyse, wie unter 4.5.2 beschrieben, durchgeführt. Die DNS der heterozygoten  $Ca_v1.2^{EQ(KI/+)}$ -Maus zeigt die erwartete Doppelbande: die WT- (5 kb) und die KI- (1,3 kb) Bande (Abbildung 5-43).

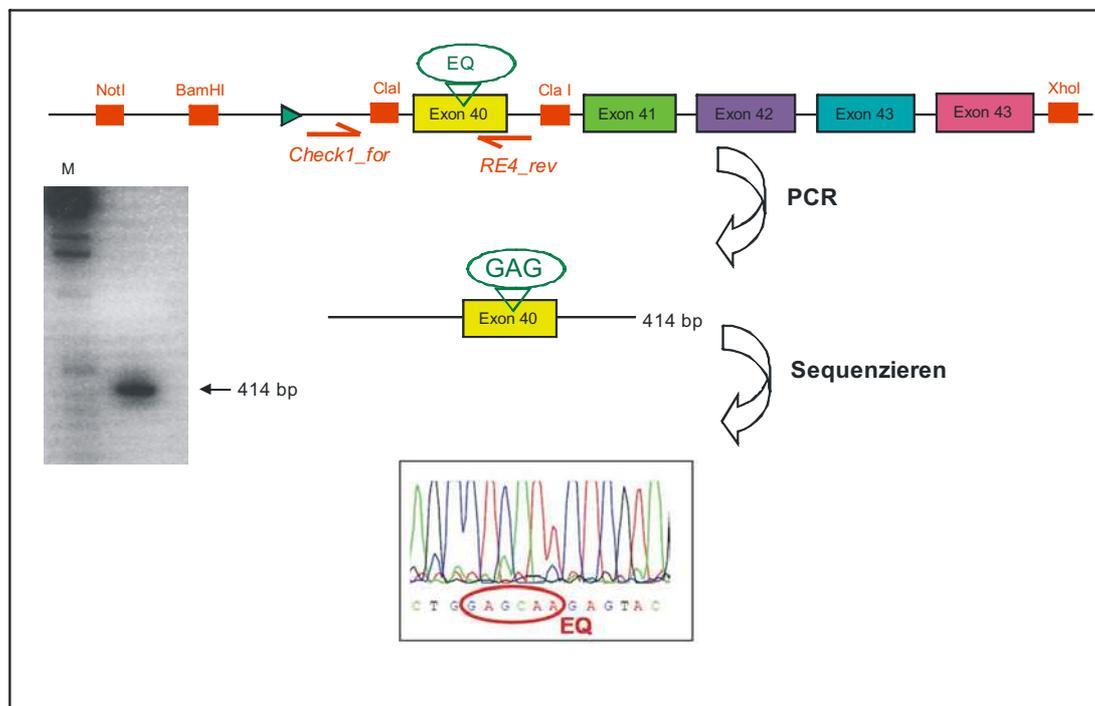


**Abbildung 5-43 Southern-Blot als Bestätigung des knock-in-Genotyps.** Beim heterozygoten Genotyp (abgekürzt  $EQ(KI/+)$ ) erscheinen beide Banden, WT und KI. Der Wildtyp ( $EQ(+/+)$ ) zeigt nur die Wildtyp-Bande (5 kb).

### 5.2.5.2 Nachweis der Mutation

#### Sequenzüberprüfung der genomischen DNS

Für die Mutationsbestätigung (IQ/EQ) auf Sequenzebene wurde zunächst mittels der Primerkombination *Check1\_for* und *RE4\_rev* ein 414 bp großes Fragment amplifiziert. Da *Check1\_for* lediglich zu einem Bereich auf dem knock-in-Allel komplementär ist, kann gewährleistet werden, dass nur von diesem Allel ein Produkt entsteht. Somit ist für den Sequenznachweis heterozygoter Nachkommen keine Trennung der beiden Allele nötig. Nach Gelaufreinigung und -elution kann mit der dadurch gewonnenen DNS und dem Sequenzierprimer *EQ\_E40\_for* die Sequenz ermittelt und letztlich die Mutation IQ/EQ bestätigt werden.



**Abbildung 5-44 Strategie zur Sequenzanalyse der genomischen DNS aus  $Ca_v1.2^{EQ(KI/+)}$ -Mäusen.** Da Primer *Check1\_for* in einem kurzen Bereich bindet, der vom Targeting-Vektor stammt, erhält man folglich nur vom knock-in-Allel ein Amplifikat (414 bp), welches auf die Mutation hin überprüft werden kann.

### 5.2.5.3 Primäre Grundcharakterisierung

Bis zum jetzigen Zeitpunkt (Stand: Ende Oktober 2008) konnten aus  $Ca_v1.2^{EQ(KI/+)} \times Ca_v1.2^{EQ(KI/+)}$  Verpaarungen 8  $Ca_v1.2^{EQ(+/+)}$  (Wildtypen) und 18  $Ca_v1.2^{EQ(KI/+)}$  (heterozygote) Nachkommen vermerkt werden; es wurde bisher keine homozygote  $Ca_v1.2^{EQ(KI/KI)}$ -Maus identifiziert.

## 6 Diskussion

Die kontraktile Funktion der Herzmuskelzelle wird in erster Linie durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  gesteuert (Berridge, 2003; Bers and Despa, 2006; Ringer, 1882; Song *et al.*, 2005). Diese erfüllt in Kardiomyozyten drei wichtige Aufgaben: Erstens vermittelt Kalzium die Kopplung zwischen elektrischer Erregung und Kontraktion der Zelle, indem das in das Zytosol einströmende Kalzium große Kalziumvorräte aus dem SR freisetzt (Beuckelmann and Wier, 1988), wodurch die  $[Ca^{2+}]_i$  auf bis zu 100  $\mu$ M ansteigt. Zweitens triggert das Absinken der zytosolischen Kalziumkonzentration auf weniger als 200 nM die Relaxation des kontraktile Apparates und damit den Ruhezustand der Herzmuskelzelle. Drittens wird die Kraft der Kontraktion durch die Höhe des Kalziumkonzentrationsunterschiedes (Kalziumtransient) zwischen der Kontraktions- und Relaxationsphase bestimmt.

An der Regulation der  $[Ca^{2+}]_i$  sind maßgeblich L-Typ Kalziumkanäle beteiligt (Bers, 2002; Bers and Despa, 2006; Richard *et al.*, 2006). Auf molekularer Ebene bestimmen sie in den ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten das Aktionspotential in seiner Amplitude, Länge und Refraktärzeit (Hagiwara *et al.*, 1988). Regelmäßiges Zustandekommen dieser Aktionspotentiale ist unerlässlich für eine gesunde Herzfunktion (Richard *et al.*, 2006). Während des Aktionspotentials wird ein Kalziumeinstrom durch die L-Typ Kalziumkanäle induziert, wodurch es zur Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (*calcium induced calcium release*, CICR) kommt (Fabiato and Fabiato, 1979), was wiederum der Schlüssel der Exzitations-Kontraktionskopplung ist. Es lässt sich also annehmen, dass die Funktion dieser L-Typ Kalziumkanäle im Herzen ( $Ca_v1.2$ -Kanäle) für eine gesunde Herzfunktion sehr wichtig sein könnte. Störungen im Prozess des Öffnens und Schließens des Kanals könnten daher an häufigen Pathologien der Herzfunktion wie Herzinsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen beteiligt sein.

In der vorliegenden Arbeit wird beschrieben, wie mit Hilfe der Gen-Targeting-Methode (Capecchi, 1989; Thomas and Capecchi, 1987) und des Cre/loxP-Systems (Rajewsky *et al.*, 1996) zwei knock-in Mauslinien generiert wurden. Hiermit wurde die Grundlage geschaffen, die zwei wesentlichen Regulationsprozesse des  $Ca_v1.2$ -Kanals, Inaktivierung und Fazilitierung, *in vivo* zu analysieren und ihre Bedeutung in einen physiologischen Gesamtzusammenhang zu bringen.

## 6.1 Generierung der Mauslinien

Nach Abschluss des Mausgenomprojekts (Waterston *et al.*, 2002) ist die komplette Sequenz in Online-Datenbanken verfügbar. Die Kenntnis der *CACNA1C*-Gens-Sequenz war Voraussetzung für die Entwicklung der knock-in-Strategie zur Erstellung der beiden im Rahmen dieser Arbeit generierten Mauslinien. Ziel der anschließenden molekularbiologischen Arbeitsschritte war die gezielte Einführung von Mutationen in die Sequenz des *CACNA1C*-Gens. Hierzu musste zunächst ein Gen-Targeting-Vektor hergestellt werden, der mit einer von loxP-Sequenzen flankierten Selektionskassette versehen wurde. Für ein erfolgreiches Gen-Targeting sind große Homologiebereiche erforderlich (Hasty *et al.*, 1991), was die enormen Größen (15,7 kb bzw. 15,2 kb) der beiden Targeting-Vektoren erklärt.

Im Anschluss konnte durch Elektroporation diese mutierte DNS in Embryonale Stammzellen eingeschleust werden, um hier Homologe Rekombination zu gewährleisten. Nach Selektion mit Geneticin (G418) wurden 685 ( $\text{Ca}_v1.2^{\text{SF}}$ -Mauslinie) bzw. 1024 Kolonien ( $\text{Ca}_v1.2^{\text{EQ}}$ -Mauslinie) untersucht und letztlich über PCR- und Southern-Blot-Analyse 3 bzw. 4 Klone identifiziert, bei denen die Vektor-DNS an der richtigen Stelle mit der ES-Zell-DNS rekombiniert hatte. Diese Zahlen liegen im Rahmen der in der Literatur angegebenen Rekombinationsrate von 0,1-1% (Thomas *et al.*, 1986), was für ein effizientes Gen-Targeting und einen gut zugänglichen Locus des *CACNA1C*-Gens spricht. Durch Sequenzierung konnten die beiden Mutationen bestätigt werden, wobei eine Strategie verfolgt wurde, die eine Trennung der beiden Allele ermöglichte.

Im nächsten Schritt wurden die positiven Klone mit einem Vektor transfiziert, der transient die Cre-Rekombinase exprimiert, wodurch es zur Entfernung des Selektionsmarkers aus dem ES-Zell-Genom kam. Nach Ganciclovir-Selektion wurden ausschließlich Klone isoliert, die keine Selektionskassette mehr besaßen, was durch PCR-Analyse nachgewiesen werden konnte. Dies bestätigte somit die *in silicio* entwickelte Targeting-Strategie und zeigte, dass das hier angewandte Cre/loxP-System auch auf gewünschte Weise in ES-Zellen funktioniert. In mehreren Sitzungen (15 bzw. 20 Tage) wurden daraufhin Blastozysten-Injektionen mit ausgewählten Klonen vorgenommen. Als Richtwert für die Menge der zu injizierenden ES-Zellen pro Blastozyste wurde der von Nagy (Nagy, 2003) empfohlene Wert von 8-15 ES-Zellen pro Blastozyste übernommen. Daraus resultierten letztlich 9 ( $\text{Ca}_v1.2^{\text{SF}}$ -Mauslinie) bzw. 4 ( $\text{Ca}_v1.2^{\text{EQ}}$ -Mauslinie) chimäre Nachkommen mit teilweise hohem Chimäritätsgrad. Dass es hier zu solchen Schwankungen in der Chimären-Anzahl kam, kann mehrere Gründe haben. Zum einen könnten die ES-Zellen, die injiziert wurden, von unterschiedlich guter Qualität in Bezug auf Totipotenz sein. Zudem wurde festgestellt, dass nicht alle Weibchen, die einen Plug aufweisen, auch wirklich „hormonbereit für Schwangerschaft“ sind, die erfolgreich mit Blastozysten transplantierten Mäuse also gar nicht trächtig werden können. Ein weiterer

Punkt ist, dass selbst wenn die Weibchen trächtig sind, es sehr oft auch zu Aborten während der Tragezeit kommt. Nicht selten wird der Wurf gleich nach der Geburt von der Mutter wieder gefressen.

Alle Chimären wurden ab einem Alter von 8 Wochen mit C57/Bl6 Wildtyp-Tieren verpaart, um die Keimbahntransmission der Mutation nachzuweisen. Eine Abschätzung des Chimärismus über die Zusammensetzung des Fells erlaubt Schlüsse auf den Beitrag der mutierten ES-Zellen am Gesamtorganismus. Je höher der Anteil der mutierten ES-Zellen an der Fellfarbe ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass auch die Keimbahnen von diesen Zellen gebildet werden und damit eine Weitervererbung stattfinden kann. Eine absolute Aussage ist dadurch allerdings nicht möglich. So wurde bisher einerseits eine Keimbahntransmission bei Tieren mit 30% oder weniger Fellchimärismus beobachtet, während andererseits bei hochchimären Mäusen (80-100%) keine Vererbung der Mutation vorhanden war (Suzuki *et al.*, 1997). Auch bei der Verpaarung der Chimären für die  $Ca_v1.2^{SF}$ -Linie wurde dieses beschriebene Phänomen beobachtet. Bei Geschwister-Chimären mit dem gleichen Chimäritätsgrad (95%) aus dem gleichen Wurf, somit mit dem gleichen ES-Zell-Klon injiziert, brachte das eine Individuum heterozygote Nachkommen hervor, das Geschwistertier allerdings nicht. Bei den EQ-Chimären vererbten alle hochchimären Nachkommen (95%) die Mutation weiter. Die Zusammensetzung der Fellfarbe stellt somit ein wichtiges aber keinesfalls endgültiges Kriterium für die Wahrscheinlichkeit einer Keimbahntransmission dar. Letztendlich kann diese nur durch Verpaarung mit Wildtyp-Mäusen und anschließender Genotypisierung der Nachkommen nachgewiesen werden.

Das Alter der Stammzellen scheint sich negativ auf den Erhalt der Totipotenz und letztlich die Keimbahngängigkeit auszuwirken. Nagy *et al.* berichten von einer Verschlechterung der Qualität und somit der Keimbahngängigkeit, wenn die Zellen öfter als 15-20 mal passagiert wurden (Nagy *et al.*, 1993). Auf der anderen Seite wurde aber auch mit Zellen, die sich bereits in der 32. Passage befanden, eine Keimbahntransmission erreicht (Fedorov *et al.*, 1997). Im Falle der hier erzeugten Chimären befanden sich die ES-Zellen zum Zeitpunkt der Injektionen in der 26. bzw. 24.-26. Passage.

### 6.1.1 Anzucht der $Ca_v1.2^{SF}$ -Mauslinie und Analyse

Nachdem  $Ca_v1.2^{SF(KI/+)}$ -Mäuse identifiziert worden waren, wurde begonnen, heterozygote Tiere der F1-Generation untereinander zu verpaaren, um letztendlich homozygote Nachkommen zu erhalten. Ein Genotyp-Vergleich aller Nachkommen erlaubt die Aussage, dass der Vererbungsgang dieser Linie dem Mendelschen Gesetz (Homozygot:Heterozygot:Wildtyp 25:50:25) folgt. Demnach kommen auch lebensfähige homozygote Nachkommen zur Welt und erreichen das adulte Stadium. Solche homozygoten

Mäuse zeigen zudem keine Veränderungen in ihrem Körpergewicht. Durch die Analyse auf mRNA- und Proteinebene konnten keine Veränderungen in der  $Ca_v1.2$ -Expression festgestellt werden. Die Veränderung in der DNS-Sequenz, die Doppelmutation S1512/1570A, hat demnach entweder keine großen Auswirkungen auf die  $Ca_v1.2$ -Regulierung, die durch diese Mutation hervorgerufenen Defizite unterliegen einem gut funktionierenden Gegenregulationsmechanismus oder dem Regulationsmechanismus der CDF kommt unter Basalbedingungen ohne besondere körperliche Belastung keine Bedeutung zu.

Die genauere Analyse erbrachte einen signifikanten Anstieg des Verhältnisses Herzgewicht/Körpergewicht (HW/BW). Dies könnte ein Indiz für eine vorhandene Herzhypertrophie sein. Auch der Expressionsanstieg von *ANP* bestätigt diese Vermutung.

Laut Theorie soll bei den homozygoten  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ -Mäusen die CDF nicht mehr stattfinden können. Das bedeutet, dass diese Tiere bei einem Anstieg der Herzfrequenz, also bei körperlicher Belastung, nicht mehr in der Lage sind, einen ausreichenden Kalziumeinstrom über L-Typ Kalziumkanäle zu erreichen. Daraus könnte eine unzureichende  $[Ca^{2+}]_i$  resultieren, wodurch eine gestörte elektromechanische Kopplung zustande kommt. Durch das Ausbilden einer Hypertrophie könnte versucht werden, dieses Defizit zu kompensieren.

### 6.1.2 Anzucht der $Ca_v1.2^{EQ}$ -Mauslinie und Analyse

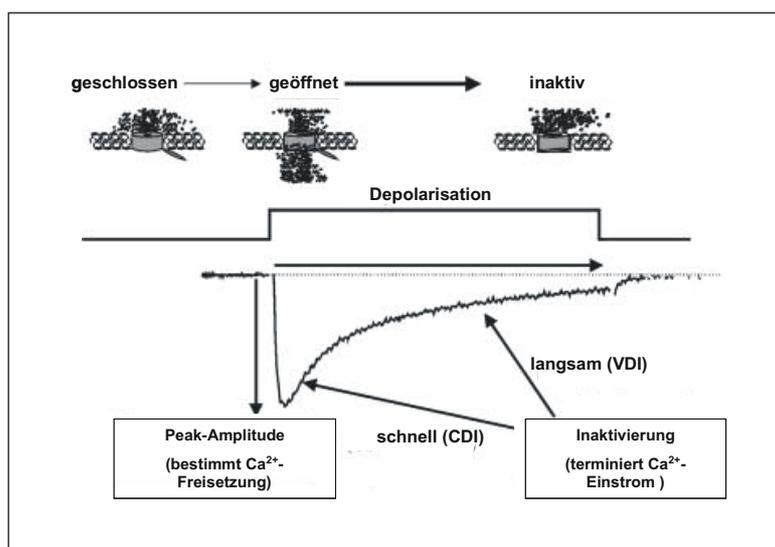
Aus Verpaarung heterozygoter Mäuse der F1-Generation, die das mutierte IQ/EQ-Motiv in einem Allel tragen, konnten bislang keine homozygoten Nachkommen identifiziert werden. Die Vermutung liegt nahe, dass homozygote  $Ca_v1.2^{EQ(KI/KI)}$ -Mäuse einen derart schwerwiegenden Phänotyp haben, dass sie nicht lebensfähig sind und eventuell noch während ihrer embryonalen Entwicklung sterben. Dies könnte darin begründet sein, dass es durch die fehlende Inaktivierung zu einem Kalziumüberschuss in der Zelle kommt. Abgesehen von der toxischen Wirkung des Kalziums, wird es den Zellen zudem nicht mehr möglich sein, ein normales Aktionspotential und somit eine physiologische Kontraktion ausbilden zu können.

## 6.2 Autoregulation der L-Typ Kalziumkanäle

### 6.2.1 Inaktivierung

Um einen gleichmäßig rhythmischen Ablauf von Kontraktions- und Relaxationsphasen im Herzen zu garantieren, muss die kalziumabhängige Plateauphase des kardialen Aktionspotentials terminiert werden (Bodi *et al.*, 2005). Für diesen Prozess ist die Inaktivierung der spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanäle essentiell. Dies verdeutlicht die große Bedeutung der Autoregulationsform Inaktivierung in Zusammenhang mit dem Erhalt der intrazellulären Kalziumhomöostase und des physiologischen Herzrhythmus.

Damit ein Zuviel an Kalzium in der Zelle verhindert werden kann, hemmt das einströmende Kalzium in einem negativen Feedback-Mechanismus den Eintritt von noch mehr Kalzium. Dies wird kalziumabhängige Inaktivierung (CDI) genannt und wurde erstmals vor 30 Jahren an Neuronen beschrieben (Brehm and Eckert, 1978; Tillotson, 1979). Neben dieser kalziumabhängigen Inaktivierung, die dominiert, tritt auch spannungsabhängige Inaktivierung (VDI) auf (Brette *et al.*, 2004; Cens *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass CDI vom Kalziumeinstrom durch den L-Typ Kalziumkanal selbst (oder zusätzlich durch aus dem SR freigesetztes Kalzium) ausgelöst wird (Delgado *et al.*, 1999; Linz and Meyer, 2000) und dies die erste, schnelle Phase der Inaktivierung verursacht. Die zweite, langsamere Phase der Inaktivierung ist die VDI (Sun *et al.*, 1997) (siehe Abbildung 6-1).



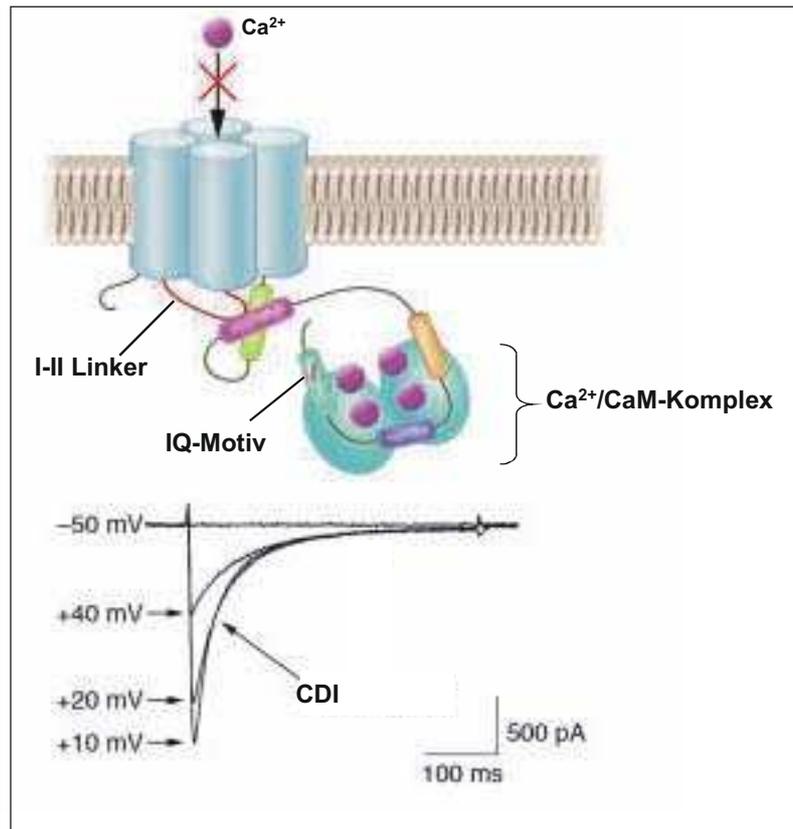
**Abbildung 6-1 Schematische Darstellung der Ereignisse während der Inaktivierung von L-Typ Kalziumkanälen.** Durch Depolarisation wird der spannungsabhängige L-Typ Kalziumkanal geöffnet und Kalzium strömt in die Zelle. Dauert die Depolarisation an, dann wird dieser L-Typ Kalziumkanal inaktiviert. Der Prozess der Inaktivierung geschieht in zwei Phasen. Zunächst erfolgt die CDI kalziumabhängig, zeitversetzt kommt es später zur VDI, wodurch es letztlich zum Schließen des Kanals und dadurch zum Stopp des Kalziumeinstroms kommt. (Abbildung modifiziert, aus Benitah *et al.*, 2002)

Calmodulin wurde als Kalziumsensor identifiziert, der verantwortlich für die CDI ist (Peterson *et al.*, 1999; Zuhlke *et al.*, 1999). Dieses bipolare Molekül kann über seine beiden Sensoren (Aminoterminus und Carboxyterminus) globale und lokale  $[Ca^{2+}]_i$ -Veränderungen wahrnehmen und mit dem Auslösen unterschiedlicher Downstream-Mechanismen (z.B. Gen-Transkription und CDI) reagieren (Mori *et al.*, 2004; Tadross *et al.*, 2008).

Pitt *et al.* stellten ein mögliches Modell vor, wie Calmodulin CDI auslösen könnte: bei niedrigem Kalziumspiegel ist Calmodulin an den Carboxyterminus angelagert. Steigt die Kalziumkonzentration, dann verändert Calmodulin seine Konformation und dessen Carboxyterminus interagiert mit dem IQ-Motiv des Kanals (Pitt *et al.*, 2001). Mutationsstudien mit HEK293 Zellen zeigten, dass bei Mutation des Carboxyterminus von Calmodulin sich keine CDI mehr ausbilden kann. Das gleiche Ergebnis zeigt sich, wenn Calmodulin aufgrund von Mutationen seines Carboxy- und Aminoterminus gar kein Kalzium binden kann (Peterson *et al.*, 1999; Zuhlke *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass zusätzlich zum  $Ca_v1.2$ -Carboxyterminus der ins Zytoplasma hineinragende I-II-Linker des Kanals für die Inaktivierung bedeutsam sein könnte. Durch Bindung des Carboxyterminus (eventuell am EF-Hand-Motiv) an diesen I-II-Linker könnte die Kanalpore verschlossen werden (Cens *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004).

Wichtige Studien, die der Grundstein der vorliegenden Arbeit waren, zeigten, dass IQ-Motive von Proteinen die Konsensusbindungssequenz für Calmodulin darstellen (Rhoads and Friedberg, 1997) und dass speziell das IQ-Motiv von  $Ca_v1.2$  für die Inaktivierung von essentieller Bedeutung ist (Zuhlke and Reuter, 1998). Weitere Arbeiten bestätigten dies und identifizierten das Isoleucin im IQ-Motiv als die für die Inaktivierung verantwortliche Aminosäure des Carboxyterminus (Lee *et al.*, 2006; Zuhlke *et al.*, 1999). Mutierte man das Isoleucin zu Glutamat (I zu E), dann sinkt die Bindungswahrscheinlichkeit von Calmodulin an den Carboxyterminus deutlich (Zuhlke *et al.*, 2000) und es kommt weder zu CDI noch zu CDF (Lee *et al.*, 2006; Zuhlke *et al.*, 1999).

Dadurch, dass die im Rahmen dieser Arbeit generierten  $Ca_v1.2^{EQ(KI/KI)}$ -Mäuse kein Isoleucin mehr in ihrem IQ-Motiv tragen, sondern ein Glutamat, wird bei diesen Tieren keine Calmodulinbindung an das IQ-Motiv stattfinden können. Somit wird wahrscheinlich weder CDI noch CDF möglich sein. Die verheerenden Folgen dieser Mutation im IQ-Motiv und somit auch der Abschaffung der CDI wird durch die Tatsache bestätigt, dass bis dato keine homozygote  $Ca_v1.2^{EQ(KI/KI)}$ -Maus identifiziert werden konnte.



**Abbildung 6-2 Mechanismus der CDI.** Während der CDI bindet Kalzium an Calmodulin, welches daraufhin seine Konformation ändert. In seinem neuen Zustand kann nun der  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex mit dem IQ-Motiv interagieren. Die Folge ist CDI des L-Typ Kalziumkanals. (Abbildung modifiziert, aus Bodi et al., 2005)

## 6.2.2 Fazilitierung

Beim Menschen führt die Erhöhung der Herzfrequenz in der Regel zu einer Steigerung der myokardialen Kontraktilität (Bowditch, 1871). Dieses Phänomen wird als positive Frequenz-Kraftbeziehung oder nach dem Erstbeschreiber der Relaxationsstörung als „Bowditch-Effekt“ bezeichnet. Auf zellulärer Ebene wurde bei Steigerung der Herzfrequenz eine Zunahme des Kalziumkonzentrationsgefälles zwischen Systole und Diastole gemessen (Hattori et al., 1991). Dieses Phänomen soll auf einem vermehrten Kalziumeinstrom aus dem Extrazellularraum (Koch-Weser and Blinks, 1963) (oder auch auf einer Aktivitätszunahme der SERCA (Sarko-/Endoplasmatische Retikulum Kalzium-ATPase)) (Schillinger et al., 1998) beruhen. Die Folge des verstärkten Kalziumeinstroms ist eine Erhöhung der Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum über Ryanodin-Rezeptoren (Sham et al., 1995), auch als kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung (CICR) beschrieben (Fabiato and Fabiato, 1979). Es kommt zur Kontraktion der Myozyten und somit zur Systole.

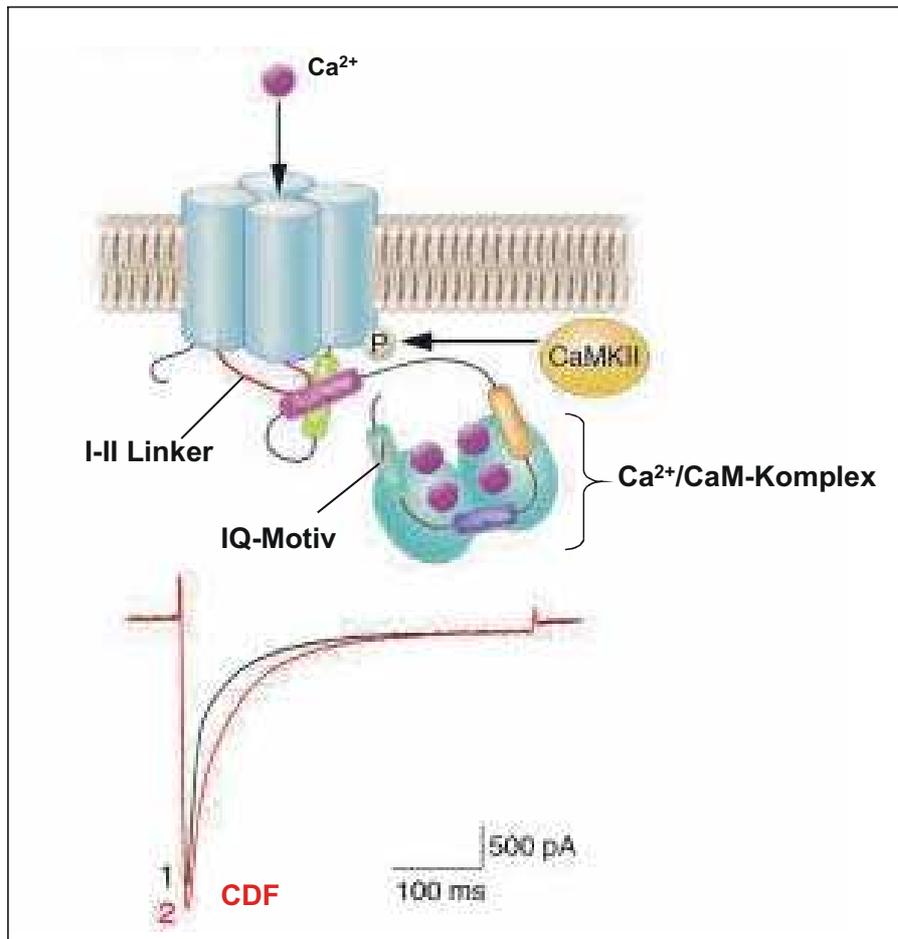
Als mögliche molekulare Ursache für die im Rahmen des Bowditch-Effektes stattfindende Erhöhung des Kalziumeinstromes könnte die CDF von L-Typ Kalziumkanälen angesehen werden (Anderson *et al.*, 1994).

Noble und Shimoni beobachteten das Auftreten von Fazilitierung zum ersten Mal an Froschherzmuskelzellen. Sie konnten zeigen, dass nach häufigen Stimulationen (Noble and Shimoni, 1981a) oder auch nach einem starken depolarisierenden Präpuls (Noble and Shimoni, 1981b) der Kalziumeinstrom ( $I_{Ca}$ ) zunimmt. Dieses Phänomen wurde später auch an Säuger-Kardiomyozyten beschrieben und wurde kalziumabhängige bzw. spannungsabhängige Fazilitierung (CDF bzw. VDF) benannt (Lemaire *et al.*, 1998; Marban and Tsien, 1982; Richard *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass CDF abhängig von einer Phosphorylierung des Kanals an der  $\alpha_1$ -Untereinheit ist. Später konnte die Proteinkinase CaMKII dafür verantwortlich gemacht werden (Hudmon *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; McCarron *et al.*, 1992; Xiao *et al.*, 1994; Yuan and Bers, 1994).

Vorversuche zu dieser Arbeit haben gezeigt, dass es die Serine S1512 und S1570 sind, die während der CDF von  $Ca_v1.2$  Kanälen durch die CaMKII phosphoryliert werden (Lee *et al.*, 2006). Mutiert man die beiden Serine zu Alaninen *in vitro*, so können diese Stellen nicht mehr phosphoryliert werden und die Fazilitierung ist deutlich beeinträchtigt (Lee *et al.*, 2006). Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe deuten daraufhin, dass zusätzlich zu den vermuteten Phosphorylierungsstellen in der  $Ca_v1.2$ -Untereinheit (S1512 und S1570), auch noch Phosphorylierungsstellen in der  $\beta$ -Untereinheit für die Fazilitierung von Bedeutung sind (Grueter *et al.*, 2006). Möglicherweise trägt die Phosphorylierung beider Untereinheiten zum Autoregulationsmechanismus der CDF bei.

Da die im Rahmen dieser Arbeit generierten Tiere der  $Ca_v1.2^{SF}$ -Mauslinie anstatt der beiden Serine S1512 und S1570 nun Alanine tragen, kann die  $Ca_v1.2$ -Untereinheit an diesen Stellen nicht mehr durch die CaMKII phosphoryliert werden. Möglicherweise wird die dadurch verursachte CDF nicht mehr auftreten können. Ist der Regulationsmechanismus der CDF ausgeschaltet, so werden die Mäuse dieser Linie nicht mehr in der Lage sein, auf eine erhöhte Herzfrequenz mit gesteigerter Kontraktionskraft zu reagieren. Der oben beschriebene Bowditch-Effekt wird vermutlich ausbleiben. Unter Belastung wird somit ein erhöhter Herzschlag möglicherweise nicht mehr mit einer gesteigerten Kontraktionsstärke durch Fazilitierung und somit erhöhter Auswurfleistung einhergehen. Die Vermutung liegt nahe, dass sich diese Tiere nicht an Belastungen anpassen können und mit Arrhythmien oder Ausbildung einer Herzinsuffizienz reagieren.

Somit ist mit der Generierung der  $Ca_v1.2^{SF}$ -Mauslinie ein wichtiger Grundstein geschaffen, um die genaue physiologische Bedeutung des Bowditch-Effektes für die kardiale (Patho-) Physiologie *in vivo* aufzuklären.



**Abbildung 6-3 Mechanismus der CDF.** Während der CDF wird die CaMKII durch den  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex aktiviert. Daraufhin kommt es zur Phosphorylierung des L-Typ Kalziumkanals, was mit CDF einhergeht. (Abbildung modifiziert, aus Bodi *et al.*, 2005)

## 6.3 Pathophysiologie in Verbindung mit dem L-Typ Kalziumkanal

### 6.3.1 Timothy-Syndrom

Das Timothy-Syndrom wurde erstmals Anfang der 90er Jahre von Reichenbach und Marks als Herz-Erkrankung (Long-QT-Syndrom 8) beschrieben (Marks *et al.*, 1995; Reichenbach *et al.*, 1992). Sehr schnell musste festgestellt werden, dass bei dieser Erkrankung nicht nur das Herz, sondern auch viele andere Organe betroffen sind. Zudem wurde herausgefunden, dass hier eine gestörte Regulation des L-Typ Kalziumkanals vorliegt. In allen bisher untersuchten Patienten wurden Mutationen im *CACNA1C*-Gen gefunden (G406R oder G402S) (Splawski *et al.*, 2004). Diese Mutationen im  $\text{Ca}_v1.2$ -Kanal verursachen einen völligen Verlust der VDI (Feldman *et al.*, 2005; Splawski *et al.*, 2005; Splawski *et al.*, 2004), was möglicherweise mit einem Überschuss der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  einhergehen könnte. Es konnte sowohl eine Zunahme des Kalziumeinstroms, als auch eine Verlängerung der

Repolarisationsphase des kardialen Aktionspotentials (APD; *action potential duration*), festgestellt werden. Die Folge ist ein erhöhtes Risiko für Arrhythmien und für den damit verbundenen plötzlichen Herztod (Splawski *et al.*, 2005).

Erxleben *et al.* konnten zeigen, dass durch die Mutation G439R, die sich im Segment 6 von Domäne 1 des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals befindet, eine Erkennungssequenz für die CaMKII entsteht. Der Kanal wird folglich (zusätzlich zum Phänomen der gestörten VDI) vermehrt phosphoryliert. Somit befindet er sich häufiger in *mode2*. Es lässt vermuten, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration bei diesen Patienten auch noch aufgrund der Störung der CDF erhöht ist (Erxleben *et al.*, 2006).

Patienten mit Timothy Syndrom leiden an Syndaktylie der Finger oder Zehen, Gesichtsdysmorphien, Zahnanomalien, Autismus und QT-Zeit-Verlängerung (Splawski *et al.*, 2004), was die Ursache für den plötzlichen Herztod der meisten Patienten (mit durchschnittlich 2,5 Jahren) sein wird.

Der mit dem Timothy-Syndrom einhergehende Phänotyp verdeutlicht die wichtige physiologische Bedeutung der Regulierung von Ca<sub>v</sub>1.2-Kanälen. Das Krankheitsbild zeigt, dass eine Störung der langsamen Form der Inaktivierung, der VDI (siehe Abbildung 6-1), schwerwiegende Defekte vor allem in Herz und Gehirn verursacht.

Da bei den Mäusen der Ca<sub>v</sub>1.2<sup>EQ</sup>-Linie die andere Form der Inaktivierung, die CDI, gestört sein soll, ist beim Phänotyp der homozygoten Ca<sub>v</sub>1.2<sup>EQ(KI/KI)</sup>-Tiere ein ähnliches Bild zu erwarten. Vermutlich werden die Mäuse aufgrund ihrer gestörten CDI und damit verbundenem intrazellulären Kalziumüberschuss verlängerte kardiale APD aufzeigen, durch die schwere Arrhythmien auftreten könnten. Im Gehirn ist durch den CDI-Defekt ein autistisches Krankheitsbild zu vermuten. Da die CDI über die VDI dominiert (Brette *et al.*, 2004; Cens *et al.*, 2006), wird bei Störungen der CDI ein erheblich schwerwiegenderer Phänotyp als der des Timothy-Syndroms erwartet. Ein Indiz für diese Vermutung ist die Tatsache, dass bis dato keine lebensfähigen Nachkommen dieser Linie nachgewiesen werden konnten.

### 6.3.2 Neurotoxische Effekte von Ciclosporin

Es ist seit langem bekannt, dass das Immunsuppressivum Ciclosporin, das eine inhibierende Wirkung auf Calcineurin zeigt (Schreiber and Crabtree, 1992), neurotoxisch wirkt (Calne *et al.*, 1979; Dunn *et al.*, 2001; Kahan, 1989 ). Erxleben *et al.* klärten den Mechanismus der toxischen Wirkung des Ciclosporins auf. Die Phosphatase Calcineurin, die die therapeutischen Wirkungen von Ciclosporin über die Dephosphorylierung von NFAT vermittelt, wirkt auch an L-Typ Kalziumkanälen modulierend. Sie ist physiologisch dafür verantwortlich, den Kanal am Serin 1512 zu dephosphorylieren, sodass der L-Typ

Kalziumkanal wieder vom *mode2*-Zustand in den Ursprungszustand kommt. Bleibt die Dephosphorylierung durch Calcineurin (beispielsweise infolge einer Ciclosporinbehandlung) aus, so wird der *mode2*-Zustand länger angehalten. Die Folge ist ein erhöhter Kalziueinstrom und somit kommt es zu einem intrazellulären Kalziumüberschuss, wodurch Neuronen des Zentralen Nervensystems absterben (Erxleben *et al.*, 2006). Symptome der durch Ciclosporin verursachten Neurotoxizität treten in verschiedenen Geweben auf. So werden häufig Erblindung, verminderte Wachheit, Halluzinationen, Wahnvorstellungen, Epilepsien, Tremor, Gang- und Koordinationsstörungen, Bluthochdruck oder transiente, Schlaganfall-ähnliche Episoden nach Ciclosporin-Gabe beobachtet (Gijtenbeek *et al.*, 1999; Hauben, 1996; Wijdicks, 2001). Da der  $Ca_v1.2$ -Kanal bei homozygoten  $Ca_v1.2^{SF(K/KI)}$ -Tieren an der Stelle 1512 kein Serin sondern ein Alanin trägt, kann hier der Kanal nicht mehr phosphoryliert werden. Durch die eingeführte Mutation S1512A könnte eine Resistenz gegenüber Ciclosporin vermittelt werden.

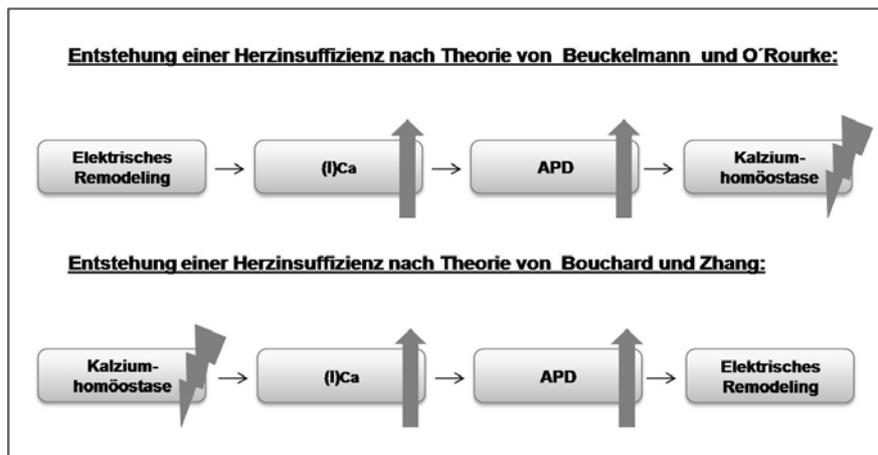
### 6.3.3 Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie

Wie aus klinischen Untersuchungen hervorgeht, sind die Herzinsuffizienz und die damit verbundene Hypertrophie des Herzens mit Veränderungen der Erregungsleitung und -Rückbildung verbunden. Diese führen zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber gefährlichen bzw. tödlichen Arrhythmien. Auch die elektromechanische Kopplung kann beeinträchtigt sein. Es ist mittlerweile unumstritten, dass bei Herzinsuffizienz eine veränderte Kalziumhomöostase vorliegt (Anderson, 2002; Marx *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2003). Verschiedene Studien legten eine Kausalität zwischen dem Grad der Herzinsuffizienz und einer Verlängerung der Diastole nahe, basierend auf einem verlangsamten Rückstrom von Kalzium in das SR und daraus resultierender Verlängerung der APD (Beuckelmann *et al.*, 1992; Gwathmey *et al.*, 1987; Morgan, 1990).

Als molekulare Ursachen könnte man hierfür eine veränderte Ausstattung der Kardiomyozyten mit Ionenkanal- und Transportproteinen und damit veränderten Ionenflüssen („Elektrisches Remodeling“) sehen. Somit wäre der Kalziueinstrom über L-Typ Kalziumkanäle gesteigert, wodurch sich  $[Ca^{2+}]_i$  erhöhte, was unter anderem in einer verlängerten APD resultieren würde (Beuckelmann *et al.*, 1993; O'Rourke *et al.*, 1999).

Eine andere mögliche Theorie für den molekularen Ablauf bei der Hypertrophie-Entstehung wird von Bouchard und Zhang vorgestellt. Bei Herzinsuffizienz seien die Kalziumhomöostase und damit die Länge der APD gestört. Die Herzmuskelzelle würde an die veränderten Gegebenheiten adaptieren, indem das „Elektrische Remodeling“ in Gang gesetzt würde, d.h. die Kardiomyozyten verändern ihre Ausstattung an Ionenkanal- und Transportproteinen und damit ihre Ionenströme mit der Absicht, damit die Kontraktilität des Herzens zu erhalten.

Allerdings würden diese Adaptionen zu einer gestörten Kalziumhomöostase (Bouchard *et al.*, 1995) und zu einer Verschlechterung der Herzfunktion (Zhang *et al.*, 2005) führen.



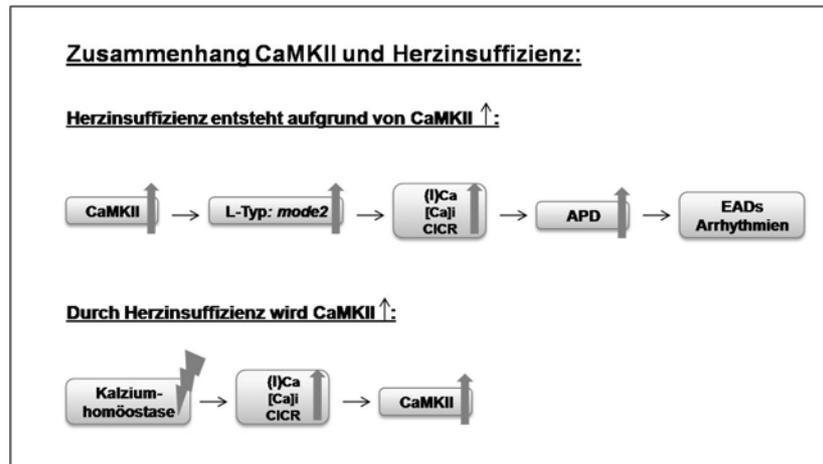
**Abbildung 6-4 Schematische Darstellung unterschiedlicher Theorien, die zur Entstehung von Herzinsuffizienz führen könnten. Erklärung siehe Text.**

Auch die CaMKII ist mit Herzerkrankungen wie Herzinsuffizienz und Arrhythmien in Verbindung zu bringen. Häufig kann man bei betroffenen Patienten eine etwa 2-fach erhöhte Expression und etwa 3-fach gesteigerte Aktivität von CaMKII im Herzen feststellen (Hoch *et al.*, 1999; Kirchhefer *et al.*, 1999) was auch im Tiermodell bestätigt werden konnte (Colomer and Means, 2000; Wu *et al.*, 2002).

Unklar bleibt bis heute, ob die veränderten Eigenschaften der CaMKII den primären Grund dieser Herzerkrankung darstellen oder ob sie als Resultat aus ihnen hervorgehen. Versuche, bei denen die CaMKII überexprimiert wurde, zeigten eine verstärkte Fazilitierung von L-Typ Kalziumkanälen (*mode2*-Zustand) sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Dadurch wird der Kalziumeinstrom über diese Kanäle verstärkt. Die Folge ist eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  und somit auch der CICR. Die Plateauphase des Aktionspotentials wird folglich verlängert, was wiederum zur Entstehung von frühen Nachdepolarisationen (*early afterdepolarisations*, EAD) führt. Dies wird bei dieser Theorie, die in Abbildung 6-5-unten noch einmal schematisch zusammengefasst ist, als Ursache für die Entstehung von Arrhythmien angesehen (Anderson *et al.*, 1998; Maier *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 1999a; Wu *et al.*, 2002; Zeng and Rudy, 1995; Zhang *et al.*, 2003).

Durch die im Rahmen dieser Arbeit erzeugte  $Ca_v1.2^{SF}$ -Mauslinie besteht nun die Möglichkeit, den zellulären Mechanismus der Hypertrophie-Entstehung zu untersuchen. Da die L-Typ Kalziumkanäle von homozygoten  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ -Mäusen nicht mehr in der Lage sein sollen, den *mode2*-Zustand anzunehmen, also nicht mehr fazilitiert werden, müssten diese Tiere gegenüber Arrhythmien resistent sein, die über diesen Mechanismus zustande kommen sollen.

Auf der anderen Seite gibt es Evidenzen, dass eine verlängerte APD und der daraus resultierende erhöhte Kalziumeinstrom zur CaMKII-Aktivierung führt (Abbildung 6-5-unten) (Anderson *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999b). Eine Hemmung der CaMKII zeigt eine schützende Wirkung vor Herzinsuffizienz und Arrhythmien (Couchonnal and Anderson, 2008).



**Abbildung 6-5 Schematische Darstellung der verschiedenen Theorien, die den Zusammenhang zwischen Herzinsuffizienz und der CaMKII beschreiben. Erklärung siehe Text.**

Gegensätzlich zu diesen Beobachtungen berichtete eine andere Gruppe von einer reduzierten CaMKII-Aktivität bei Herzinsuffizienz (Netticadan *et al.*, 2000).

Längerfristig beeinflusst die CaMKII die Transkription von Genen über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CREB. Dadurch kommt es im gesunden Zustand zur Expression von Genen unter anderem für verschiedene Kontraktilitätsproteine und Myozytenfunktionsproteine. Während der Hypertrophie aber wird durch verstärkte Aktivierung von CREB oder auch von Histon-Deacetylasen das „Hypertrophieprogramm“ (als „fetales Genprogramm“ oder „Reprogrammierung“ bezeichnet) aktiviert (Wu *et al.*, 2006). Hypertrophie-Therapiemöglichkeiten in Bezug auf Gentranskription werden kontrovers diskutiert. Es gibt Vorschläge, eventuell durch Hemmung von CaMKII (Zhang *et al.*, 2005) oder aber durch Steigerung der CREB-Aktivität (Bodi *et al.*, 2005) den Verlauf von Herzinsuffizienz zu mildern.

Wie oben schon erwähnt kommt es bei Herzinsuffizienz zu Beeinträchtigung der Exzitations-Kontraktionskopplung. In Kardiomyozyten herzinsuffizienter Patienten konnte ein verminderter Kalziumgehalt des SR nachgewiesen werden (Pieske *et al.*, 1999). Als Ursache könnte der veränderte Expressions- bzw. Phosphorylierungszustand einiger Proteine sein, die an diesem Mechanismus beteiligt sind.

So zeigt der Ryanodinrezeptor RyR2 bei Herzinsuffizienz eine verminderte Expression und ist hyperphosphoryliert (Ai *et al.*, 2005; Marks, 2000; Marx *et al.*, 2000). Dadurch ist er nicht mehr in der Lage, während der Diastole vollständig zu schließen, sodass der Kalzium-Vorrat

für die Systole vermindert ist (Marks, 2000; Reiken *et al.*, 2003). Somit lässt sich die erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  während der Diastole und die verminderte  $[Ca^{2+}]_i$  während der Systole erklären. Dies resultiert in einer verminderten Kontraktilität und späten Nachdepolarisationen (*delayed afterdepolarisations*, DAD), die zu Arrhythmien führen.

Es wurde herausgefunden, dass der RyR2 außer von PKA auch von CaMKII phosphoryliert werden kann, was vermutlich die Öffnungswahrscheinlichkeit positiv (Witcher *et al.*, 1991) oder negativ (Lokuta *et al.*, 1995) beeinflusst.

Mit der reduzierten SR-Kalziumkonzentration bei Herzinsuffizienz kann auch die SERCA in Verbindung gebracht werden. Die physiologische Funktion von SERCA besteht darin, die intrazellulären Kalziumionen am Ende der Systole aus dem Zytoplasma ins SR zurück zu pumpen. Dadurch ist sie in die Entstehung der Diastole/Relaxation involviert. Bei Herzinsuffizienz zeigt SERCA laut einiger Theorien sowohl verminderte Expression (Arai *et al.*, 1994; Hasenfuss, 1998; Movsesian *et al.*, 1994; Schwinger *et al.*, 1995) als auch Aktivität (DiPaola *et al.*, 2001). Daraus resultiert ein verlängerter Kalziumtransient. Eventuell kann SERCA auch direkt von der CaMKII-Phosphorylierung reguliert werden, wodurch ihre enzymatische Aktivität ansteigt (Toyofuku *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1993). Dies wird allerdings durch Gegenbelege in Frage gestellt (Odermatt *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996).

An Herzmuskelzellen der  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ -Mäuse sollte nach unseren Vorarbeiten (Lee *et al.* 2006) keine CaMKII-Phosphorylierung mehr am Carboxyterminus von  $Ca_v1.2$  erfolgen. Wie bereits oben erwähnt phosphoryliert die CaMKII mehrere für die Kalziumregulation wichtige Proteine, wie z.B.  $Ca_v1.2$ , SERCA und RyR2. Entfällt nun in den  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ -Mäusen eines der Substrate ( $Ca_v1.2$ ) der Kinase, so könnte es im Sinne eines enzymkinetischen „Substrat-Switches“ oder durch kompensatorisch gesteigerte Aktivität der Kinase zur vermehrten Phosphorylierung der anderen Substrate (SERCA und RyR2) kommen. Diese Proteine würden dann durch die oben beschriebenen Mechanismen zum Entstehen einer Herzhypertrophie beitragen.

Ein alternativer Erklärungsansatz für die in  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ -Mäusen beobachtete Herzhypertrophie wäre, angelehnt an die Erkenntnis, dass die Kardiomyozyten durch den Verlust des CDF-Mechanismus keine Frequenz-Kraft-Anpassungen mehr leisten können. Eventuell kommt es auch dadurch zu einem Elektrischen Remodeling, dass schließlich laut Beuckelman *et al.* und O'Rourke *et al.* (siehe oben) die Ursache einer Hypertrophie sein könnte.

## 6.4 Besondere Bedeutung der Forschung an L-Typ Kalziumkanälen

Die Zahl der Patienten, die an Herzinsuffizienz leiden, steigt stetig an. Weltweit sind etwa 15 Millionen Patienten daran erkrankt. Trotz erheblicher therapeutischer Fortschritte liegt die Ein-Jahres-Sterblichkeit von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz immer noch bei 47% (Dickstein *et al.*, 2008).

Die derzeit verfügbaren Therapiemöglichkeiten der Herzinsuffizienz und der damit verbundenen gefährlichen Arrhythmien beschränken sich lediglich auf symptomatische Maßnahmen. So führen Behandlungen mit Ionenkanal-Antagonisten (Echt *et al.*, 1991; Waldo *et al.*, 1996),  $\beta$ -Blockern (Inhibitoren von G-gekoppelten Rezeptoren) oder Diuretika zu keinem Rückgang der Mortalität und zeigen erhebliche Nebenwirkungen (Couchonnal and Anderson, 2008). Als einzige kausale Therapie steht zurzeit die Herztransplantation zur Verfügung, die allerdings aufgrund der geringen Anzahl an Spenderorganen stark limitiert ist. Nach neuestem Stand will man nun den Behandlungsfokus auch auf Proteinkinasen richten und erhofft sich von ihnen als Angriffspunkt mehr Selektivität (Anderson *et al.*, 2006). Studien zeigen bei einer Inhibierung der CaMKII eine protektive Wirkung gegenüber Herzinsuffizienz und Arrhythmien (Wu *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005).

Auch die Modulation der L-Typ Kalziumkanäle bietet Potential, um in die pathophysiologischen Abläufe während der Herzinsuffizienz und der Arrhythmie eingreifen zu können. Daher ist es von sehr großer Bedeutung, die molekularen Details der Regulation von L-Typ Kalziumkanälen und ihre funktionelle Relevanz in Bezug auf die kardiale Kalziumregulation zu erforschen. Dies soll spezifischere Therapiemethoden ermöglichen, vor allem im Hinblick darauf, dass die Herzinsuffizienz statistisch gesehen immer noch die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern darstellt.

## 6.5 Ausblick

Anhand von Phosphorylierungs-Experimenten muss zunächst einmal, wie von Lee *et al.* *in vitro* gezeigt, die Tatsache bestätigt werden, dass S1512/1570 auch *in vivo* die Phosphorylierungsstellen für CaMKII sind (Lee *et al.*, 2006). Das heißt, der Ca<sub>v</sub>1.2-Carboxyterminus der Ca<sub>v</sub>1.2<sup>SF(KI/KI)</sup>-Mäuse darf nicht phosphoryliert vorliegen und soll auch nicht durch exogen zugegebene CaMKII phosphorylierbar sein. Des Weiteren soll die Vermutung, dass die Ca<sub>v</sub>1.2<sup>SF(KI/KI)</sup>-Mäuse eine Herz-Hypertrophie aufweisen, nochmal anhand älterer Tiere (>20 Wochen) bestätigt und mit den bisherigen Ergebnissen der 9-14 Wochen alten Tiere verglichen werden. Möglicherweise wird es mit zunehmendem Alter zu einer weiteren Erhöhung des HW/BW-Verhältnisses, also zu einer Verschlechterung des hypertrophen Phänotyps, kommen. Zudem soll eine quantitative RT-PCR darüber Aufschluss geben, ob der Expressions-Anstieg des Hypertrophie-Markergens *ANP* signifikant ist. Des Weiteren könnten mit dieser quantitativen RT-PCR-Analyse eventuell weitere Hypertrophie-Markergene, wie z.B. *Myh6*, *Myh7*, *Acta1*, eine veränderte, Hypertrophie-typische Expression zeigen. Möglicherweise verändert sich der Expressionsspiegel der Hypertrophie-Markergene mit steigendem Alter noch weiter, wie es für einige weitere kardiale Gene beschrieben ist (Rajan *et al.*, 2006; Ruiz-Lozano *et al.*, 2001).

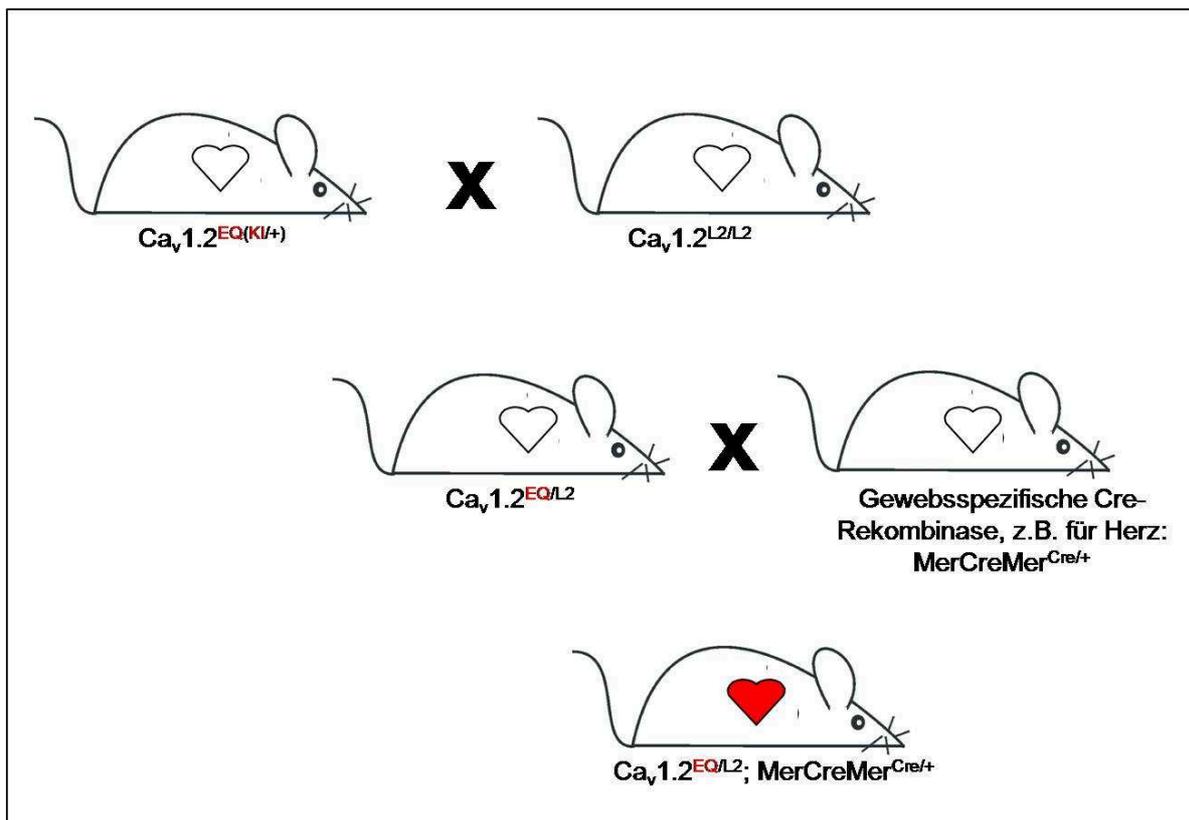
Elektrophysiologische Einzelkanal-Messungen an Ca<sub>v</sub>1.2<sup>SF(KI/KI)</sup>-Kardiomyozyten sollen den Verdacht bestätigen, dass es nach hoch-frequenter Stimulation (bis zu 300 Hz) zu keiner Erhöhung des Kalziumstromes durch den L-Typ Kalziumkanal kommen kann. Zudem darf beim Belastungs-Echokardiogramm (EKG) der Bowditch-Effekt nicht mehr zu beobachten sein, d.h. die Erhöhung der Herzfrequenz darf nicht mit der Erhöhung der Kontraktionskraft einhergehen.

Um den hypertrophen Phänotyp noch weiter zu untersuchen, sollen die Herzen der Ca<sub>v</sub>1.2<sup>SF(KI/KI)</sup>-Mäuse nach eventuellen Bindegewebseinlagerungen anhand von Gewebeschnitten und anschließenden Färbemethoden untersucht werden. Zudem soll die zytosolische Expression und Aktivität der CaMKII bestimmt werden. Nach den Beobachtungen von Hoch und Kirchhefer kann es sein, dass bei den Tieren eine gesteigerte CaMKII-Expression und/oder Aktivität auftritt (Hoch *et al.*, 1999; Kirchhefer *et al.*, 1999).

Um auszuschließen, dass die Herzhypertrophie durch periphere Prozesse verursacht wird, soll anhand telemetrischer Blutdruckmessungen die Herz-Kreislauffunktion untersucht werden. Wie genau sich der Verlust der CDF auf die Kalziumregulation der Ca<sub>v</sub>1.2<sup>SF(KI/KI)</sup>-Kardiomyozyten auswirkt, kann durch Kalzium-Imaging- Versuche charakterisiert werden.

Durch gezielte pränatale Untersuchungen der  $Ca_v1.2^{EQ(KI/KI)}$ -Mäuse muss zunächst geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt sie aufgrund ihrer potentiell schweren Defekte sterben. Mit Hilfe dieser Embryonen soll zudem die postulierte Theorie der  $Ca^{2+}/CaM$ -IQ-Interaktion (Peterson *et al.*, 1999; Zuhlke *et al.*, 2000) auch *in vivo* bestätigt werden. Zudem soll durch elektrophysiologische Analysen beispielsweise von Kardiomyozyten das Nichtvorhandensein von CDI und CDF der L-Typ Kalziumkanäle beobachtet werden.

Die nächste Frage wird dann sein, welche physiologischen Hintergründe den nicht-lebensfähigen Phänotyp verursachen. Hierfür könnte man gewebsspezifische knock-in-Tiermodelle erzeugen, beispielsweise durch Verpaarungen mit  $Ca_v1.2^{L2/L2}$ -Mäusen. Bei diesen Tieren sind die Exone 14 und 15 des *CACNA1C*-Gens mit zwei loxP-Sequenzen flankiert (L2). Erst in Anwesenheit von Cre-Rekombinase werden diese Exone deletiert. Dies kann durch Verpaarung mit einer Mauslinie, bei der Cre-Rekombinase unter einem gewebsspezifischen Promotor steht (z.B. MerCreMer im Herzen (Verrou *et al.*, 1999) oder Nestin im kompletten ZNS) erreicht werden (siehe Abbildung 6-6).



**Abbildung 6-6** Zuchtstrategie, um gewebsspezifische  $Ca_v1.2^{EQ(KI/KI)}$ -Mäuse zu erhalten. Erklärung siehe Text. MerCreMer-Maus (Verrou *et al.*, 1999)

## 7 Zusammenfassung

L-Typ Kalziumkanäle sind maßgeblich an der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt. Im Herzen ist die Funktion dieser Kalziumkanäle (Ca<sub>v</sub>1.2-Kanäle) für eine gesunde Herzfunktion essentiell. Störungen im Prozess des Öffnens und Schließens gehen mit Pathologien wie Herzinsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen einher. Aus diesem Grund ist die Aufklärung des molekularen Mechanismus der Autoregulation dieser Kanäle von besonderer Bedeutung. Hier steht Calmodulin als zentrales Regulationsmolekül im Vordergrund.

Während der sogenannten kalziumabhängigen Inaktivierung (**CDI**) hemmt Kalziumgebundenes Calmodulin (Ca<sup>2+</sup>/CaM) den Ca<sub>v</sub>1.2-Kanal. Hierfür soll eine Interaktion des Ca<sup>2+</sup>/CaM mit dem IQ-Motiv am Carboxyterminus des Kanals ausschlaggebend sein. *In vitro*-Versuche deuten darauf hin, dass für diese Interaktion das Isoleucin verantwortlich ist. Mutiert man dieses Isoleucin zu Glutamat, soll keine Inaktivierung mehr stattfinden können.

Neben dieser negativen Autoregulationsform gibt es einen positiven Feedback-Mechanismus. Hier soll der Ca<sup>2+</sup>/CaM-Komplex über die Aktivierung der Calmodulinkinase II (CaMKII) zu einer Erhöhung, also zur Fazilitierung (**CDF**), des Kalziumeinstroms durch den Ca<sub>v</sub>1.2-Kalziumkanal führen. Es wird postuliert, dass dabei der Kanal durch die CaMKII phosphoryliert wird. Vorversuche deuten darauf hin, dass diese Phosphorylierung an den Serinen S1512 und S1570 im Carboxyterminus des Ca<sub>v</sub>1.2-Kanals geschieht.

Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der L-Typ Kalziumkanäle existieren noch keine Tiermodelle, die man heranziehen könnte, um die *in vivo*-Bedeutung der beiden Autoregulationsformen CDI und CDF zu untersuchen. Aus diesem Grund erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Generierung zweier Mauslinien:

Zum einen wurde die **Ca<sub>v</sub>1.2<sup>SF</sup>-Mauslinie** erzeugt, bei der die beiden Serine S1512 und S1570 zu Alaninen mutiert sind und dadurch die CaMKII den Carboxyterminus wahrscheinlich nicht mehr phosphorylieren kann. Es wird erwartet, dass der Kanal keine CDF mehr zeigen wird.

Zum anderen erfolgte die Generierung der **Ca<sub>v</sub>1.2<sup>EQ</sup>-Mauslinie**, bei der das IQ-Motiv verändert wurde. Dieses Motiv trägt nun an Stelle 1624 statt Isoleucin ein Glutamat, wodurch wahrscheinlich keine Interaktion mehr mit Calmodulin möglich sein wird und somit laut *in vitro*-Daten sowohl die CDI als auch CDF gestört sein werden.

Es wurde beschrieben, wie mit Hilfe der Gen-Targeting-Methode und des Cre/loxP-Systems die beiden knock-in Mauslinien generiert wurden. Zunächst wurde mit Hilfe molekularbiologischer Methoden die *CACNA1C*-Gensequenz entsprechend verändert. Anschließend erreichte man mittels Homologer Rekombination, dass die Targeting-Vektor-DNS in das Genom von Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) integriert wurde. Diese ES-Zellen mit mutierter DNS-Sequenz wurden in Blastozysten injiziert, woraus sich chimäre

Nachkommen entwickelten. Diese Chimären trugen die entsprechenden Mutationen in ihrer Keimbahn und gaben sie an ihre Nachkommen weiter. Die dadurch hervorgegangenen heterozygoten Tiere wurden untereinander verpaart, um letztlich dementsprechend homozygote Versuchstiere zu erhalten.

Homozygote Tiere der  $Ca_v1.2^{SF}$ -Mauslinie zeigen auf den ersten Blick keinen Phänotyp. Sie sind lebensfähig, fertil und zeigen keine Veränderungen in ihrem Körpergewicht. Auch die Expressionsspiegel an  $Ca_v1.2$  Protein und -mRNS scheinen von den Mutationen unbeeinträchtigt zu sein. Vergleicht man allerdings das Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht mit Kontrolltieren, so zeigen homozygote  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ -Tiere einen signifikanten Anstieg dieses Verhältnisses, was ein Anzeichen für eine existierende Hypertrophie sein könnte. Auch die erhöhte ANP-Expression könnte dafür sprechen. Diese anfänglichen  $Ca_v1.2^{SF(KI/KI)}$ -Phänotypisierungs-Untersuchungen geben schon erste Hinweise auf eine bedeutende physiologische Rolle der beiden Serine S1512 und S1570.

Bis dato konnte kein Tier identifiziert werden, welches die Mutation I1624E im IQ-Motiv des  $Ca_v1.2$ -Carboxyterminus homozygot besitzt. Daraus könnte man auf eine essenzielle Rolle dieses Isoleucins für Entwicklung und/oder Lebensfähigkeit schließen.

Mit dieser Arbeit wurde die Grundlage geschaffen, die zwei wesentlichen Regulationsprozesse, Inaktivierung und Fazilitierung, des  $Ca_v1.2$ -Kanals *in vivo* zu analysieren und ihre Bedeutung in einen physiologischen Gesamtzusammenhang zu bringen.

## 8 Literaturverzeichnis

- ABREMSKI, K., HOESS, R. and STERNBERG, N. (1983) Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell*, **32**, 1301-1311.
- AI, X., CURRAN, J.W., SHANNON, T.R., BERS, D.M. and POGWIZD, S.M. (2005) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure. *Circ Res*, **97**, 1314-1322.
- ANDERSON, M.E. (2002) Calmodulin and the philosopher's stone: Changing Ca<sup>2+</sup> into arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*, **13**, 195-197.
- ANDERSON, M.E., BRAUN, A.P., SCHULMAN, H. and PREMACK, B.A. (1994) Multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca<sup>2+</sup>-induced enhancement of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res*, **75**, 854-861.
- ANDERSON, M.E., BRAUN, A.P., WU, Y., LU, T., WU, Y., SCHULMAN, H. and SUNG, R.J. (1998) KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca<sup>++</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther*, **287**, 996-1006.
- ANDERSON, M.E., HIGGINS, L.S. and SCHULMAN, H. (2006) Disease mechanisms and emerging therapies: protein kinases and their inhibitors in myocardial disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, **3**, 437-445.
- ARAI, M., MATSUI, H. and PERIASAMY, M. (1994) Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*, **74**, 555-564.
- AVERY, O.T., MACLEOD, C.M. and MCCARTY, M. (1995) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. 1944. *Mol Med*, **1**, 344-365.
- BARTEL, S., VETTER, D., SCHLEGEL, W.P., WALLUKAT, G., KRAUSE, E.G. and KARCZEWSKI, P. (2000) Phosphorylation of phospholamban at threonine-17 in the absence and presence of beta-adrenergic stimulation in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, **32**, 2173-2185.
- BAUMANN, L., GERSTNER, A., ZONG, X., BIEL, M. and WAHL-SCHOTT, C. (2004) Functional characterization of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.4 $\alpha$ 1 from mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**, 708-713.
- BECH-HANSEN, N.T., NAYLOR, M.J., MAYBAUM, T.A., PEARCE, W.G., KOOP, B., FISHMAN, G.A., METS, M., MUSARELLA, M.A. and BOYCOTT, K.M. (1998) Loss-of-function mutations in a calcium-channel  $\alpha$ 1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet*, **19**, 264-267.
- BENITAH, J.P., GOMEZ, A.M., FAUCONNIER, J., KERFANT, B.G., PERRIER, E., VASSORT, G. and RICHARD, S. (2002) Voltage-gated Ca<sup>2+</sup> currents in the human pathophysiologic heart: a review. *Basic Res Cardiol*, **97 Suppl 1**, I11-18.
- BERRIDGE, M.J. (2003) Cardiac calcium signalling. *Biochem Soc Trans*, **31**, 930-933.
- BERS, D.M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, **415**, 198-205.
- BERS, D.M. and DESPA, S. (2006) Cardiac myocytes Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> regulation in normal and failing hearts. *J Pharmacol Sci*, **100**, 315-322.
- BEUCKELMANN, D.J., NABAUER, M. and ERDMANN, E. (1992) Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation*, **85**, 1046-1055.
- BEUCKELMANN, D.J., NABAUER, M. and ERDMANN, E. (1993) Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res*, **73**, 379-385.
- BEUCKELMANN, D.J. and WIER, W.G. (1988) Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *J Physiol*, **405**, 233-255.
- BIRNBOIM, H.C. and DOLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- BODI, I., MIKALA, G., KOCH, S.E., AKHTER, S.A. and SCHWARTZ, A. (2005) The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest*, **115**, 3306-3317.
- BOHN, G., MOOSMANG, S., CONRAD, H., LUDWIG, A., HOFMANN, F. and KLUGBAUER, N. (2000) Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett*, **481**, 73-76.
- BOOTMAN, M.D. and BERRIDGE, M.J. (1995) The elemental principles of calcium signaling. *Cell*, **83**, 675-678.
- BOUCHARD, R.A., CLARK, R.B. and GILES, W.R. (1995) Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. Action potential voltage-clamp measurements. *Circ Res*, **76**, 790-801.
- BOWDITCH, H. (1871) *Über die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen*. Ber Sächs Akad Wiss.
- BOYKO, W.L., JR., GLICK, H.A. and SCHULMAN, K.A. (1999) Economics and cost-effectiveness in evaluating the value of cardiovascular therapies. ACE inhibitors in the management of congestive heart failure: comparative economic data. *Am Heart J*, **137**, S115-119.
- BRADLEY, A., EVANS, M., KAUFMAN, M.H. and ROBERTSON, E. (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, **309**, 255-256.
- BRAUN, A.P. and SCHULMAN, H. (1995) The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol*, **57**, 417-445.
- BREHM, P. and ECKERT, R. (1978) Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science*, **202**, 1203-1206.

- BRETTE, F., SALLE, L. and ORCHARD, C.H. (2004) Differential modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> current by SR Ca<sup>2+</sup> release at the T-tubules and surface membrane of rat ventricular myocytes. *Circ Res*, **95**, e1-7.
- BURNETTE, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiiodinated protein A. *Anal Biochem*, **112**, 195-203.
- CALNE, R.Y., ROLLES, K., WHITE, D.J., THIRU, S., EVANS, D.B., MCMASTER, P., DUNN, D.C., CRADDOCK, G.N., HENDERSON, R.G., AZIZ, S. and LEWIS, P. (1979) Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet*, **2**, 1033-1036.
- CAPECCHI, M.R. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244**, 1288-1292.
- CATTERALL, W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 521-555.
- CENS, T., RESTITUITO, S., GALAS, S. and CHARNET, P. (1999) Voltage and calcium use the same molecular determinants to inactivate calcium channels. *J Biol Chem*, **274**, 5483-5490.
- CENS, T., ROUSSET, M., LEYRIS, J.P., FESQUET, P. and CHARNET, P. (2006) Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca(2+) channels. *Prog Biophys Mol Biol*, **90**, 104-117.
- CHU, G., HAYAKAWA, H. and BERG, P. (1987) Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res*, **15**, 1311-1326.
- CLAPHAM, D.E. (2007) Calcium signaling. *Cell*, **131**, 1047-1058.
- COLOMER, J.M. and MEANS, A.R. (2000) Chronic elevation of calmodulin in the ventricles of transgenic mice increases the autonomous activity of calmodulin-dependent protein kinase II, which regulates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol Endocrinol*, **14**, 1125-1136.
- COUCHONNAL, L.F. and ANDERSON, M.E. (2008) The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)*, **23**, 151-159.
- DAVIS, B.A., SCHWARTZ, A., SAMAHA, F.J. and KRANIAS, E.G. (1983) Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by calcium-calmodulin-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*, **258**, 13587-13591.
- DE JONGH, K.S., WARNER, C., COLVIN, A.A. and CATTERALL, W.A. (1991) Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10778-10782.
- DELGADO, C., ARTILES, A., GOMEZ, A.M. and VASSORT, G. (1999) Frequency-dependent increase in cardiac Ca<sup>2+</sup> current is due to reduced Ca<sup>2+</sup> release by the sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol*, **31**, 1783-1793.
- DICKSTEIN K, COHEN-SOLAL A., FILIPPATOS G. and SWEDBERG K. (2008) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008. *Eur heart j* **29**, 2388-2442
- DIPAOLA, N.R., SWEET, W.E., STULL, L.B., FRANCIS, G.S. and SCHOMISCH MORAVEC, C. (2001) Beta-adrenergic receptors and calcium cycling proteins in non-failing, hypertrophied and failing human hearts: transition from hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol*, **33**, 1283-1295.
- DOETSCHMAN, T., GREGG, R.G., MAEDA, N., HOOPER, M.L., MELTON, D.W., THOMPSON, S. and SMITHIES, O. (1987) Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*, **330**, 576-578.
- DOLMETSCH, R.E., PAJVANI, U., FIFE, K., SPOTTS, J.M. and GREENBERG, M.E. (2001) Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*, **294**, 333-339.
- DUNN, C.J., WAGSTAFF, A.J., PERRY, C.M., PLOSKER, G.L. and GOA, K.L. (2001) Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)1 in organ transplantation. *Drugs*, **61**, 1957-2016.
- DZHURA, I., WU, Y., COLBRAN, R.J., BALSER, J.R. and ANDERSON, M.E. (2000) Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels. *Nat Cell Biol*, **2**, 173-177.
- ECHT, D.S., LIEBSON, P.R., MITCHELL, L.B., PETERS, R.W., OBIAS-MANNO, D., BARKER, A.H., ARENSBERG, D., BAKER, A., FRIEDMAN, L., GREENE, H.L. and ET AL. (1991) Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N Engl J Med*, **324**, 781-788.
- ERICKSON, J.R., JOINER, M.L., GUAN, X., KUTSCHKE, W., YANG, J., ODDIS, C.V., BARTLETT, R.K., LOWE, J.S., O'DONNELL, S.E., AYKIN-BURNS, N., ZIMMERMAN, M.C., ZIMMERMAN, K., HAM, A.J., WEISS, R.M., SPITZ, D.R., SHEA, M.A., COLBRAN, R.J., MOHLER, P.J. and ANDERSON, M.E. (2008) A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*, **133**, 462-474.
- ERICKSON, M.G., LIANG, H., MORI, M.X. and YUE, D.T. (2003) FRET two-hybrid mapping reveals function and location of L-type Ca<sup>2+</sup> channel CaM preassociation. *Neuron*, **39**, 97-107.
- ERIKSSON, H. (1995) Heart failure: a growing public health problem. *J Intern Med*, **237**, 135-141.
- ERXLEBEN, C., LIAO, Y., GENTILE, S., CHIN, D., GOMEZ-ALEGRIA, C., MORI, Y., BIRNBAUMER, L. and ARMSTRONG, D.L. (2006) Cyclosporin and Timothy syndrome increase mode 2 gating of CaV1.2 calcium channels through aberrant phosphorylation of S6 helices. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3932-3937.
- EVANS, M.J. and KAUFMAN, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, **292**, 154-156.
- FABIATO, A. and FABATO, F. (1979) Use of chlorotetracycline fluorescence to demonstrate Ca<sup>2+</sup>-induced release of Ca<sup>2+</sup> from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. *Nature*, **281**, 146-148.

- FEDOROV, L.M., HAEGEL-KRONENBERGER, H. and HIRCHENHAIN, J. (1997) A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. *Transgenic Res*, **6**, 223-231.
- FEINBERG, A.P. and VOGELSTEIN, B. (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Addendum Anal Biochem*, **137**, 266-267.
- FELDMAN, D.S., CARNES, C.A., ABRAHAM, W.T. and BRISTOW, M.R. (2005) Mechanisms of disease: beta-adrenergic receptors--alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, **2**, 475-483.
- FENG, Z.P., HAMID, J., DOERING, C., JARVIS, S.E., BOSEY, G.M., BOURINET, E., SNUTCH, T.P. and ZAMPONI, G.W. (2001) Amino acid residues outside of the pore region contribute to N-type calcium channel permeation. *J Biol Chem*, **276**, 5726-5730.
- FINDLAY, I. (2002) Voltage- and cation-dependent inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channel currents in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*, **541**, 731-740.
- GAO, T., CHIEN, A.J. and HOSEY, M.M. (1999) Complexes of the alpha1C and beta subunits generate the necessary signal for membrane targeting of class C L-type calcium channels. *J Biol Chem*, **274**, 2137-2144.
- GIJTENBEEK, J.M., VAN DEN BENT, M.J. and VECHT, C.J. (1999) Cyclosporine neurotoxicity: a review. *J Neurol*, **246**, 339-346.
- GOSSLER, A., DOETSCHMAN, T., KORN, R., SERFLING, E. and KEMLER, R. (1986) Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9065-9069.
- GRUETER, C.E., ABIRIA, S.A., DZHURA, I., WU, Y., HAM, A.J., MOHLER, P.J., ANDERSON, M.E. and COLBRAN, R.J. (2006) L-type Ca<sup>2+</sup> channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. *Mol Cell*, **23**, 641-650.
- GU, H., ZOU, Y.R. and RAJEWSKY, K. (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell*, **73**, 1155-1164.
- GURNEY, A.M., CHARNET, P., PYE, J.M. and NARGEOT, J. (1989) Augmentation of cardiac calcium current by flash photolysis of intracellular caged-Ca<sup>2+</sup> molecules. *Nature*, **341**, 65-68.
- GWATHMEY, J.K., COPELAS, L., MACKINNON, R., SCHOEN, F.J., FELDMAN, M.D., GROSSMAN, W. and MORGAN, J.P. (1987) Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res*, **61**, 70-76.
- HAGIWARA, N., IRISAWA, H. and KAMEYAMA, M. (1988) Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*, **395**, 233-253.
- HAIN, J., ONOUE, H., MAYRLEITNER, M., FLEISCHER, S. and SCHINDLER, H. (1995) Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem*, **270**, 2074-2081.
- HASENFUSS, G. (1998) Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res*, **37**, 279-289.
- HASTY, P., RIVERA-PEREZ, J. and BRADLEY, A. (1991) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **11**, 5586-5591.
- HATTORI, Y., TOYAMA, J. and KODAMA, I. (1991) Cytosolic calcium staircase in ventricular myocytes isolated from guinea pigs and rats. *Cardiovasc Res*, **25**, 622-629.
- HAUBEN, M. (1996) Cyclosporine neurotoxicity. *Pharmacotherapy*, **16**, 576-583.
- HELL, J.W., WESTENBROEK, R.E., WARNER, C., AHLIJANIAN, M.K., PRYSTAY, W., GILBERT, M.M., SNUTCH, T.P. and CATTERALL, W.A. (1993) Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol*, **123**, 949-962.
- HOCH, B., MEYER, R., HETZER, R., KRAUSE, E.G. and KARCZEWSKI, P. (1999) Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*, **84**, 713-721.
- HOFMANN, F., LACINOVA, L. and KLUGBAUER, N. (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **139**, 33-87.
- HOOK, S.S. and MEANS, A.R. (2001) Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**, 471-505.
- HUDMON, A. and SCHULMAN, H. (2002) Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*, **364**, 593-611.
- HUDMON, A., SCHULMAN, H., KIM, J., MALTEZ, J.M., TSIEN, R.W. and PITT, G.S. (2005) CaMKII tethers to L-type Ca<sup>2+</sup> channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca<sup>2+</sup> signals for facilitation. *J Cell Biol*, **171**, 537-547.
- JOHNSTON, R.F., PICKETT, S.C. and BARKER, D.L. (1990) Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis*, **11**, 355-360.
- KAHAN, B. (1989) Cyclosporine. *N Engl J Med*, **321**, 1725-1738.
- KIM, J., GHOSH, S., NUNZIATO, D.A. and PITT, G.S. (2004) Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron*, **41**, 745-754.
- KIRCHHEFER, U., SCHMITZ, W., SCHOLZ, H. and NEUMANN, J. (1999) Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res*, **42**, 254-261.
- KLENCHIN, V.A., SUKHAREV, S.I., SEROV, S.M., CHERNOMORDIK, L.V. and CHIZMADZHEV YU, A. (1991) Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys J*, **60**, 804-811.
- KOCH-WESER, J. and BLINKS, J.R. (1963) The Influence of the Interval between Beats on Myocardial Contractility. *Pharmacol Rev*, **15**, 601-652.

- KOLLMAR, R., FAK, J., MONTGOMERY, L.G. and HUDSPETH, A.J. (1997) Hair cell-specific splicing of mRNA for the alpha1D subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in the chicken's cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14889-14893.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LAI, Y., NAIRN, A.C. and GREENGARD, P. (1986) Autophosphorylation reversibly regulates the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependence of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 4253-4257.
- LEE, T.S., KARL, R., MOOSMANG, S., LENHARDT, P., KLUGBAUER, N., HOFMANN, F., KLEPPISCH, T. and WELLING, A. (2006) Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem*, **281**, 25560-25567.
- LEMAIRE, S., PIOT, C., LECLERCQ, F., LEURANGUER, V., NARGEOT, J. and RICHARD, S. (1998) Heart rate as a determinant of L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity: mechanisms and implication in force-frequency relation. *Basic Res Cardiol*, **93 Suppl 1**, 51-59.
- LETTS, V.A., FELIX, R., BIDDLECOME, G.H., ARIKKATH, J., MAHAFFEY, C.L., VALENZUELA, A., BARTLETT, F.S., 2ND, MORI, Y., CAMPBELL, K.P. and FRANKEL, W.N. (1998) The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca<sup>2+</sup>-channel gamma subunit. *Nat Genet*, **19**, 340-347.
- LINZ, K.W. and MEYER, R. (2000) Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pflugers Arch*, **439**, 588-599.
- LOKUTA, A.J., ROGERS, T.B., LEDERER, W.J. and VALDIVIA, H.H. (1995) Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *J Physiol*, **487 ( Pt 3)**, 609-622.
- LOU, L.L., LLOYD, S.J. and SCHULMAN, H. (1986) Activation of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9497-9501.
- MAIER, L.S. and BERS, D.M. (2002) Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol*, **34**, 919-939.
- MAIER, L.S., ZHANG, T., CHEN, L., DESANTIAGO, J., BROWN, J.H. and BERS, D.M. (2003) Transgenic CaMKII $\delta$ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res*, **92**, 904-911.
- MARBAN, E. and TSIEN, R.W. (1982) Effects of nystatin-mediated intracellular ion substitution on membrane currents in calf purkinje fibres. *J Physiol*, **329**, 569-587.
- MARKS, A.R. (2000) Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. *Circ Res*, **87**, 8-11.
- MARKS, M.L., TRIPPEL, D.L. and KEATING, M.T. (1995) Long QT syndrome associated with syndactyly identified in females. *Am J Cardiol*, **76**, 744-745.
- MARTIN, G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 7634-7638.
- MARX, S.O., REIKEN, S., HISAMATSU, Y., JAYARAMAN, T., BURKHOFF, D., ROSEMBLIT, N. and MARKS, A.R. (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, **101**, 365-376.
- MCCARRON, J.G., MCGEOWN, J.G., REARDON, S., IKEBE, M., FAY, F.S. and WALSH, J.V., JR. (1992) Calcium-dependent enhancement of calcium current in smooth muscle by calmodulin-dependent protein kinase II. *Nature*, **357**, 74-77.
- MCMURRAY, J.J., PETRIE, M.C., MURDOCH, D.R. and DAVIE, A.P. (1998) Clinical epidemiology of heart failure: public and private health burden. *Eur Heart J*, **19 Suppl P**, P9-16.
- MCRORY, J.E., HAMID, J., DOERING, C.J., GARCIA, E., PARKER, R., HAMMING, K., CHEN, L., HILDEBRAND, M., BEEDLE, A.M., FELDCAMP, L., ZAMPONI, G.W. and SNUTCH, T.P. (2004) The CACNA1F gene encodes an L-type calcium channel with unique biophysical properties and tissue distribution. *J Neurosci*, **24**, 1707-1718.
- MEYER, T., HANSON, P.I., STRYER, L. and SCHULMAN, H. (1992) Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science*, **256**, 1199-1202.
- MILLER, S.G. and KENNEDY, M.B. (1986) Regulation of brain type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>-triggered molecular switch. *Cell*, **44**, 861-870.
- MOOSMANG, S., LENHARDT, P., HAIDER, N., HOFMANN, F. and WEGENER, J.W. (2005) Mouse models to study L-type calcium channel function. *Pharmacol Ther*, **106**, 347-355.
- MOOSMANG, S., SCHULLA, V., WELLING, A., FEIL, R., FEIL, S., WEGENER, J.W., HOFMANN, F. and KLUGBAUER, N. (2003) Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *Embo J*, **22**, 6027-6034.
- MORGAN, H.E. (1990) Signal transduction in myocardial hypertrophy. *Keio J Med*, **39**, 1-5.
- MORI, M.X., ERICKSON, M.G. and YUE, D.T. (2004) Functional stoichiometry and local enrichment of calmodulin interacting with Ca<sup>2+</sup> channels. *Science*, **304**, 432-435.
- MOVSESIAN, M.A., KARIMI, M., GREEN, K. and JONES, L.R. (1994) Ca<sup>2+</sup>-transporting ATPase, phospholamban, and calsequestrin levels in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation*, **90**, 653-657.
- MULLIS, K.B. and FALOONA, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- NAGY, A., GERTSENSTEIN, M., VINTERSTEN, K., BEHRINGER, R. (2003) *Manipulating the Mouse Embryo*. John Inglis, Cold Spring Harbor, New York.

- NAGY, A., ROSSANT, J., NAGY, R., ABRAMOW-NEWERLY, W. and 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**, 8424-8428.
- NAIRN, A.C., BHAGAT, B. and PALFREY, H.C. (1985) Identification of calmodulin-dependent protein kinase III and its major Mr 100,000 substrate in mammalian tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 7939-7943.
- NETTICADAN, T., TEMSAH, R.M., KAWABATA, K. and DHALLA, N.S. (2000) Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)/Calmodulin-dependent protein kinase is altered in heart failure. *Circ Res*, **86**, 596-605.
- NEUMANN, E., SCHAEFER-RIDDER, M., WANG, Y. and HOFSCHEIDER, P.H. (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J*, **1**, 841-845.
- NOBLE, S. and SHIMONI, Y. (1981a) The calcium and frequency dependence of the slow inward current 'staircase' in frog atrium. *J Physiol*, **310**, 57-75.
- NOBLE, S. and SHIMONI, Y. (1981b) Voltage-dependent potentiation of the slow inward current in frog atrium. *J Physiol*, **310**, 77-95.
- O'ROURKE, B., KASS, D.A., TOMASELLI, G.F., KAAB, S., TUNIN, R. and MARBAN, E. (1999) Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circ Res*, **84**, 562-570.
- ODERMATT, A., KURZYDLOWSKI, K. and MACLENNAN, D.H. (1996) The v<sub>max</sub> of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum (SERCA2a) is not altered by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphorylation or by interaction with phospholamban. *J Biol Chem*, **271**, 14206-14213.
- PEREZ-REYES, E., KIM, H.S., LACERDA, A.E., HORNE, W., WEI, X.Y., RAMPE, D., CAMPBELL, K.P., BROWN, A.M. and BIRNBAUMER, L. (1989) Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature*, **340**, 233-236.
- PETERSON, B.Z., DEMARIA, C.D., ADELMAN, J.P. and YUE, D.T. (1999) Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*, **22**, 549-558.
- PIESKE, B., MAIER, L.S., BERS, D.M. and HASENFUSS, G. (1999) Ca<sup>2+</sup> handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*, **85**, 38-46.
- PITT, G.S., ZUHLKE, R.D., HUDMON, A., SCHULMAN, H., REUTER, H. and TSIEN, R.W. (2001) Molecular basis of calmodulin tethering and Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem*, **276**, 30794-30802.
- RAJAN, S., WILLIAMS, S.S., JAGATHEESAN, G., AHMED, R.P., FULLER-BICER, G., SCHWARTZ, A., ARONOW, B.J. and WIECZOREK, D.F. (2006) Microarray analysis of gene expression during early stages of mild and severe cardiac hypertrophy. *Physiol Genomics*, **27**, 309-317.
- RAJEWSKY, K., GU, H., KUHN, R., BETZ, U.A., MULLER, W., ROES, J. and SCHWENK, F. (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest*, **98**, 600-603.
- REDDY, L.G., JONES, L.R., PACE, R.C. and STOKES, D.L. (1996) Purified, reconstituted cardiac Ca<sup>2+</sup>-ATPase is regulated by phospholamban but not by direct phosphorylation with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **271**, 14964-14970.
- REICHENBACH, H., MEISTER, E.M. and THEILE, H. (1992) [The heart-hand syndrome. A new variant of disorders of heart conduction and syndactylia including osseous changes in hands and feet]. *Kinderarztl Prax*, **60**, 54-56.
- REIKEN, S., WEHRENS, X.H., VEST, J.A., BARBONE, A., KLOTZ, S., MANCINI, D., BURKHOFF, D. and MARKS, A.R. (2003) Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. *Circulation*, **107**, 2459-2466.
- RHOADS, A.R. and FRIEDBERG, F. (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *Faseb J*, **11**, 331-340.
- RICHARD, S., PERRIER, E., FAUCONNIER, J., PERRIER, R., PEREIRA, L., GOMEZ, A.M. and BENITAH, J.P. (2006) 'Ca(2+)-induced Ca(2+) entry' or how the L-type Ca(2+) channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. *Prog Biophys Mol Biol*, **90**, 118-135.
- RINGER, S. (1882) A further contribution regarding the influence of the difference constituents of the blood on the concentration of the heart. *J Physiol*, **4**, 29-39.
- ROBERTSON, E., BRADLEY, A., KUEHN, M. and EVANS, M. (1986) Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*, **323**, 445-448.
- RUIZ-LOZANO, P., NAKAMURA, T. and CHIEN, K.R. (2001) [Developmental genes and heart disease]. *Rev Esp Cardiol*, **54**, 1439-1445.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- SCHILLINGER, W., LEHNART, S.E., PRESTLE, J., PREUSS, M., PIESKE, B., MAIER, L.S., MEYER, M., JUST, H. and HASENFUSS, G. (1998) Influence of SR Ca(2+)-ATPase and Na(+)-Ca(2+)-exchanger on the force-frequency relation. *Basic Res Cardiol*, **93 Suppl 1**, 38-45.
- SCHREIBER, S.L. and CRABTREE, G.R. (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today*, **13**, 136-142.
- SCHULLA, V., RENSTROM, E., FEIL, R., FEIL, S., FRANKLIN, I., GJINOVCI, A., JING, X.J., LAUX, D., LUNDQUIST, I., MAGNUSON, M.A., OBERMULLER, S., OLOFSSON, C.S., SALEHI, A., WENDT, A., KLUGBAUER, N., WOLLHEIM, C.B., RORSMAN, P. and HOFMANN, F. (2003) Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca<sup>2+</sup> channel null mice. *Embo J*, **22**, 3844-3854.
- SCHWINGER, R.H., BOHM, M., SCHMIDT, U., KARCZEWSKI, P., BAVENDIEK, U., FLESCH, M., KRAUSE, E.G. and ERDMANN, E. (1995) Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced

- Ca<sup>2+</sup> uptake and Ca(2+)-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation*, **92**, 3220-3228.
- SCHWORER, C.M., COLBRAN, R.J. and SODERLING, T.R. (1986) Reversible generation of a Ca<sup>2+</sup>-independent form of Ca<sup>2+</sup>(calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J Biol Chem*, **261**, 8581-8584.
- SHAM, J.S., CLEEMANN, L. and MORAD, M. (1995) Functional coupling of Ca<sup>2+</sup> channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 121-125.
- SHISTIK, E., IVANINA, T., PURI, T., HOSEY, M. and DASCAL, N. (1995) Ca<sup>2+</sup> current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J Physiol*, **489 (Pt 1)**, 55-62.
- SMITH, A.G., HEATH, J.K., DONALDSON, D.D., WONG, G.G., MOREAU, J., STAHL, M. and ROGERS, D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, **336**, 688-690.
- SOLDATOV, N.M. (1994) Genomic structure of human L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Genomics*, **22**, 77-87.
- SONG, L.S., GUATIMOSIM, S., GOMEZ-VIQUEZ, L., SOBIE, E.A., ZIMAN, A., HARTMANN, H. and LEDERER, W.J. (2005) Calcium biology of the transverse tubules in heart. *Ann N Y Acad Sci*, **1047**, 99-111.
- SOUTHERN, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- SPLAWSKI, I., TIMOTHY, K.W., DECHER, N., KUMAR, P., SACHSE, F.B., BEGGS, A.H., SANGUINETTI, M.C. and KEATING, M.T. (2005) Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8089-8096; discussion 8086-8088.
- SPLAWSKI, I., TIMOTHY, K.W., SHARPE, L.M., DECHER, N., KUMAR, P., BLOISE, R., NAPOLITANO, C., SCHWARTZ, P.J., JOSEPH, R.M., CONDOURIS, K., TAGER-FLUSBERG, H., PRIORI, S.G., SANGUINETTI, M.C. and KEATING, M.T. (2004) Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*, **119**, 19-31.
- STRIESSNIG, J. (1999) Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels. *Cell Physiol Biochem*, **9**, 242-269.
- STRIESSNIG, J., KOSCHAK, A., SINNEGGER-BRAUNS, M.J., HETZENAUER, A., NGUYEN, N.K., BUSQUET, P., PELSTER, G. and SINGEWALD, N. (2006) Role of voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> channel isoforms for brain function. *Biochem Soc Trans*, **34**, 903-909.
- STROM, T.M., NYAKATURA, G., APFELSTEDT-SYLLA, E., HELLEBRAND, H., LORENZ, B., WEBER, B.H., WUTZ, K., GUTWILLINGER, N., RUTHER, K., DRESCHER, B., SAUER, C., ZRENNER, E., MEITINGER, T., ROSENTHAL, A. and MEINDL, A. (1998) An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet*, **19**, 260-263.
- SUKHAREV, S.I., KLENCHIN, V.A., SEROV, S.M., CHERNOMORDIK, L.V. and CHIZMADZHEV YU, A. (1992) Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J*, **63**, 1320-1327.
- SUN, H., LEBLANC, N. and NATTEL, S. (1997) Mechanisms of inactivation of L-type calcium channels in human atrial myocytes. *Am J Physiol*, **272**, H1625-1635.
- SUZUKI, H., KAMADA, N., UEDA, O., JISHAGE, K., KURIHARA, Y., KURIHARA, H., TERAUCHI, Y., AZUMA, S., KADOWAKI, T., KODAMA, T., YAZAKI, Y. and TOYODA, Y. (1997) Germ-line contribution of embryonic stem cells in chimeric mice: influence of karyotype and in vitro differentiation ability. *Exp Anim*, **46**, 17-23.
- TADROSS, M.R., DICK, I.E. and YUE, D.T. (2008) Mechanism of local and global Ca<sup>2+</sup> sensing by calmodulin in complex with a Ca<sup>2+</sup> channel. *Cell*, **133**, 1228-1240.
- TANABE, T., TAKESHIMA, H., MIKAMI, A., FLOCKERZI, V., TAKAHASHI, H., KANGAWA, K., KOJIMA, M., MATSUO, H., HIROSE, T. and NUMA, S. (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, **328**, 313-318.
- THOMAS, K.R. and CAPECCHI, M.R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, **51**, 503-512.
- THOMAS, K.R., FOLGER, K.R. and CAPECCHI, M.R. (1986) High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, **44**, 419-428.
- TILLOTSON, D. (1979) Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1497-1500.
- TOBIMATSU, T. and FUJISAWA, H. (1989) Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem*, **264**, 17907-17912.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, **24**, 145-149.
- TOYOFUKU, T., CUROTTO KURZYDŁOWSKI, K., NARAYANAN, N. and MACLENNAN, D.H. (1994) Identification of Ser38 as the site in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase that is phosphorylated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **269**, 26492-26496.
- VAN PETEGEM, F., CHATELAIN, F.C. and MINOR, D.L., JR. (2005) Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 1108-1115.
- VENTER, J.C., ADAMS, M.D., MYERS, E.W., LI, P.W., MURAL, R.J., SUTTON, G.G., SMITH, H.O., YANDELL, M., EVANS, C.A., HOLT, R.A., GOCAYNE, J.D., AMANATIDES, P., BALLEW, R.M., HUSON, D.H., WORTMAN, J.R., ZHANG, Q., KODIRA, C.D., ZHENG, X.H., CHEN, L., SKUPSKI, M., SUBRAMANIAN, G., THOMAS, P.D., ZHANG, J., GABOR MIKLOS, G.L., NELSON, C., BRODER, S., CLARK, A.G., NADEAU, J., MCKUSICK, V.A., ZINDER, N., LEVINE, A.J., ROBERTS, R.J., SIMON, M., SLAYMAN, C., HUNKAPILLER, M., BOLANOS, R., DELCHER, A., DEW, I., FASULO, D., FLANIGAN, M., FLOREA, L.,

- HALPERN, A., HANNENHALLI, S., KRAVITZ, S., LEVY, S., MOBARRY, C., REINERT, K., REMINGTON, K., ABU-THREIDEH, J., BEASLEY, E., BIDDICK, K., BONAZZI, V., BRANDON, R., CARGILL, M., CHANDRAMOULISWARAN, I., CHARLAB, R., CHATURVEDI, K., DENG, Z., DI FRANCESCO, V., DUNN, P., EILBECK, K., EVANGELISTA, C., GABRIELIAN, A.E., GAN, W., GE, W., GONG, F., GU, Z., GUAN, P., HEIMAN, T.J., HIGGINS, M.E., JI, R.R., KE, Z., KETCHUM, K.A., LAI, Z., LEI, Y., LI, Z., LI, J., LIANG, Y., LIN, X., LU, F., MERKULOV, G.V., MILSHINA, N., MOORE, H.M., NAIK, A.K., NARAYAN, V.A., NEELAM, B., NUSSKERN, D., RUSCH, D.B., SALZBERG, S., SHAO, W., SHUE, B., SUN, J., WANG, Z., WANG, A., WANG, X., WANG, J., WEI, M., WIDES, R., XIAO, C., YAN, C., YAO, A., YE, J., ZHAN, M., ZHANG, W., ZHANG, H., ZHAO, Q., ZHENG, L., ZHONG, F., ZHONG, W., ZHU, S., ZHAO, S., GILBERT, D., BAUMHUETER, S., SPIER, G., CARTER, C., CRAVCHIK, A., WOODAGE, T., ALI, F., AN, H., AWE, A., BALDWIN, D., BADEN, H., BARNSTEAD, M., BARROW, I., BEESON, K., BUSAM, D., CARVER, A., CENTER, A., CHENG, M.L., CURRY, L., DANAHER, S., DAVENPORT, L., DESILETS, R., DIETZ, S., DODSON, K., DOUP, L., FERRIERA, S., GARG, N., GLUECKSMANN, A., HART, B., HAYNES, J., HAYNES, C., HEINER, C., HLADUN, S., HOSTIN, D., HOUCK, J., HOWLAND, T., IBEGWAM, C., JOHNSON, J., KALUSH, F., KLINE, L., KODURU, S., LOVE, A., MANN, F., MAY, D., MCCAWLEY, S., MCINTOSH, T., MCMULLEN, I., MOY, M., MOY, L., MURPHY, B., NELSON, K., PFANNKOCH, C., PRATTS, E., PURI, V., QURESHI, H., REARDON, M., RODRIGUEZ, R., ROGERS, Y.H., ROMBLAD, D., RUHFEL, B., SCOTT, R., SITTER, C., SMALLWOOD, M., STEWART, E., STRONG, R., SUH, E., THOMAS, R., TINT, N.N., TSE, S., VECH, C., WANG, G., WETTER, J., WILLIAMS, S., WILLIAMS, M., WINDSOR, S., WINN-DEEN, E., WOLFE, K., ZAVERI, J., ZAVERI, K., ABRIL, J.F., GUIGO, R., CAMPBELL, M.J., SJOLANDER, K.V., KARLAK, B., KEJARIWAL, A., MI, H., LAZAREVA, B., HATTON, T., NARECHANIA, A., DIEMER, K., MURUGANUJAN, A., GUO, N., SATO, S., BAFNA, V., ISTRAIL, S., LIPPERT, R., SCHWARTZ, R., WALENZ, B., YOOSEPH, S., ALLEN, D., BASU, A., BAXENDALE, J., BLICK, L., CAMINHA, M., CARNES-STINE, J., CAULK, P., CHIANG, Y.H., COYNE, M., DAHLKE, C., MAYS, A., DOMBROSKI, M., DONNELLY, M., ELY, D., ESPARHAM, S., FOSLER, C., GIRE, H., GLANOWSKI, S., GLASSER, K., GLODEK, A., GOROKHOV, M., GRAHAM, K., GROPMAN, B., HARRIS, M., HEIL, J., HENDERSON, S., HOOVER, J., JENNINGS, D., JORDAN, C., JORDAN, J., KASHA, J., KAGAN, L., KRAFT, C., LEVITSKY, A., LEWIS, M., LIU, X., LOPEZ, J., MA, D., MAJOROS, W., MCDANIEL, J., MURPHY, S., NEWMAN, M., NGUYEN, T., NGUYEN, N., NODELL, M., PAN, S., PECK, J., PETERSON, M., ROWE, W., SANDERS, R., SCOTT, J., SIMPSON, M., SMITH, T., SPRAGUE, A., STOCKWELL, T., TURNER, R., VENTER, E., WANG, M., WEN, M., WU, D., WU, M., XIA, A., ZANDIEH, A. and ZHU, X. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-1351.
- VERROU, C., ZHANG, Y., ZURN, C., SCHAMEL, W.W. and RETH, M. (1999) Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer. *Biol Chem*, **380**, 1435-1438.
- WALDO, A.L., CAMM, A.J., DERUYTER, H., FRIEDMAN, P.L., MACNEIL, D.J., PAULS, J.F., PITT, B., PRATT, C.M., SCHWARTZ, P.J. and VELTRI, E.P. (1996) Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival With Oral d-Sotalol. *Lancet*, **348**, 7-12.
- WATERSTON, R.H., LINDBLAD-TOH, K., BIRNEY, E., ROGERS, J., ABRIL, J.F., AGARWAL, P., AGARWALA, R., AINSCOUGH, R., ALEXANDERSSON, M., AN, P., ANTONARAKIS, S.E., ATTWOOD, J., BAERTSCH, R., BAILEY, J., BARLOW, K., BECK, S., BERRY, E., BIRREN, B., BLOOM, T., BORK, P., BOTCHERBY, M., BRAY, N., BRENT, M.R., BROWN, D.G., BROWN, S.D., BULT, C., BURTON, J., BUTLER, J., CAMPBELL, R.D., CARNINCI, P., CAWLEY, S., CHIAROMONTE, F., CHINWALLA, A.T., CHURCH, D.M., CLAMP, M., CLEE, C., COLLINS, F.S., COOK, L.L., COPLEY, R.R., COULSON, A., DELEHAUNTY, K.D., DERI, J., DERMITZAKIS, E.T., DEWEY, C., DICKENS, N.J., DIEKHANS, M., DODGE, S., DUBCHAK, I., DUNN, D.M., EDDY, S.R., ELNITSKI, L., EMES, R.D., ESWARA, P., EYRAS, E., FELSENFEELD, A., FEWELL, G.A., FLICEK, P., FOLEY, K., FRANKEL, W.N., FULTON, L.A., FULTON, R.S., FUREY, T.S., GAGE, D., GIBBS, R.A., GLUSMAN, G., GNERRE, S., GOLDMAN, N., GOODSTADT, L., GRAFHAM, D., GRAVES, T.A., GREEN, E.D., GREGORY, S., GUIGO, R., GUYER, M., HARDISON, R.C., HAUSSLER, D., HAYASHIZAKI, Y., HILLIER, L.W., HINRICHS, A., HLAVINA, W., HOLZER, T., HSU, F., HUA, A., HUBBARD, T., HUNT, A., JACKSON, I., JAFFE, D.B., JOHNSON, L.S., JONES, M., JONES, T.A., JOY, A., KAMAL, M., KARLSSON, E.K., KAROLCHIK, D., KASPRZYK, A., KAWAI, J., KEIBLER, E., KELLS, C., KENT, W.J., KIRBY, A., KOLBE, D.L., KORF, I., KUCHERLAPATI, R.S., KULBOKAS, E.J., KULP, D., LANDERS, T., LEGER, J.P., LEONARD, S., LETUNIC, I., LEVINE, R., LI, J., LI, M., LLOYD, C., LUCAS, S., MA, B., MAGLOTT, D.R., MARDIS, E.R., MATTHEWS, L., MAUCELI, E., MAYER, J.H., MCCARTHY, M., MCCOMBIE, W.R., MCLAREN, S., MCLAY, K., MCPHERSON, J.D., MELDRIM, J., MEREDITH, B., MESIROV, J.P., MILLER, W., MINER, T.L., MONGIN, E., MONTGOMERY, K.T., MORGAN, M., MOTT, R., MULLIKIN, J.C., MUZNY, D.M., NASH, W.E., NELSON, J.O., NHAN, M.N., NICOL, R., NING, Z., NUSBAUM, C., O'CONNOR, M.J., OKAZAKI, Y., OLIVER, K., OVERTON-LARTY, E., PACHTER, L., PARRA, G., PEPIN, K.H., PETERSON, J., PEVZNER, P., PLUMB, R., POHL, C.S., POLIAKOV, A., PONCE, T.C., PONTING, C.P., POTTER, S., QUAIL, M., REYMOND, A., ROE, B.A., ROSKIN, K.M., RUBIN, E.M., RUST, A.G., SANTOS, R., SAPOJNIKOV, V., SCHULTZ, B., SCHULTZ, J., SCHWARTZ, M.S., SCHWARTZ, S., SCOTT, C., SEAMAN, S., SEARLE, S., SHARPE, T., SHERIDAN, A., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., SINGER, J.B., SLATER, G., SMIT, A., SMITH, D.R., SPENCER, B., STABENAU, A., STANGE-THOMANN, N., SUGNET, C., SUYAMA, M., TESLER, G., THOMPSON, J., TORRENTS, D., TREVASKIS, E., TROMP, J., UCLA, C., URETA-VIDAL, A., VINSON, J.P., VON NIEDERHAUSERN, A.C., WADE, C.M., WALL, M., WEBER, R.J., WEISS, R.B., WENDL, M.C., WEST, A.P., WETTERSTRAND, K., WHEELER, R.,

- WHELAN, S., WIERZBOWSKI, J., WILLEY, D., WILLIAMS, S., WILSON, R.K., WINTER, E., WORLEY, K.C., WYMAN, D., YANG, S., YANG, S.P., ZDOBNOV, E.M., ZODY, M.C. and LANDER, E.S. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, **420**, 520-562.
- WEISSGERBER, P., HELD, B., BLOCH, W., KAESTNER, L., CHIEN, K.R., FLEISCHMANN, B.K., LIPP, P., FLOCKERZI, V. and FREICHEL, M. (2006) Reduced cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> current in Ca(V)<sub>β2</sub>-embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circ Res*, **99**, 749-757.
- WIJDICKS, E.F. (2001) Neurotoxicity of immunosuppressive drugs. *Liver Transpl*, **7**, 937-942.
- WILLIAMS, R.L., HILTON, D.J., PEASE, S., WILLSON, T.A., STEWART, C.L., GEARING, D.P., WAGNER, E.F., METCALF, D., NICOLA, N.A. and GOUGH, N.M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, **336**, 684-687.
- WITCHER, D.R., KOVACS, R.J., SCHULMAN, H., CEFALI, D.C. and JONES, L.R. (1991) Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem*, **266**, 11144-11152.
- WU, Y., DZHURA, I., COLBRAN, R.J. and ANDERSON, M.E. (2001) Calmodulin kinase and a calmodulin-binding 'IQ' domain facilitate L-type Ca<sup>2+</sup> current in rabbit ventricular myocytes by a common mechanism. *J Physiol*, **535**, 679-687.
- WU, Y., KIMBROUGH, J.T., COLBRAN, R.J. and ANDERSON, M.E. (2004) Calmodulin kinase is functionally targeted to the action potential plateau for regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> current in rabbit cardiomyocytes. *J Physiol*, **554**, 145-155.
- WU, Y., MACMILLAN, L.B., MCNEILL, R.B., COLBRAN, R.J. and ANDERSON, M.E. (1999a) CaM kinase augments cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias. *Am J Physiol*, **276**, H2168-2178.
- WU, Y., RODEN, D.M. and ANDERSON, M.E. (1999b) Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circ Res*, **84**, 906-912.
- WU, Y., SHINTANI, A., GRUETER, C., ZHANG, R., HOU, Y., YANG, J., KRANIAS, E.G., COLBRAN, R.J. and ANDERSON, M.E. (2006) Suppression of dynamic Ca(2+) transient responses to pacing in ventricular myocytes from mice with genetic calmodulin kinase II inhibition. *J Mol Cell Cardiol*, **40**, 213-223.
- WU, Y., TEMPLE, J., ZHANG, R., DZHURA, I., ZHANG, W., TRIMBLE, R., RODEN, D.M., PASSIER, R., OLSON, E.N., COLBRAN, R.J. and ANDERSON, M.E. (2002) Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation*, **106**, 1288-1293.
- XIAO, R.P., CHENG, H., LEDERER, W.J., SUZUKI, T. and LAKATTA, E.G. (1994) Dual regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9659-9663.
- XU, A., HAWKINS, C. and NARAYANAN, N. (1993) Phosphorylation and activation of the Ca(2+)-pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **268**, 8394-8397.
- YAARI, Y., HAMON, B. and LUX, H.D. (1987) Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science*, **235**, 680-682.
- YANG, Y., ZHU, W.Z., JOINER, M.L., ZHANG, R., ODDIS, C.V., HOU, Y., YANG, J., PRICE, E.E., GLEAVES, L., EREN, M., NI, G., VAUGHAN, D.E., XIAO, R.P. and ANDERSON, M.E. (2006) Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **291**, H3065-3075.
- YUAN, W. and BERS, D.M. (1994) Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am J Physiol*, **267**, H982-993.
- ZENG, J. and RUDY, Y. (1995) Early afterdepolarizations in cardiac myocytes: mechanism and rate dependence. *Biophys J*, **68**, 949-964.
- ZHANG, R., KHOO, M.S., WU, Y., YANG, Y., GRUETER, C.E., NI, G., PRICE, E.E., JR., THIEL, W., GUATIMOSIM, S., SONG, L.S., MADU, E.C., SHAH, A.N., VISHNIVETSKAYA, T.A., ATKINSON, J.B., GUREVICH, V.V., SALAMA, G., LEDERER, W.J., COLBRAN, R.J. and ANDERSON, M.E. (2005) Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med*, **11**, 409-417.
- ZHANG, T. and BROWN, J.H. (2004) Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res*, **63**, 476-486.
- ZHANG, T., MAIER, L.S., DALTON, N.D., MIYAMOTO, S., ROSS, J., JR., BERS, D.M. and BROWN, J.H. (2003) The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*, **92**, 912-919.
- ZHOU, H., YU, K., MCCOY, K.L. and LEE, A. (2005) Molecular mechanism for divergent regulation of Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels by calmodulin and Ca<sup>2+</sup>-binding protein-1. *J Biol Chem*, **280**, 29612-29619.
- ZHU, W.Z., WANG, S.Q., CHAKIR, K., YANG, D., ZHANG, T., BROWN, J.H., DEVIC, E., KOBILKA, B.K., CHENG, H. and XIAO, R.P. (2003) Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *J Clin Invest*, **111**, 617-625.
- ZUHLKE, R.D., PITT, G.S., DEISSEROTH, K., TSIEN, R.W. and REUTER, H. (1999) Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature*, **399**, 159-162.
- ZUHLKE, R.D., PITT, G.S., TSIEN, R.W. and REUTER, H. (2000) Ca<sup>2+</sup>-sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the(α)1C subunit. *J Biol Chem*, **275**, 21121-21129.
- ZUHLKE, R.D. and REUTER, H. (1998) Ca<sup>2+</sup>-sensitive inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3287-3294.



13801 ATTTGGGCAGCAATAAAATGACCTTGATAGGCTTTTTTTTTTTGGAAAAGAAAAAGATT  
TAAACCCGTCGTTATTTTACTGGAACCTATCCGAAAAAAAAAACCTTTCTTTTCTAA

13861 AACTAGGAAAGCATTGATAAACCAAGAACTACAAATTTAGAGAATAATTTTTCTTTGA  
TTGATCCTTTCGTAACCTATTTGGTTCTTTGATGTTTAAATCTCTTATTAAGAAAGAACT

13921 AAATTTTCCATGAGCATAGATTTCTGGACTGCCACTAATCACATAAATCAAAGTGAATA  
TTTAAAAAGGTACTCGTATCTAAAGACCTGACGGTGATTAGTGTATTTAGTTTCACTTAT

HindIII

13981 GAGCCATTTAGTTCAAGCTTATCAGAGGTAGCAGCCTTCCCTTCGAGGTGCAGATTAGTG  
CTCGGTAAATCAAGTTTCAATAGTCTCCATCGTCGGAAGGGAAAGCTCCACGCTAATCAC

HpaI BglII

14041 CTAATGTTAACTGAAATGCTCTCAATAAATAAATAGCATTAACTACAGTAGATCTTGA  
GATTACAATTGTGACTTTACGAGAGTTATTTATTTATCGTAATTGATGTCATCTAGAAGT

14101 AAAGGTTGTCAAATCCCAGCCTTTTACGATGGTGTGTTTTTTCATCTGTGACTGAGGAATA  
TTTCCAACAGTTTTAGGGTCGGAAAATGCTACCACACAAAAGTAGACACTGACTCCTTAT

14161 AATTATCTCTAGTCATGCAAACCTCGGTAATAGAGGCAGAACTTCCCCACTCAGCCTAGA  
TTAATAGAGATCAGTACGTTTGGCCATTATCTCCGTCTTTGAAGGGGTGAGTCGGATCT

DraI

SpeI AhaIII RleAI

14221 AGATGAACTAGTATGGATGTTTTAAAAACAGAAACAAGGCATTATAAACACTAAGATGTGG  
TCTACTTGATCATACTACAAATTTTGTCTTTGTTCCGTAATATTTGTGATCTACACC

AsuII Bsc91I

Csp45I BbvII NheI

14281 GGCACGGCCATTTCGAAGACAAAGGACCCAGGCAAGTGTGGAAGATGCTAGCAGATCAGCT  
CCGTGCCGGTAAGCTTCTGTTTCTGGGTCCGTTTACACCTTCTACGATCGTCTAGTCGA

14341 TTGTAAAGAGTGGGTAGATCAGTGAGCTGGGAGAGCCACCAAGAAAATCACCAGCTTGGG  
AACATTTCTCACCCATCTAGTCACTCGACCCTCTCGGTGGTTCTTTTAGTGGTCGAACCC

**BamHI**↓ **↓ClaI** SspI

14401 ATAACCAGTCAGTAACTACACTAGACAAGATAGTGTGCTCTCACTTTTTCTGGTCAATAT  
TATTGGTCAGTCATTGATGTGATCTGTTCTATCACACGAGAGTGAAAAAGACCAGTTATA

14461 TTTGTTGAAAGTTCTATCCAGTGGGATAATGTAAGACAGATGGGCTGGAGCAATGGCTTG  
AAACAACCTTCAAGATAGGTACGCTATTACATTCTGTCTACCCGACCTCGTTACCGAAC

BsiI

14521 GTGGGTAAAGTCCCTGTGAGCACGAGGACCTGAGTTTLAGAGCCCCGGTTGCTGTGGTGGC  
CACCCATTTTCAGGGACACTCGTGCTCCTGGACTCAAATCTCGGGGCCAACGACACCACCG

14581 ACTCTAAACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAT  
TGAGATTTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTA

14641 GTGTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGATTTGAATGTATTACAATTAATAAATAAATAA  
CACACATACACACACACACACACACTAACTTACATAATGTTAATTTTATTTATTT

14701 TAAAGCTATAGACAAGCTGTATACCAAAGTGAGACTTTTLAGAGCATGTAACAAAGG  
ATTTTCGATATCTGTTTCGACATATGGTTTCACTCTGAAAATCTCGTACATTGATTGTTTCC

14761 AATTATTGTGAAAATACCAAGGACCTTCAAATGAACAAGGAGATACATAGCCCGTCACT  
TTAATAACACTTTTATGGTTTCTGGGAAGTTTACTTGTTCCTCTATGTATCGGGCAGTGA

14821 CTAATGAGCAAAACCATGAAAATGCAGTCAAGAAGAGTCAAAAACCAAAGCTCTCATCCT  
GATTACTCGTTTTGGTACTTTTACGTCAGTTCTTCTCAGTTTTTGGTTTTCGAGAGTAGGA



Bsc91I  
BbvII

15781 GGATCAGGGCAGTCCCAGCAAAACAGTTGGGAAGACTGAATTAGTAGAGATGCCTCACCC  
CCTAGTCCCCTCAGGGTCGTTTTTGTCAACCCCTTCTGACTTAATCATCTCTACGGAGTGGG

15841 CTGAAAAGAGCTAGAAGCCTTGGCCCAGAGCAACTCAGCTAGGTTCTCATCCATTTACA  
GACTTTTTCTCGATCTTCGGAACCGGGTCTCGTTGAGTCGATCCAAGGAGTAGGTAAATGT

HindIII

15901 GCTCTTGTATGGTAGCATTGCTATAGAAGGCCAAAGATGTGTGGAAGCTTGGCATGAACT  
CGAGAACAATACCATCGTAACGATATCTTCCGTTTCTACACACCTTCGAACCGTACTTGA

EcoNI  
KpnI  
Asp718I  
Acc65I

15961 TGTATGCCTCTGGTACCTTGCTCAGGAGTAAGAGAAAGATGACCAGACAGAGCATCTGTC  
ACATACGGAGACCATGGAACGAGTCCTCATTCTCTTTCTACTGGTCTGTCTCGTAGACAG

XmnI

16021 TGTCACTGGCTTCTTGGTGGGAAGGAAGCTGTTCTGTCTACGTGAAGGGTTCATCCCTCA  
ACAGTGACCGAAGAACCACCCTTCTTCGACAAGACAGATGCACTTCCCAAGTAGGGAGT

16081 CAATGGCTCAAGGGAACAGTGTGAGTTCATGTCCAAGGAACCCAAATCTTGCAATGGG  
GTTACCGAGTTCCTTGTCAACTCAAGTACAGGTTCTTGGGTTTAAGAACGTTACCC

AclI

16141 CATCCTAAGTGCCAGCATATTGCTGATACTTGGAAAACGTTGCCTTCTGACATCCTGGACA  
GTAGGATTCACGGTCGTATAACGACTATGAACCTTTGCAACGGAAGACTGTAGGACCTGT

16201 CTAGCTGGTGAGGTGGGCTTAGGCAGCACATGTGTGAACCTCAGTGTGCCAACTGTTCCC  
GATCGACCACTCCACCCGAATCCGTGTCGTACACACTTGGAGTCACACGGTTGACAAGGG

PstI **Exon 36**

16261 TGCAGATCATCAACCTCTTTGTAGCTGTTATCATGGACAACCTTTGACTACCTGACTAGGG  
ACGTC TAGTAGTTGGAGAAACATCGACAATAGTACCTGTTGAAACTGATGGACTGATCCC

**S1512** PflMI EcoRI

16321 ATTGGTCTATCCTCGGTCCCCATCACTGGATGAATTCAGAGAACTCTGGGCCGAGTATG  
TAACAGATAGGAGCCAGGGGTAGTGGACCTACTTAAGTTCTCTTAGACCCGGCTCATA

Eco57I  
XbaI RleAI

16381 ACCCTGAAGCCAA GTAAGTTTCTAGAGGGACCTGTGGCTCCACACTGAGAGAGGGGGTT  
TGGGACTTTCGGTTCATTCAAAGATCTCCCTGGACACCGAGGGTGTGACTCTCTCCCCAA

16441 GAGTGGCCTGTAGAAAAGGTACGAGAGGGTACGACTGGGTATGCTAACTGAGATAATCA  
CTCACCAGGACATCTTTTCCATGCTCTCCAGTCGTGACCCATACGATTGACTCTATTAGT

ScaI

16501 GAAAGCTGGCAAGATGAGGCCAAGTACTGTTCACTGAGCTGGGGAACATATCTGTTGAAT  
CTTTCGACCGTTTCTACTCCGGTTCATGACAAGTACTCGACCCCTTGTATAGACAACCTTA

16561 GGAAGAGTAAAAGATTCTAGTGTGAGAGGAACTAGAAAACTTACATTGGGTTATTGAG  
CCTTCTCATTCTTAAGATCACAGTCTCCTTTGATCTTTTTGAATGTAACCCAATAACT

16621 GGACAGGTAAACTTTAGCTCCATCTCAACCTCTGGTTTAGAGAAGCTCTTATTTACCCAT  
CCTGTCCATTTGAAATCGAGGTAGAGTTGGAGACCAAATCTCTTCGAGAATAAATGGGTA

BstXI

16681 AACTGTTGACTGACCATCCCTAAATCCCCTCCAGCCAAATGGTTAGTTGACTGAGCAACA





BsmI

18481 ACATTGCTGCCATTCACAGTGGGCATTCTGCTCTTTCTCCTGATGACCCCTGTGTGTGCT  
TGTAACGACGGTAAGTGTACCCCGTAAGACGAGAAAAGAGGACTACTGGGGACACACACGA

BstXI BspMI

18541 GCTGGCTCACCAAGGGAGTGGGATGCCAAGGGAGCAGGTTTTAGGGGTGAAGGGCAGCAA  
CGACCGAGTGGTTCCTCACCCTACGGTTCCTCGTCCAAAGTCCCCACTTCCCGTCGT

18601 ACTCCTGTTAGAGTGAGTGAGTCTGAGATTAGGTTTTGAAGGAGAGGTAAGTGTGTCTATA  
TGAGGACAATCTCACTCACTCAGACTCTAATCCAAACTTCTCTCCATTACACAGATAT

PflMI  
NcoI

18661 TTCAGAGCCTTTTCATATTCCCAATCCATGGGAGTATAGATATTTCTGTCTGGCAGGCAA  
AAGTCTCGGAAAAGTATAAGGGTTAGGTACCCTCATATCTATAAAGACAGACCGTCCGTT

ApaBI

18721 GTGGTGCCTAGAAAATGCCTGGCACATGGCTGTTCTTGCTGCTAGTAGATAGCACAACTG  
CACCACGGATCTTTTACGGACCGTGTACCGACAAGAACGACGATCATCTATCGTGTGAC

18781 TGTCTGTAGGTCTGGGCACGAAGCGGGAAAGAACCTTTGAGGATGCAAGGGTCTAAGGAA  
ACAGACATCCAGACCCGTGCTTCGCCCTTTCTTGAAACTCCTACGTTCCAGATTCCCTT

18841 TGTAGGGGTACAAGAGTGTTTAACCACAAAACCCAGTTTCTCCCTGAAAAAACTTTGAAA  
ACATCCCCATGTTCTCACAAATTGGTGTTTTGGGTCAAAGAGGGACTTTTTTGAAACTTT

NsiI PvuII HindIII

18901 GCAGAAAACGCTGTGGTGAGCCCATGCATACCCCTCCCAGCTCCAGCTGTACCCATCCAA  
CGTCTTTTGCACACCACTCGGGTACGTATGGGGAGGGTGAGGGTCGACATGGGTAGGTT

18961 GCTTCTAGGAATCTCCCAGCCTTCTGCCATCGGAAGGACTGCCTGCCTGCCATTGTAC  
CGAAGATCCTTAGAGGGTCGGAAGGACGGTAGCCTTCTGACGGACGGACGGTAACAGTG

AlwNI

PstI **Exon 38**

19021 TGA CT CAG CCT C C T T T C C C C T G C A G **CGCCTGGTCTCCATGAACATGCCTCTGAACAGCGA**  
ACTGAGTCGGAGGAAAGGGGACGTC **GCGGACCACAGGTA CT TGTACGGAGACTTGTTCGCT**

**S1570**

Bsu36I  
CvnI  
SauI

19081 **TGGCAGATCATGTTCAATGCTACCCTGTTTGCCTCGTCAGGACAGCCCTGAGGATCAA**  
**ACCGTGTCAGTACAAGTTACGATGGGACAAACGGGAGCAGTCTGTTCGGGACTCCTAGTT**

19141 **AACAGAAG**GTAATATAACTCTTGCAGGACCACTGGCAGGAGGATGCCTAAGATAGACTTGG  
**TTGTCTTC**CATTATATTGAGAACGCCTGGTGACCGTCTCTACGGATTCTATCTGAACC

RleAI  
DraI  
AhaIII

19201 ATTAGCAGCAGGCTTGTCTCCCAAACGCTCAACTCTCTTTTGAATTTAAAGGACCTCTG  
TAATCGTCGTCCGAACAGAGGGTTTGCAGATTGAGAGAAAACCTTTAAATTTCTTGAGAC

AlwNI SphI

19261 TGGGGAAAATGACCTTGACTAGCAGTGACTGTGGTAAACAGAAGTTACTGCATGCGATTG  
ACCCCTTTTACTGGAAGTATCGTCACTGACACCATTTGTCTTCAATGACGTACGCTAAC

PmaCI PmaCI  
Eco72I Eco72I  
BsmI BsmI

19321 CTAAGGGTTAGAATGCCACGTGTGCTGTTCTAAGGGTTAGAATGCCACGTGTGCTGTTTCG  
GATTTCCCAATCTTACGGTGCACACGACAAGATTCCCAATCTTACGGTGCACACGACAAGC





Bsu36I  
 SauI  
 CvnI  
 MstII  
 21181 GTGCCTTAGGTCTGAACAAATGATCTTGAATGTGGTTCTTCTCACAATTTACGAGAGCAG  
 CACGGAATCCAGACTTGTTTACTAGAACTTACACCAAGAAGAGTGTAAATGCTCTCGTC

StuI  
 21241 ACACCCAGAGTGAGGTGTTGGCAGGCTGGCTCTTTCTGGAGGCCTCTGGTAGTCTCGTCG  
 TGTGGGTCTCACTCCACAACCGTCCGACCGAGAAAGACCTCCGGAGACCATCAGAGCAGC

DraIII  
 21301 AGTACCTGGCTCCATCCTTCGTCTCCGCTGCTCTTTACGGTGTGACTCACCTGTGTGC  
 TCATGGACCGAGGTAGGAAGCAGAGGCGACGAGAGAAGTGCCACACTGAGTGGACACACG

PmaCI  
 Eco72I  
 BstXI NsiI  
 21361 CTCTGGCCTTTTCCTCTTGCTCTAATGGCACCAATCACGTGGGATGCATGGTCCACCTAA  
 GAGACCGGAAAAGGAGAACGAGATTACCGTGGTTAGTGCACCCTACGTACCAGGTGGATT

XbaI  
 BbvII  
 SpeI Bsc91I  
 21421 CACATCATTATTTCACTAGTGAGCTTGGTGAAGACCCCGTTTCTAGATAAAATTCACATTC  
 GTGTAGTAATAAAGTGATCACTCGAACCACCTTCTGGGGCAAAGATCTATTTAAGTGTAAG

21481 TGAGGTTTCAGGGAGACATGAGTTTTGGGGTATTTTTTTTTAAACCCAGTGCAAAAAGCTAAGT  
 ACTCCAAAGTCCCTCTGTACTCAAACCCCATAAAAAAAATTTGGGTACGTTTTTCGATTCA

DraIII  
 21541 TCATTGGCACATTGGTTTTGCTCAGGGTTCTTTCACTGCGTGTGTCAGAAACCACCAAGAC  
 AGTAACCGTGTAAACCAAACGAGTCCCAAGAAAGTGACGCACACAGTCTTTGGTGGTCTG

Bsp1407I AlwNI BspHI  
 21601 CAGAAGGATTGTACACACCTTCATTCCCAGCGTCTGAAAGCCCCGAAGCAGGAGGATCATG  
 GTCTTCCTAACATGTGTGGAAGTAAGGGTTCGCAGACTTTTCGGGCTTCGTCTCCTAGTAC

21661 AGTTTGAGGCAAATCATAGATACATGATAAACTCTTGTTTTGAAAAAAAAAAAAACAACAAAC  
 TCAAACCTCCGTTTAGTATCTATGTACTATTTGAGAACAACTTTTTTTTTTTTGTGTTTG

Eco57I  
 StuI Eco57I  
 21721 AAAAACTCCTGGACCACCTTTAGTGAAGGGAAGTGAAGGCCTGTTGGGATGCCTGGGAGG  
 TTTTTGAGGACCTGGTGGAAATCACTTCCCTTGACTTCCGGACAACCCTACGGACCCCTCC

21781 GGTTCTGGCTTCAGTGCAGTATGAATTTGATGCTCAAGGCGCTCAGGAGCCATTGCCCTC  
 CCAAGACCGAAGTCACGTCATACTTAAACTACGAGTTCGCGAGTCTCGGTAACGGGAG

SauI  
 Bsu36I  
 MstII  
 CvnI  
 BspHI  
 21841 TCCTCATGACCGCCACTGCTTGCCTCCCATGCCCTAATCCAGAGTTGTGCCTGACCTCAG  
 AGGAGTACTGGCGGTGACGAACGGAGGGTACGGGATTAGGTCTCAACACGGACTGGAGTC

SacI  
 SstI  
 Ecl136II  
 EcoICRI  
 21901 GCCGTCTGACCCAGAGCTCACACCGTTTGCATCCCCTCCCATAACTGTAGCTATCAGC  
 CGGCAGACTGGGGTCTCGAGTGTGGCAAACGGTAGGGGAGGGTATTGACATCGATAGTCG





23821 CATATCTTTTCTAAAACTCATTTTTTTCCCTAGAGTAGCATTTCTCATGCCTACCAAGC  
GTATAGAAAAGATTTTTGAGTAAAAAAGGGATCTCATCGTAAAGAGTACGGATGGTTCC

ScaI

23881 CACAAGCCCCTTTTCTAGCAAGTACTTCATACCATCCCTGCTAAAAATCCAAAAGTTGAAA  
GTGTTCCGGGAAAAGGATCGTTCATGAAGTATGGTAGGGACGATTTTAGGTTTCAACTTT

BsmI

23941 TTGTAGATAACATGCCTGCGCTTGTAAATTTCCACAACAGTAGAATGCTTAAAGTAGGGTG  
AACATCTATTGTACGGACGCGAACATTAAGGTGTTGTCATCTTACGAATTCATCCCAC

NsiI

24001 TGTTAAAATCATCTGCATCCAATATACAAATGCATGGTACACCTATACAAAATGCTATGA  
ACAATTTTAGTAGACGTAGGTTATATGTTTACGTACCATGTGGATATGTTTTACGATACT

24061 CGACTGATGGAGTCCACACACACAGACACTTAGAACGAGTAACTGTTGAAAGGAAACAAG  
GCTGACTACCTCAGGTGTGTGTCTGTGAATCTTGCTCATTGACAACCTTCTTTGTTC

SspI

24121 ACAGTGTAATATTGTCAGCACTTTTCAATTTGTTGCATATATTTTATTAACATGTTAGTTG  
TGTCACATTTATAACAGTCGTGAAAGTAAACAACGTATATAAAAATAATTGTACAATCAAC

BsmI

Eco57I

Eco31I

24181 AACCCACGCATTCTGGAAACATCTTCAGGGGGTGATTCTTCTGTTTGAGACCCACTTCC  
TTGGGTGCGTAAGACCTTTGTAGAAGTCCCCACTAAGAAGGACAAACTCTGGGTGAAGG

DraIII

Eco31I

24241 GAAAGGGAAAGCAAGGTAGGCTGGGAGTCACCGTGTGAGGTCTCATGCTCTGCGGCATCA  
CTTTCCCTTTTCGTTCCATCCGACCCTCAGTGGCACACTCCAGAGTACGAGACGCCGTAGT

PflMI

AlwNI

24301 TTTTCTTGCTGCCCCGAAGTGTCTCTGTGAGGTTTACACCAGGCACTGGTGTTCATAGAA  
AAAAGGAACGACGGGCTTACAGAGACACTCCAAGTGTGGTCCGTGACCACAAGTATCTT

PinAI

StuI

AgeI

EcoRI

SalI

XcmI

24361 GAGATACCGGTTTTTTCAGTGAATTCAGTGTGCACTTAGGCATCCAGCTCAGGCCTGGAAG  
CTCTATGGCCAAAAAGTCACTTAAGTACAGCTGAATCCGTAGGTCGAGTCCGGACCTTC

AvrII

Eam1105I

24421 AACCTAGGACTCCAAGTCCATTTCCCAATTTACCTCATCAGGAATCTCCAGGGTTTTCTCT  
TTGGATCCTGAGGTTTCAGGTAAGGGTTAAATGGAGTAGTCCTTAGAGGTCCCAAAAGAGA

RleAI

24481 TCCATGTAGAAATGAGTCCCTGCCCCACAGCAAGCCCAGAACTTCTGTAGAGTTGGGTTC  
AGGTACATCTTTACTCAGGGACGGGGTGTGTTTCGGGTCTTGAAGACATCTCAACCCAAG

Bpu1102I

BclI

BspMI

EspI

24541 TCCAGTTGGCTACTCTCAAGGGACAGTGATGATCAGGAAAGCCATCGCAGGTCCCCAGGC  
AGGTCAACCGATGAGAGTTCCTGTCACTACTAGTCCTTTTCGGTAGCGTCCAGGGTCCG

BstXI

24601 TCAGCCCAACCATCTGTGCTCTCACACAAGATGAAGGGGCCACTTGCCTGGCATGAAAC  
AGTCGGGTTGGTAGACAGCGAGAGTGTGTTTACTTCCCCGGTGAACGGACCGTACTTTG

BamHI↓

24661 ATTCTCTAGACGCTTACAGCTTCCCTACCATTTAGCACACTCCTAAGATCCAGACTATG  
TAAGAGGATCTGCGAATGTGCAAGGGATGGTAAATCGTGTGAGGATTCTAGGTCTGATAC

↓**clai** BsiI  
 24721 TCATGTGTGGTCTGGTGCATCCAGCCTAGCAAGGACTCGTGTCAAGCCAGTCTGCCTGGC  
 AGTACACACCAGACCACGTAGGTCGGATCGTTCTGAGCACAGTTCGGTCAGACGGACCG

XcmI BbvII  
 Bsc91I  
 24781 TGGAAGGGAAATCGCCAACCTTGTGTTGGCAGTGAGAAGACTGGCTATTTTCATGGTAAGT  
 ACCTTCCCTTTAGCGGTTGGAACACAACCGTCACTCTTCTGACCGATAAAGTACCATTCA

24841 GGAACCAACGAGACTTAGTAATGTCTATTCAGGAGGGGTGAAAAAATAGATGGGAAGTA  
 CCTTGGTTGCTCTGAATCATTACAGATAAGTCCCTCCCCACTTTTTTTATCTACCTTCAT

24901 ACCTTGACAAGATCCAACCTTTCTGTGAGGGAAAAATGAAGGGAAAAAACAAGCCCA  
 TGGAACTGTTCTAGGTTGGAAGGACACTCCCTTTTTACTTCCCTTTTTTTTTGTCGGT

Bsp1407I  
 24961 TGTACAGACAGGAACAAGCAGTTTAATAAATAAAAGAAGTTTTAGGTGCTGAAAAATATC  
 ACATGTCTGTCCTTGTTCGTCAAATTATTTATTTCTTCAAATCCACGACTTTTTATAG

BstEII **Exon 40**  
 25021 AAGGTAACCTGGTGGGATCACTCATCTTTTTCTCTTCTCCGTATGCCTTAG**ATGACGAGG**  
 TTCCATTGGACCACCCTAGTGAGTAGAAAAAGAGAAGAGGCATACGGAATC**ACTGCTCC**

**IQ-Motiv** ScaI  
 25081 **TCACAGTGGGCAAGTTCTATGCCACCTTCTGATCCAAGACTTTCAGGAAATTC AAGA**  
**AGTGTCAACCGTTCAAGATACGGTGAAGGACTAGGTTTCATGAAGTCTTTAAGTTCT**

AlwNI EcoNI BsmI  
 25141 **AGCGAAAAGAGCAGGGGCTGGTGGGCAAGCCCTCACAAAGGAATGCACTGTCCCTCCAGG**  
**TCGCTTTTCTCGTCCCCGACCACCCGTTCCGGGAGTGTTCCTTACGTGACAGGGAGGTC**

BstEII  
 RleAI  
 25201 TGAGGGGCTGGAAGGGGGTGGCCACACTCAAAGGTCTGGTCACTCCCACTGACCCTAT  
 ACTCCCCGACCTTCCCCACGGGTGTGAGTTTCCAGGACCAGTGGAGGGTACTGGGATA

NheI  
 25261 TGAGGGTCCAAGCCCTGCTAGCTACCTAGAGGCTAAGTCCCATCACAAAGAACCCCTGTGA  
 ACTCCCAGGTTCCGGACGATCGATGGATCTCCGATTCAGGGTAGTGTCTTGGGGACACT

SapI  
 25321 GCACTGTAACCCGAAGGCGGCTATGGGAAGGCAGTGTGCTCTTCTTCCCCCTCCCCCTCA  
 CGTGACATTGGGCTTCCGCCGATAACCTTCCGTCACACGAGAAGAAGGGGGAGGGGAGT

RleAI  
 25381 CATTCTGGCCACAGGCTTCCCTCAGCAGCCCTGCTGCCTCTCCTAGCCCCTGGTTCTTG  
 GTAAGACCGGGTGTCCGAAGGGAGTCGTCCGGACGACGGAGAGGATCGGGGACCAAGAAC

clai↓ ↓clai  
 25441 CTGATCCTGTAACATACTTAATTCCTCCTAGAAAGATGGATAGATTCTTCTGCTCTAGG  
 GACTAGGACATTGTATGGAATTAAGGAGGATCTTTCTACCTATCTAAGAAGACGAGATCC

DraIII  
 PflMI BstXI  
 25501 ATGATGGGGCAGGGGTGTCCAGGGAAGCCCATCACCTGGTGTGGAGAACCAACTGCCTG  
 TACTACCCCGTCCCCACAGGTCCCTTCGGGTAGTGGACCACACCTCTTGGTTGACGGAC

PflMI Bsc91I  
 BsiI DraIII BbvII  
 25561 GCAGAGCAGAGAGGCAGGGACTTGGGAAGGAGCCACGAGGTGGAAAAGATCAGTGGAAAAG  
 CGTCTCGTCTCTCCGTCCCTGAACCCTTCTCGGTGCTCCACCTTTCTAGTCACTTTCC

PmaCI

Eco72I

**Exon 41**

25621 ACTTGGGTCTTCACGTGTCCTTCTGGGTTCAGGCTGGCTTGCGCACCTTGCATGACATT  
TGAACCCAGAAGTGCACAGGAAGACCCAAGGTCGACCGAACGCGTGGAACGTACTGTAA

25681 GGGCCTGAGATCCGGCGGGCCATCTCTGGGGATCTGACTGCTGAGGAGGAGTTGGACAAG  
CCCGGACTCTAGGCCGCCCGGTAGAGACCCCTAGACTGACGACTCCTCCTCAACCTGTTG

Eco57I

25741 GCTATGAAGGAGGCGGTGTCTGCTGCCTCCGAAGATGACATCTTCAGGTAAGTGCCATG  
CGATACTTCTCCGCCACAGACGACGGAGGCTTCTACTGTAGAAGTCCATTACGGTAC

ApaLI  
Alw44I

25801 ACTGGTGTCTTTGTGAAGTTTCAAGTTCAGTCCGGGGCAACCGTGCACCTAAGTCTCAGGGTTTTGC  
TGACCACAGGAAACACTTCAAGTTCAGCCCCCGTTGGCACGTGATTCAGAGTCCCAAAACG

25861 CTTATCTCTCTGAGGAGTGCCCACTCTCCCTAACAGCTATCTCCTGATCCTCTGCCTCC  
GAATAGAGAGACTCCTCACGGGTGAGAGGGATTGGTCGATAGAGGACTAGGAGACGGAGG

Bali  
MscI

25921 TTCCTGAGCCCAGGCCATGCCATGCCATCCTTCTAGGACACAGCAGCTCAAAAAGATGGCC  
AAGGACTCGGGTCCGGTACGGTACGGTAGGAAGATCCTGTGTCTCGAGTTTTCTACCGG

BamHI XbaI

25981 AGCTCTCAGAGAACAGGGGGATCCTGTTTTCTAGAAAGGAATTTTCTGGAGAAGTTTTCTC  
TCGAGAGTCTCTTGTCCCCCTAGGACAAAGATCTTTCTTAAAAGGACCTCTTCAAAGAG

26041 ATCAGAAGGTGTGGAATAGGAACCTCCTGAGCCACATCTAATCTGAAAGCCTGCTTTATTC  
TAGTCTTCCACACCTTATCCTTGAGGACTCGGTGTAGATTAGACTTTCGGACGAAATAAG

SspI

26101 ACCAATATTTGAATATCTGGCACATCTAAGTAGAAATATAAACTTACGGCTTTTTCTTGGA  
TGGTTATAAACTTATAGACCGTGTAGATTTCATCTTTATATTTGAATGCCGAAAAGAACCT

RleAI  
BsmI

26161 GGACAAGTAGGTTAAGCATTTCATGTTTCGATGTGGGTTCTCATGTGGCAGACAGACAAAACA  
CCTGTTTCATCCAATTCGTAAGTACAAGCTACACCCAAGAGTACACCGTCTGTCTGTTTGT

KpnI  
Asp718I  
Acc65I StuI

PvuII

26221 TCAGCTGCCCCGGTTAAGATGGAGCATGTGATGTCTGGGGCACAGTGGTACCCTCCAGGCC  
AGTCGACGGGCCAATTCTACCTCGTACACTACAGACCCCCGTGTCACCATGGGAGGTCCGG

VspI  
SspI

26281 TCCTCCTCTTTTTCTGGAGTAATATTAATGCAGTGGGAAAGATCAAACACTGCTGTGCCG  
AGGAGGAGAAAAAGACCTCATTATAATTACGTACCCTTTCTAGTTTGTGACGACACGGC

26341 TACAACGACAGTCTCCCATCTTGTTACCTCCCTTGTCTTTCTGCCAACCCAGTCCCCA  
ATGTTGCTGTGAGGGGTAGAACAAATGGAGGGAACAAGAAAGACGGTTGGGGTCAGGGGT

MscI  
Bali

26401 GATCCGTTTTCCAGACTATAAAGCACACAGGGAACCAAGCCCAGCCCACCCTGCTATGGC  
CTAGGCAAAGGGTCTGATATTTTCGTGTGTCCCTTGGTTCCGGTCCGGTGGGACGATACCG

26461 CAGCCTTGCAACCTTCCTGGCATCACTGAGTTGTCCATCAGTGAATGGCCTCAGAGATAC  
GTCGGAACGTTGGAAGGACCGTAGTGACTCAACAGGTAGTCACTTACCGGAGTCTCTATG

26521 ACAACACCACTCTCATAAGACCTTAGAAGCCAAGATGTCACCAGAACCCAGGGACGTTCA  
TGTTGTGGTGAGAGTATTCTGGAATCTTCGGTCTACAGTGGTCTTGGGTCCCTGCAAGT

EcoRV

26581 GATATCAAAGATTATTAGACAAACCTTGCAAACCATCACTTCCCCACCCCTTGCTCTGG  
CTATAGTTTCTAATAATCTGTTTGGAAACGTTTGGTAGTGAAGGGGGTGGGGAACGAGACC

SspI

Eam1105I BamHI

26641 GACAAAGTAGGAATATTGGAGAAAATCACTTATCCCTGACTTCAAGTCTCAGAGGATCCC  
CTGTTTCATCCTTATAACCTCTTTTAGTGAATAGGGACTGAAGTTCAGAGTCTCCTAGGG

EcoRV

26701 CTACAGGAAAGGGAGCCATGATATCACTGAGTCAGTAGACTCTACGCACCTAGCTTCAAT  
GATGTCCTTTCCCTCGGTACTATAGTGACTCAGTCATCTGAGATGCGTGGATCGAAGTTA

26761 CTGCACAGTGCAGCTTCTAGCTCCACAGGCCAGTTATATTTCCACTGAAACAATCTAGTT  
GACGTGTCACGTGCAAGATCGAGGTGTCCGGTCAATATAAAGGTGACTTTGTTAGATCAA

26821 CCTGCCTTCCCTTCCATCTCCCCACCCCTCCAGCACTCCCAGCAGGCTCCCCAAAGCTAA  
GGACGGAAGGGAAGGTAGAGGGGTGGGGAGGTGCGTGAGGGTTCGTCGAGGGGTTTCGATT

PvuII

RleAI

26881 ACAGCTGGCTTCTGTGGGGGAACGCCATCTCAGACTTGTCCCTGAAACCCAACCTCAGTC  
TGTCGACCGAAGACACCCCCTTGCGGTAGAGTCTGAACAGGGACTTTGGGTGGAGTCAG

XbaI

XcmI

HindIII

26941 TCCAGTGCTCTTTTGGGAACAACCTTCCAGGGAAGCTTCTAGATCAGCAACCACTTGCTT  
AGGTCACGAGAAAACCCCTTGTGGAAAGGTCCCTTCGAAGATCTAGTTCGTTGGTGAACGGA

KpnI

Acc65I

EcoRI

Asp718I

BsiI

27001 GTCCAGGCCCAGGAGGAATTCCTGCCCTGGTGTCTGAGGGTACCTGTAGGGCCACGAGCA  
CAGGTCGGGTCTCCTTAAGGACGGGACCACGACATCCCATGGACATCCCGGTGCTCGT

PflMI

27061 TCTAAGTCCCTCCCTTTACCATGTGTCCAGAGTGTGGTAGAGGTCAAACCTGAAGGTCAAG  
AGATTCAGGGAGGGAAATGGTACACAGGTCTCACACCATCTCCAGTTTGACTTCCAGTTC

Eco57I

27121 CTCGCTCCCCTGTGGCCTGTGCCTCTCAACCACTGCCGTACAAGGGAAGCAGGGGTGAGG  
GAGCGAGGGGACACCGGACACGGAGAGTTGGTGACGGCATGTTCCCTTCGTCCCCACTCC

## Exon 42

BspMI

27181 GGGAGAGGAGAGAGAGATGATGGAGACGCCTTCTACACCTGCACCTCTGTCTTGTCCCCA  
CCTCTCCTCTCTCTACTACCTCTGCGGAAGATGTGGACGTGGAGACAGAACAGGGGT

BstXI StuI BglI

27241 GAGGGCTGGAGGCCTGTTCCGGCAACCATGTCACCTACTATCAGAGTGACAGCAGGGGCAA  
CTCCCACCTCCGGACAAGCCGTTGGTACAGTGGATGATAGTCTCACTGTCTCGTCCCCTGTT

27301 CTTTCCTCAGACGTTCCGCCACCCAGCGCCCACTGCACATCAACAAGACAGGGAAACAACCA  
GAAAGGAGTCTGCAAGCGGTGGGTGCGGGGTGACGTGTAGTTGTTCTGTCCCTTGTTGGT

Eam1105I

27361 AGCTGACACTGAGTCACCGTCCCATGAGAAGCTGGTGGACTCCACGTTACCCCCAGCAG

TCGACTGTGACTCAGTGGCAGGGTACTCTTCGACCACCTGAGGTGCAAGTGGGGTTCGTG

27421 CTACTCATCCACGGGCTCCAATGCCAACATCAACAATGCCAACAACTGCCCTGGGCCG  
GATGAGTAGGTGCCCCGAGGTTACGGTTGTAGTTGTTACGGTTGTTGTGACGGGACCCGGC

BstXI NcoI

27481 CTTCCCCATCCCGCTGGCTACTCCAGCACGGTCAGCACTGTGGAGGGCCATGGGCCTCC  
GAAGGGGGTAGGGCGACCGATGAGGTCGTGCCAGTCGTGACACCTCCCGGTACCCGAGG

Bpu1102I  
EspI

27541 CTTGTCCCCTGCTGTCCGAGTACAGGAGGCAGCATGGAAGCTCAGCTCTAAGAGGTAAGC  
GAACAGGGGACGACAGGCTCATGTCTCCGTCGTACCTTCGAGTCGAGATTCTCCATTTCG

BalI  
StuI MscI BglI

27601 AGGAGGGTAGGCCTGGCCATGAGGGCTCACATACCCTACCCAGACAACACCAGGAAAGAT  
TCCTCCCATCCGGACCGGTACTCCCAGAGTGTATGGGATGGGTCTGTTGTGGTCTTTCTA

RleAI Eco57I

27661 GGGCTTATTCTGTCTGCTCAGACAAGCCTTCTGTGTGGGGTCCCTGCTCTGTGCCTTCCC  
CCCGAATAAGACAGACGAGTCTGTTCCGAAGACACACCCAGGGACGAGACACGGAAGGG

27721 TTCAGGGTCAGAACAGAGAGGTATTGAATAGGATTCCAGGGACTTGTGAGTTGGGTCAAG  
AAGTCCCAGTCTTGTCTCTCCATAACTTATCCTAAGGTCCCTGAACAGTCAACCCAGTTC

NheI RleAI

27781 CCATCTCCTAAAGGCTCTGCTGCCACAGCTAGCCTGTGGTTCCTTGTATTGACTGCCCA  
GGTAGAGGATTTCCGAGACGACGGGTGTGATCGGACACCAAGGAACATAACTGACGGGT

27841 GACCAGGATGCTGCTTCAAAACCAAGTCTCCACATCTGTCTTTACATGTTTAAAGTTTGTG  
CTGGTCTACGACGAAGTTTTGGTTCCAGAGGTGTAGACAGAAATGTACAAATTCAAACAC

PmaCI  
Eco72I  
ApaLI  
Alw44I

27901 TATGGGGTACATGTACTTGTGTGTGCACGTGTGCGGAGGCCAGGGATTGACATCCAGTAC  
ATACCCCATGTACATGAACACACACGTGCACACGCCTCCGGTCCCTAACTGTAGGTCATG

PvuII

27961 CTTGATTACTTTGCACTGAGCTGGGATTCCTCACTGAACCTGGGGCTACCAATTCAGC  
GAAGCTAATGAAACGTGACTCGACCCTAAGGAGTGACTTGGACCCCGAGTGGTTAAGTCCG

BspHI

28021 TGGTGGCTCCCAGCTTCTCATGAATACTAGGGATTGAGCCTGGGGCTCACGCTTGTATA  
ACCACCGAGGGTCGAAGAGTACTTATGATCCCTAACTCGGACCCCGGAGTGCGAACATAT

NsiI

28081 ACAGTCACCTTACAACCTAAGCCCCTGCGTCATGCATGTTATTCTACCTACTATTATCGAG  
TGTCAGTGAATGTTGATTCCGGGACGCAGTACGTACAATAAGATGGATGATAATAGCTC

DraIII

28141 GAGAAACTGAGGCATGGAGGGAGCTAAAGGTCTTGGGCCACAGTGTGAGAGTTGGTAGC  
CTCTTTTACTCCGTACCTCCCTCGATTTCCAGAACCCGGTGTCACTCTCAACCATCG

Bsc91I  
EcoRI BbvII

28201 AGAATTCAGACCTCCTTGTAGTCTTCCACACAGAGCCCTGACACAGCTTGTGGCATCTGTG  
TCTTAAGTCTGGAGGAACCTCAGAAGGTGTGTCTCGGGACTGTGTGCGAACACCCGTAGACAC





CCCAGTACTTCCTTGTAGTCACCCACTATCGGTTACCAGAACTTTTTTTTAGTTGATTT

SphI

30121 GTAATCCAGAAACAGAGAATGGGGTGCATGCAACTAGGGGGGTGTCTCCTATGGCTAGG  
CATTAGGTCTTTGTCTCTTACCCACGTACGTTGATCCCCCCACAGAGGATACCGATCC

30181 GATGTCTATGGGAGTAGGGATATGTATAATACATTTTTCTCAGTGTGATACAGCATCTAA  
CTACAGATAACCCTCATCCCTATACATATTATGTAAAAAGAGTCACACTATGTCGTAGATT

SauI

Bsu36I

Eco57I

30241 AAGTTTGGGAAGTCATCAACTAGACACCCTAAGGTCTACCACTGCTCTGCTATCTACATGC  
TTCAAACCTTCAGTAGTTGATCTGTGGGATTCCAGATGGTGACGAGACGATAGATGTACG

BglI

30301 GCCCTTCAGGCAGTGGCTTGTATGCTTTTTGGTAGTGAAGGGATAGCCAGGCAGGGGAGAG  
CGGGAAGTCCGTCACCGAACATACGAAAACCATCACTTCCCTATCGGTCCGTCCCCTCTC

30361 TTGGAGGGGTAGGGGATGTTGTGGTAACACTGAGAATGGCCGTAGTGAAGCCAGGCATGT  
AACCTCCCCATCCCCTACAACACCATTGTGACTCTTACCGGCATCACTTCGGTCCGTACA

XmnI

30421 AAGGCCCTTCTAAGAGAATGTTATATGGGCCTAGAACTCTTTCTCCAACCTTTCTCTATAC  
TTCCGGGAAGATTCTCTTACAATATACCCGGATCTTGAGAAAGAGGTTGAAAGAGATATG

30481 CCAGGAAAGCCCCACTGGCTGAAATCAGCAATGCAAGGAAGGCTAGGATTTGAGATAGG  
GGTCTTTTCGGGGGTGACCGACTTTAGTCGTTACGTTCTTCCGATCCTAAACTCTATCC

SacI

EcoICRI

BsmI

EcoRI

30541 AGCTCAGTGGCAGGGCGCTTATCTAGCATTTCATGAGGCTTTGAATTCCAATCCTCAGCCC  
TCGAGTCACCGTCCC CGAATAGATCGTAAGTACTCCGAACTTAAGGTTAGGAGTCGGG

30601 AGGGGGAAAAAACAAAAATCAACTACAAGGCTCCTGCACTGGATATATATCGAGAGCTGG  
TCCCCCTTTTTTGTTTTTTAGTTGATGTTCCGAGGACGTGACCTATATATAGCTCTCGACC

AvrII

30661 GACCCCCAACAGCAAGCCTAGGAAATAACTGTAGTGCCTAAGAGCAGATGCAGATTTCT  
CTGGGGGTTGTTTCGTTCCGGATCCTTTATTGACATCACGGATTCTCGTCTACGTCTAAAGA

BspMI

RleAI

30721 TAGCATATCCTACTACCTGCTCCCCACACCATAATGTAGATACTAATGGGCCTCGCCT  
ATCGTATAGGATGATGGACGAGGGGTGTGGTATTACATCTATGTGATTACCCGGAGCGGA

BspMI

PvuII

30781 TCACTAAGGAAAGTAGAAACTGCTTTCTGGGGGTAGCAGCTGTCCTGGCAGGTGCGGGCC  
AGTGATTCTTTTCATCTTTGACGAAAGACCCCATCGTCGACAGGACCGTCCACGCCCGG

## Exon 44

30841 TTCAAGAACAAGTGTTAATGCGTTCCAGGTTCTCTACCAGGAAGATGAACACCGACAAC  
AAGTTCTTGTTCACAATTACGCAAGGTC CAAGAGGATGGTCTTCTACTTGTGGCTGTTG

BspMI

30901 TGACCTGCCAGAGGAGGACAAGAGGGAGATCCAGCCATCTCAAAGAGGAGTTTCTCTC  
ACTGGACGGGTCTCCTCCTGTTCTCCCTCTAGGTCGGTAGAGGTTTCTCTCAAAGGAAG

30961 GCTCTGCCTCTCTAGTAAACTCACGCCTCGCTTTGCAGCAAGTGACAACCTGAGAAACTA  
CGAGACGGAGAGATCCATTTGAGTGCAGGAGCGAAACGTCGTTCACTGTTGACTCTTTGAT

xhoI↓

31021 TTTGGGCCTCACTTAGACAATGTCTATAGATGGCCTGGTAGACATGCAACGTAACAAGAT  
AAACCCGGAGTGAATCTGTTACAGATATCTACCGGACCATCTGTACGTTGCATTGTTCTA

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer und Arbeitsgruppenleiter Herrn PD Dr. Sven Moosmang sowohl für die Überlassung dieses interessanten Projektes, als auch die stete Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Geduld in allen Phasen meiner Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut für Pharmakologie und Toxikologie und sein stetes Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Michael Schemann gilt mein Dank für seine Bereitschaft, die offizielle Betreuung meiner Arbeit zu übernehmen.

Toni und Peter danke ich von ganzem Herzen für ihre geduldige Einarbeitung in die „Welt“ der Stammzellkultur und der Blastozysteninjektionen, und für eine sooo schöne, intensive und lehrreiche gemeinsame Zeit.

Nicole danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art, für so viele aufmunternde Worte und für das eine oder andere „Schwätzle“.

Angelika möchte ich für ihre sooo tatkräftige und kompetente Unterstützung im Laboralltag, ihr stets offenes Ohr und ihre so freundliche und ausgeglichene Art danken.

Ein DICKES DANKESCHÖN an Carl, Julia, Katrin und Lior, die mir nicht nur während der Zeit der Blastozysteninjektionen sehr viel Unterstützung entgegengebracht haben; sie hatten mir besonders in der letzten Zeit durch viele lustige Momente das Leben als Doktorandin versüßt!

Besonderen Dank an Katrin, meine „Mäusemama“, da sie sich so liebevoll um die Tierchen kümmert und ich mich immer auf sie verlassen kann!

Allen anderen Mitarbeitern (vor allem dem EG und den Bau 8-lern) danke ich herzlichst für das äußerst freundliche, kollegiale und respektvolle Arbeitsklima, welches maßgeblich an meiner Motivation und meinem Wohlbefinden beteiligt war.